

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Doctoral study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



Vývoj analytických nástrojů pro kvantifikaci a hledání inhibitorů
glutamátcarboxypeptidas II a III

Development of analytical tools for quantification and screening
for inhibitors of glutamate carboxypeptidases II and III

Mgr. Václav Navrátil

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2018

Abstrakt

Glutamát karboxypeptidasa II (GCPII), známá také jako prostatický specifický membránový antigen (PSMA), je membránová metalopeptidasa exprimovaná zejména na buňkách karcinomu prostaty (PCa). Látky cílicí GCPII pro zobrazování a léčbu PCa jsou ve vývoji a ukazují nadějný výsledky v pokročilých fázích klinického testování. Některé studie ukázaly, že GCPII by mohla být využita také jako krevní marker PCa, což ale zatím nebylo potvrzeno kvůli absenci metod vhodných pro přesnou detekci GCPII v krvi.

GCPII je exprimována také v mozku, kde štěpí inhibiční *N*-Acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) na excitační L-glutamát a inhibice GCPII je neuroprotektivní ve zvířecích modelech několika neuropatií. Silné inhibitory GCPII byly nalezeny pomocí racionálního vývoje, ale všechny vykazují nedostatečnou biodostupnost aby mohly být využity v klinické praxi. Nalezení nových strukturních motivů je tedy nezbytné, nicméně zatím nebyla vyvinuta žádná metoda vhodná pro účinné testování inhibitorů GCPII.

V mozku se nalézá také málo prozkoumaná glutamát karboxypeptidasa III (GCPIII), která také štěpí NAAG. Její studium je tak nutné pro pochopení funkce GCPII a pro cílení GCPII v medicíně.

V této práci jsme se zaměřili na vývoj nových metod pro kvantifikaci obou enzymů a pro hledání jejich inhibitorů. Nejprve jsme vyvinuli qRT-PCR a radioenzymové stanovení pro kvantifikaci GCPII a III v lidských a myších tkáních a ověřili, že GCPII se v myši na rozdíl od člověka nenachází v prostatě a tenkém střevu. Dále jsme vyvinuli několik vzájemně se doplňujících stanovení pro detekci GCPII v krvi a určili jsme jimi hladiny GCPII v krvi zdravých lidí a pacientů trpících PCa. Bohužel jsme ukázali, že GCPII patrně nelze využít jako sérový marker PCa. Nakonec jsme vyvinuli zcela novou metodu detekce enzymů DIANA založenou na vazbě enzymu na protilátku a jeho detekci skrze inhibitor navázaný na DNA oligonukleotid. Na příkladu GCPII a CAIX, což je další nádorový marker a potenciální terapeutický cíl, jsme ukázali, že tato metoda je vhodná nejen pro ultracitlivou detekci enzymů, ale také pro účinné hledání jejich inhibitorů bez potřeby purifikovaného enzymu. To dělá DIANA metodu výjimečným nástrojem pro detekci biomarkerů a vývoj léčiv.

Úvod

Glutamát karboxypeptidasa II (GCPII) je homodimerní integrální membránový glykoprotein II. typu nacházející se na cytoplasmatické membráně, přičemž aktivní místo se nalézá v extracelulárním prostoru.

GCPII byla nejprve objevena a popsána jako tři různé proteiny: (i) jako pteroyl-poly-glutamyl hydrolasa postupně odštěpující γ -glutamátové residua z folyl-poly- γ -glutamátu (FPG) izolovaná z lidského střeva v roce 1986 (odtud **folát hydrolasa**, FOLH1) [1], (ii) jako "*N*-acetylated- α -linked acidic" dipeptidasa štěpící *N*-acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) na *N*-acetyl-L-aspartát (NAA) a L-glutamát izolovaná z krysího mozku v roce 1987 (odtud **NAALADasa**) [2] a (iii) jako antigen exprimovaný v buněčné linii karcinomu prostaty v roce 1987 (odtud **prostatický specifický membránový antigen**, **PSMA**) [3]. Trvalo téměř deset let, než vědecká komunita zjistila, že se jedná o jeden a tentýž protein [4, 5].

GCPII je u člověka exprimována především v prostatě [6-9], kde se nalézá v sekrečních epiteliálních buňkách [6]. Karcinom prostaty se vyvíjí z těchto buněk a nádorové buňky si zachovávají vysokou expresi membránově vázané GCPII [10, 11]. GCPII je sekretována do semenné plasmy [12]. GCPII byla nalezena také v neovaskulatuře neprostatických pevných nádorů, avšak nikoliv v normální neovaskulatuře [11, 13, 14]. GCPII je silně exprimována také v ledvinách [10], kde se nachází na lumenální straně proximálních tubulů [6, 11, 15], v mozku [6, 16], kde byla nalezena na neuronech [15] a astrocytech [16], a ve střevním epitelu [1, 6, 17]. GCPII byla nalezena také v játrech, slezině [6, 9] a v některých studiích také v krvi [18].

GCPII je nadějným cílem pro diagnostiku a léčbu několika onemocnění. ¹¹¹In-značená GCPII rozeznávající protilátka známá pod obchodním názvem ProstaScint je používána pro zobrazování karcinomu prostaty *in vivo* [19]. V klinickém vývoji jsou nyní nové generace látek cílících GCPII skládající se z nízkomolekulárního inhibitoru konjugovaného s radionuklidem, které jsou využitelné nejen pro zobrazování ale i pro léčbu karcinomu prostaty [20, 21]. Zároveň, sérová hladina GCPII by mohla být využitelná pro diagnostiku tohoto onemocnění [18]. Navíc bylo ukázáno, že inhibice GCPII je neuroprotektivní ve zvířecích modelech řady neuropatií [22-24]. V posledních letech byla také

zjištěna příčinná souvislost mezi hydrolytickou aktivitou GCPII a vývojem zánětlivého onemocnění střev (zkráceně IBD) [25, 26]. Racionálním vývojem byly nalezeny vysokoafinní inhibitory GCPII [27-29], které jsou ale bohužel vícenásobně záporně nabitě a neprochází ani přes buněčnou membránu ani přes hemoencefalickou membránu [30, 31]. To znemožňuje jejich klinické využití a nalezení nových inhibitorů GCPII je proto nutným předpokladem pro cílení GCPII v lidském mozku.

Glutamát karboxypeptidasa III (GCPIII) je nejbližším homologem GCPII. Je to také homodimerní integrální membránový glykoprotein nalézající se na cytoplasmatické membráně. GCPIII má stejnou topologii jako GCPII a sdílí s ní ~70% aminokyselinové sekvence.

GCPIII je méně prozkoumaná než GCPII. Byla charakterizována teprve v roce 1999. GCPIII stejně jako GCPII vykazuje "*N*-acetylated- α -linked acidic" dipeptidasovou aktivitu (odtud **NAALADase 2**) [32, 33]. NAAG štěpí s přibližně desetkrát nižší efektivitou než GCPII, nicméně je inhibována GCPII inhibitory s podobnou účinností [34]. Nedávno bylo zjištěno, že myši GCPIII je schopná štěpit β -citryl-L-glutamát (BCG) za tvorby citrátu a L-glutamátu [35] a že se jedná o totožný enzym s membránově vázanou BCG hydrolasou izolovanou z krysího varlete před více než třiceti lety [36, 37].

Tkáňová exprese GCPIII není podrobně prozkoumána, protože chybí protilátky selektivně rozeznávající GCPIII. Pomocí RT-PCR a northern blotu byla mRNA GCPIII nalezena především v lidském varleti a méně ve vaječniku, slezině, placentě a srdci [32]. Northern blot prokázal GCPIII expresi také v myším vaječniku, varleti a plíci [33]. Nejsilnější BCG hydrolytická aktivita byla pozorována v myším varleti, děloze a močovém měchýři a v menším množství také v ledvině, plíci a dalších tkáních [35]. U krysy byla nejsilnější BCG hydrolysa pozorována ve varleti, plicích a srdci, ale detekována byla také v ledvině, střevu, mozku a dalších tkáních [36]. Bohužel byly v těchto studiích analyzovány různé sety tkání a přímé porovnání tak není možné, nicméně GCPIII či BCG hydrolytická aktivita byla konzistentně nalezena v orgánech reprodukčního systému (varle, vaječník a děloha).

Cíle práce

1. Vývoj qRT-PCR metod umožňujících selektivní detekci lidské a myší GCPII a GCPIII a jejich kvantifikace v setu lidských a myších tkání. Porovnání tkáňové exprese GCPII v lidech a myších.
2. Vývoj několika vzájemně ortogonálních metod umožňujících selektivní kvantifikaci GCPII v lidské krvi (sendvičové ELISA, DIANA a radioenzymové detekce). Ověření možnosti využití GCPII jako krevního markeru karcinomu prostaty.
3. Vývoj nové metody pro ultracitlivou detekci enzymů a pro účinné hledání jejich inhibitorů využívající konjugátů nízkomolekulárních ligandů aktivního místa cílových enzymů a DNA. Ověření funkčnosti metody na dvou modelových enzymech GCPII a CAIX, které jsou potenciálními rakovinnými markery a terapeutickými cíli.

Seznam publikací

Publikace zahrnuté v disertační práci

- I. Navratil, M., Tykvart, J., Schimer, J., Pahl, P., **Navratil, V.**, Rokob, T.A., Hlouchova, K., Rulisek, L., and Konvalinka, J.: Comparison of human glutamate carboxypeptidases II and III reveals their divergent substrate specificities. *FEBS J.* 2016, 283(13):2528-2545. IF = 3.9.
- II. Knedlik T., Vorlova B., **Navratil V.**, Tykvart J., Sedlak F., Vaculin S., Franek M., Sacha P., and Konvalinka J.: Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has a similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII. *FEBS Open Bio* 2017, 7(9):1362-1378. IF = 2.1.
- III. Knedlik T., **Navratil V.**, Vik V., Pacik D., Sacha P., and Konvalinka J.: Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in human blood. *Prostate* 2014, 74(7):768-780. IF = 3.8.
- IV. **Navratil V.**, Schimer J., Tykvart J., Knedlik T., Vik V., Majer P., Konvalinka J., and Sacha P.: DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(2):e10. IF = 10.2.

Publikace nezahrnuté v disertační práci

- V. Hlouchova, K., **Navratil, V.**, Tykvar, J., Sacha, P., and Konvalinka, J.: GCPII variants, paralogs and orthologs. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19(9):1316-1322. IF = 3.2.
- VI. Marusincova, H., Husarova, L., Ruzicka, J., Ingr, M., **Navratil, V.**, Bunkova, L., and Koutny, M.: Polyvinyl alcohol biodegradation under denitrifying conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013, 84:21-28. IF = 3.0.
- VII. **Navratil, V.**, Klusak, V., and Rulisek, L.: Theoretical aspects of hydrolysis of peptide bonds by zinc metalloenzymes. *Chemistry* 2013, 19(49):16634-16645. IF = 5.3.
- VIII. Tykvar, J., **Navratil, V.**, Sedlak, F., Corey, E., Colombatti, M., Fracasso, G., Koukolik, F., Barinka, C., Sacha P., and Konvalinka J.: Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Prostate* 2014, 74(16):1674-1690. IF = 3.8.
- IX. Tykvar, J., Barinka, C., Svoboda, M., **Navratil, V.**, Soucek, R., Hubalek, M., Hradilek, M., Sacha, P., Lubkowski, J., and Konvalinka, J.: Structural and biochemical characterization of a novel aminopeptidase from human intestine. *J. Biol. Chem.* 2015, 290(18):11321-11336. IF = 4.1.
- X. Tykvar, J., Schimer, J., Jancarik, A., Barinkova, J., **Navratil, V.**, Starkova, J., Sramkova, K., Konvalinka, J., Majer, P., and Sacha, P.: Design of highly potent urea-based, exosite-binding inhibitors selective for glutamate carboxypeptidase II. *J. Med. Chem.* 2015, 58(10):4357-4363. IF = 6.3.
- XI. Sacha P., Knedlik T., Schimer J., Tykvar J., Parolek J., **Navratil V.**, Dvorakova P., Sedlak F., Ulbrich K., Strohalm J., Majer P., Subr V., and Konvalinka J.: iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016, 55(7):2356-2360. IF = 12.0.

Výsledky a diskuze

Selektivní kvantifikace GCPII a GCPIII v lidských a myších tkáních

Zatímco byla publikována řada studií exprese GCPII v lidských tkáních [6, 10-13], pouze základní informace jsou známy o expresi lidské GCPIII [32] nebo myší GCPII [15, 35, 38], a to přestože myši jsou běžně používány pro studium funkce a léčebné využití GCPII [20, 23, 39-41].

Proto jsme vyvinuli metody pro selektivní kvantifikaci GCPII a GCPIII na úrovni mRNA či proteinu v lidských a myších tkáních. Nejprve jsme vyvinuli selektivní qRT-PCR stanovení lidské a myší GCPII a III a určili jejich množství v setu tkáňových cDNA knihoven. Poté jsme určili množství obou enzymů také v tkáních stanovením enzymové aktivity za využití jejich rozdílné substrátové specifity v přítomnosti vápenatých iontů.

Jako první jsme stanovili množství GCPIII na proteinové úrovni v lidských tkáních a tato data byla ve shodě s daty získanými pomocí qRT-PCR stanovení. To bylo nicméně citlivější a umožnilo tak stanovení množství GCPIII mRNA v obsáhlejších setu tkání. Nejvyšší exprese GCPIII jsme pozorovali ve varleti, vaječniku a placentě. Naměřené hladiny lidské GCPII se pak shodovaly nejen mezi qRT-PCR a enzymovým stanovením, ale také s dřívějšími publikacemi. Nejvyšší exprese GCPII jsme našli v prostatě, ledvině, mozku a játrech.

V myši jsme na proteinové úrovni stanovili pouze GCPII, zatímco mRNA obou proteinů jsme detekovali pomocí qRT-PCR. Nejvyšší expresi GCPII jsme pozorovali oběma metodami v ledvině, mozku a slinných žlázách, zatímco žádnou expresi GCPII jsme nepozorovali v prostatě a tenkém střevu. To je ve shodě s předchozími studiemi [15, 38], ale představuje zásadní rozdíl oproti lidem. GCPII tak zřejmě u myši není potřeba pro vstřebávání folátů ze stravy, obdobně jako je tomu například u krys [42]. Na druhou stranu absence GCPII v myši prostatě nemusí znamenat odlišnou funkci u myši a člověka. GCPII je u člověka sekretována do semenné plasmy [12] a GCPII jsme našli v myším varleti (na rozdíl od člověka), kde může být sekretována do semenné plasmy.

Výsledky jsou shrnuty v publikacích I a II.

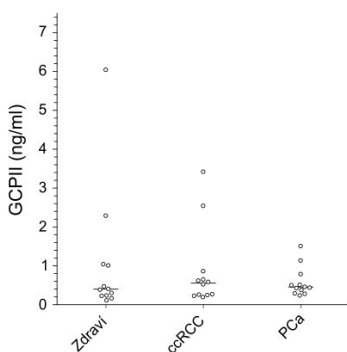
Můj příspěvek: vyvinul jsem qRT-PCR stanovení a určil množství GCPII a GCPIII v lidských a myších tkáňových cDNA knihovnách.

Kvantifikace GCPII v krvi a její funkce jako marker karcinomu prostaty

GCPII je nadějný protein pro cílené zobrazovací metody a cílenou léčbu karcinomu prostaty (PCa) [43-45]. Bylo ukázáno, že je i sérovým markerem PCa [18], nicméně neexistují spolehlivé metody pro validaci této hypotézy.

Proto jsme vyvinuli několik vzájemně ortogonálních metod pro kvantifikaci GCPII v lidské krvi. Nejprve jsme ověřili, že NAAG je v krvi štěpen pouze GCPII a to jsme využili pro kvantifikaci GCPII v krvi pomocí radioenzymové eseye. Kromě toho jsme pro detekci GCPII v krvi vyvinuli sendvičovou ELISA. Nakonec jsme vyvinuli nové DIANA stanovení (podrobněji popsané později). Byli jsme tak schopni stanovit množství GCPII ve vzorcích lidské krvi dokonce třemi různými metodami.

Všechny tři metody dávaly téměř totožné výsledky a zjistili jsme, že GCPII je v krvi zdravých jedinců v koncentraci mezi 0.1 až 10 ng/ml, což je mnohem méně než bylo pozorováno dříve pomocí méně spolehlivých metod. ELISA a DIANA stanovení jsme využili pro stanovení GCPII v malém setu klinických vzorků (n=36) a nepozorovali jsme žádný rozdíl mezi PCa a zdravými jedinci (**Obr. 1**). GCPII tak zřejmě není využitelná jako sérový marker PCa.



Obrázek 1: Hladina GCPII v séru zdravých lidí a onkologických pacientů.

Sérové hladiny GCPII stanovené DIANA metodou ve vzorcích 12 zdravých mužů, 12 mužů s histologicky potvrzeným PCa a 10 mužů a 2 žen s histologicky potvrzeným světló buněčným karcinomem ledviny (ccRCC). Vodorovné linie ukazují medián koncentrace.

Abychom potvrdili, že hladina GCPII skutečně není vyšší v séru pacientů s PCa, tak jsme stanovili její koncentraci radioenzymovou esejí a sendvičovou ELISA v séru odebraném 110 lidem, kteří spadali do několika skupin, přičemž v každé skupině bylo podobné množství lidí: lokalizovaný PCa, metastatický PCa, benigní hyperplazie prostaty (BPH), pacienti po radikální prostatektomii s nedetekovatelnou hladinou PSA v séru, zdraví muži a zdravé ženy. U většiny

vzorků jsme určili také hladinu PSA, které se dnes využívá jako marker PCa. Přestože jsme mezi skupinami viděli obrovské rozdíly v hladinách PSA, tak jsme nepozorovali žádné rozdíly v hladině GCPII. To nám potvrdilo, že GCPII není využitelné jako sérový marker PCa. Protože jsme neviděli významné snížení koncentrací GCPII ani u pacientů po radikální prostatektomii, tak předpokládáme, že sérové GCPII pochází nikoliv z prostaty, ale z jiných orgánů (výsledky uvedené v tomto odstavci nejsou součástí této práce, ale byly získány využitím metod vyvinutých v této práci).

Výsledky jsou shrnuty v publikacích III and IV.

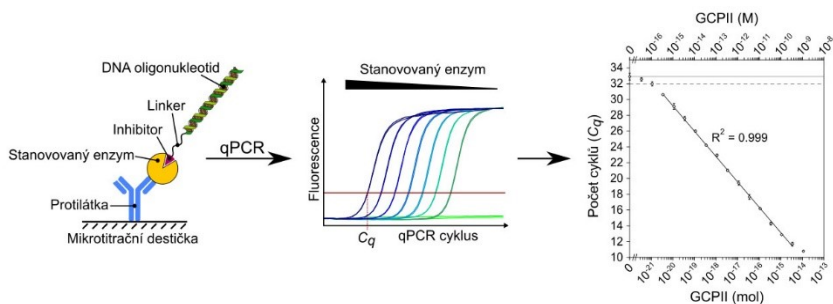
Můj příspěvek: Provedl jsem prvotní zkušební pokusy pro radioenzymové stanovení a zejména jsem vyvinul ELISA a DIANA stanovení. Určil jsem sérové hladiny GCPII v prvním setu vzorků zdravých lidí a pacientů s PCa.

DIANA stanovení pro detekci enzymů a hledání jejich inhibitorů

V publikaci IV jsme ukázali vývoj DIANA stanovení vhodného pro detekci enzymů a hledání jejich inhibitorů. Toto stanovení je analogické immuno-PCR metodě popsané v [46], ve které je cílový protein zachycen imobilizovanou protilátkou a následně se na něj z roztoku naváže druhá protilátka konjugovaná s DNA, která je nakonec detekována v qPCR. V DIANA jsme nahradili DNA-konjugovanou protilátkou detekční sondou skládající se z DNA oligonukleotidu kovalentně spojeného s nízkomolekulární látkou vázající se do aktivního místa cílového enzymu (**Obr. 2**).

DIANA jsme vyvinuli pro stanovení GCPII, GCPIII a CAIX, která je dalším potenciálním léčebným cílem a rakovinným markerem. Ukázali jsme, že DIANA dokáže detekovat subfemtogramové množství cílového enzymu v komplexních biologických matricích (například v krevním séru) s lineárním rozsahem pět až šest řádů (**Obr. 2**). Ukázali jsme také, že velký dynamický rozsah a vazba sondy do aktivního místa enzymu lze využít pro určení inhibiční potence testovaných látek z jediné jejich koncentrace, což není možné jinými metodami. Díky selektivitě DIANA stanovení je možné testovat inhibitory i s nepurifikovaným enzymem či dokonce s nezpracovaným lidským sérem.

Můj příspěvek: Navrhl jsem tuto studii a provedl většinu experimentů.



Obrázek 2: Schematické znázornění detekce enzymů metodou DIANA.

DNA oligonukleotid kovalentně připojený k nízkomolekulárnímu kompetitivnímu inhibitoru enzymu se použije jako detekční sonda. Ta se váže do aktivního místa stanovovaného enzymu, který je předtím zachycen na mikrotitrační destičku skrze imobilizovanou protilátku. Množství navázané detekční sondy je stanoveno pomocí qPCR ve formě počtu cyklů (C_q), které jsou nepřímo úměrné logaritmu koncentrace sondy.

Závěry

Vyvinuli jsme radioenzymové a qRT-PCR stanovení pro selektivní detekci GCPII a GCPIII v lidských a myších tkáních. Provedli jsme první srovnávací studii exprese obou proteinů v setu lidských a myších tkání. Potvrdili jsme dřívější data naznačující významné rozdíly v expresi GCPII mezi lidskými a myšími tkáněmi, zejména v prostatě, varleti a tenkém střevu.

Vyvinuli jsme také několik ortogonálních metod pro stanovení GCPII v lidském krevním séru. Ukázali jsme, že GCPII je v krvi v přibližně stokrát nižší koncentraci, než bylo doposud předpokládáno. Ukázali jsme také, že sérová hladina GCPII není vyšší u pacientů s PCa v porovnání se zdravými lidmi a není tak využitelná jako sérový marker PCa. PSA tak zůstává zdaleka nejlepším markerem pro diagnosu PCa.

Nakonec jsme vyvinuli novou DIANA metodu pro detekci enzymů a hledání jejich inhibitorů. Ukázali jsme, že je vhodná pro ultracitlivou detekci s velkým lineárním rozsahem a že dokáže určit inhibiční potenci látek z jediné jejich koncentrace. DIANA se navíc ukázala jako výjimečně robustní metoda pro testování inhibitorů nevykazující falešně pozitivní a negativní výsledky. Věříme, že se proto stane široce využívanou metodou v akademickém prostředí i v komerční sféře.

Použitá literatura

1. Chandler, C.J., Wang, T.T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1986. **261**(2):928-933.
2. Robinson, M.B., Blakely, R.D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1987. **262**(30):14498-14506.
3. Horoszewicz, J.S., Kawinski, E., *et al.*, *Anticancer Res.*, 1987. **7**(5):927-936.
4. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1996. **2**(9):1445-1451.
5. Carter, R.E., Feldman, A.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996. **93**(2):749-753.
6. Rovenska, M., Hlouchova, K., *et al.*, *Prostate*, 2008. **68**(2):171-182.
7. Cunha, A.C., Weigle, B., *et al.*, *Cancer Lett.*, 2006. **236**(2):229-238.
8. Israeli, R.S., Powell, C.T., *et al.*, *Cancer Res.*, 1994. **54**(7):1807-1811.
9. O'Keefe, D.S., Bacich, D.J., *et al.*, *Prostate*, 2004. **58**(2):200-210.
10. Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., *et al.*, *World J. Surg.*, 2006. **30**(4):628-636.
11. Silver, D.A., Pellicer, I., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1997. **3**(1):81-85.
12. Sokoloff, R.L., Norton, K.C., *et al.*, *Prostate*, 2000. **43**(2):150-157.
13. Chang, S.S., Reuter, V.E., *et al.*, *Cancer Res.*, 1999. **59**(13):3192-3198.
14. Liu, H., Moy, P., *et al.*, *Cancer Res.*, 1997. **57**(17):3629-3634.
15. Huang, X., Bennett, M., *et al.*, *Prostate*, 2004. **61**(1):1-11.
16. Sacha, P., Zamecnik, J., *et al.*, *Neuroscience*, 2007. **144**(4):1361-1372.
17. Troyer, J.K., Beckett, M.L., *et al.*, *Int. J. Cancer.*, 1995. **62**(5):552-558.
18. Xiao, Z., Adam, B.L., *et al.*, *Cancer Res.*, 2001. **61**(16):6029-6033.
19. Taneja, S.S., *Rev. Urol.*, 2004. **6 Suppl 10**:S19-28.
20. Weinisen, M., Schottelius, M., *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2015. **56**(8):1169-1176.
21. Heck, M.M., Retz, M., *et al.*, *J. Urology*, 2016. **196**(2):382-390.
22. Slusher, B.S., Vornov, J.J., *et al.*, *Nat. Med.*, 1999. **5**(12):1396-1402.
23. Bacich, D.J., Wozniak, K.M., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2005. **95**(2):314-323.
24. Olszewski, R.T., Bzdega, T., *et al.*, *Schizophr. Res.*, 2012. **136**(1-3):160-161.
25. Rais, R., Jiang, W., *et al.*, *JCI Insight*, 2016. **1**(12).
26. Date, A.A., Rais, R., *et al.*, *J. Control. Release*, 2017. **263**:132-138.
27. Jackson, P.F., Cole, D.C., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996. **39**(2):619-622.
28. Kozikowski, A.P., Nan, F., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2001. **44**(3):298-301.
29. Majer, P., Jackson, P.F., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003. **46**(10):1989-1996.
30. van der Post, J.P., de Visser, S.J., *et al.*, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 2005. **60**(2):128-136.
31. Rais, R., Wozniak, K., *et al.*, *Plos One*, 2015. **10**(7).
32. Pangalos, M.N., Neefs, J.M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(13):8470-8483.
33. Bzdega, T., Crowe, S.L., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2004. **89**(3):627-635.
34. Hlouchova, K., Barinka, C., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2007. **101**(3):682-696.
35. Collard, F., Vertommen, D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2011. **286**(44):38220-38230.
36. Miyake, M., Innami, T., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1983. **760**(2):206-214.
37. Asakura, M., Nagahashi, Y., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995. **1250**(1):35-42.
38. Bacich, D.J., Pinto, J.T., *et al.*, *Mamm. Genome*, 2001. **12**(2):117-123.
39. Benesova, M., Bauder-Wust, U., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2016. **59**(5):1761-1775.
40. Cao, Y., Gao, Y., *et al.*, *BMC Neurosci.*, 2016. **17**:15.
41. Vornov, J.J., Hollinger, K.R., *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 2016. **76**:215-255.
42. Shafizadeh, T.B. and Halsted, C.H., *J. Nutr.*, 2007. **137**(5):1149-1153.
43. Emmett, L., Willowson, K., *et al.*, *J. Med. Radiat. Sci.*, 2017. **64**(1):52-60.
44. Evans, J.D., Jethwa, K.R., *et al.*, *Pract. Radiat. Oncol.*, 2018. **8**(1):28-39.
45. Kopka, K., Benesova, M., *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2017. **58**(Suppl 2):17S-26S.
46. Hendrickson, E.R., Truby, T.M., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1995. **23**(3):522-529.

Curriculum vitae

Václav Navrátil

Ústav Organické Chemie a Biochemie AV ČR, v.v.i. (ÚOCHB)

Email: vaclav.navratil@uochb.cas.cz

Motivace

Přenos vědeckých poznatků do praxe mající důsledky na každodenní život.

Pracovní zkušenosti

Od 2016 Projektový vedoucí na ÚOCHB
Vedení vývoje a komercializace technologie DIANA, která je unikátním řešením pro ultracitlivou kvantifikaci enzymů a hledání inhibitorů enzyme, kterou jsem vyvinul při své předchozí práci.

Vzdělání

2007 – 2009 Magisterské studium Modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze; diplomová práce “*Studium variantních forem lidské glutamátkarboxypeptidasy II kombinací experimentálních a teoretických metod*” vedená Janem Konvalinkou a Lubomírem Rulíškem na ÚOCHB.

2004 – 2007 Bakalářské studium Biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze; bakalářská práce “*Lidská glutamátkarboxypeptidasa II a její paralogy*” vedená Janem Konvalinkou na ÚOCHB.

Publikace a patenty

Spoluautor 10 původních prací a jednoho souhrnného článku v recenzovaných časopisech.
Spoluautor několika mezinárodních patentových přihlášek.

Vybrané prezentace na konferencích a veletrzích

BioVaria 2016 v Mnichově, GER (ústní prezentace DIANA technologie)
BIO Convention 2016 v San Franciscu, USA (prezentace DIANA technologie)
Basel Life Science Week 2016, SUI (ústní prezentace DIANA technologie)
BioSpot 2017 v Praze, CZE (ústní prezentace DIANA technologie)

Mezinárodní výzkumné zkušenosti

2015 Dvoutýdenní pobyt na Johns Hopkins University v Baltimore, MD, USA
2017 Dvoutýdenní pobyt u globální farmaceutické společnosti, Japonsko

Jazykové schopnosti

Znalost na úrovni rodilého mluvčího: čeština a němčina; plynule angličtina.

Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) usually called prostate specific membrane antigen (PSMA) is membrane bound metallopeptidase expressed mainly in prostate carcinoma (PCa). Agents targeting GCPII suitable for both imaging and treatment of PCa are in development and they show promising results in advanced clinical trials. Some studies showed that GCPII may serve also as PCa blood serum marker, but this has not been validated due to the lack of methods suitable for accurate detection of GCPII in human blood.

Moreover, GCPII is also expressed in brain, where it cleaves inhibitory *N*-acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) to release excitatory L-glutamate and GCPII inhibition has been shown to be neuroprotective in animal models of several neuropathies. Tight binding inhibitors of GCPII have been identified by rational design, but all have poor bioavailability and thus cannot be used in clinics. Identifying new scaffolds by 'brute force' screening methods is thus essential; however, no such method for GCPII has been developed so far.

Glutamate carboxypeptidase III (GCPIII) is also expressed in brain and cleaves NAAG. It is thus an important protein for understanding of GCPII function as well as GCPII targeting in medicine.

Here, we focused on development of novel methods for quantification of both enzymes and screening of their inhibitors. First, we developed qRT-PCR and radioenzymatic assays to quantify GCPII and GCPIII in human and mice tissues and proved lack of GCPII in murine prostate and intestine. We also developed several orthogonal assays for detection of GCPII in blood and determined GCPII blood levels in healthy and PCa individuals. Unfortunately, we showed that GCPII is not useful as a serum marker of PCa. Finally, we developed a novel method for enzyme detection (DIANA), which is based on dual recognition of the enzyme by immobilized antibody and DNA-linked inhibitor. We showed on the example of GCPII and CAIX, which is also a putative cancer marker and potential drug target, that this method is useful not only for ultrasensitive enzyme detection but also for screening of enzyme inhibitors without the need to purify the target enzyme. This makes DIANA a superior tool for biomarker detection and drug discovery.

Introduction

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) is homodimeric type II integral membrane glycoprotein located on the cytoplasmic membrane with active site facing to the extracellular space.

GCPII was first described independently as three distinct proteins: (i) as pteroyl-poly-glutamyl hydrolase sequentially cleaving off the γ -glutamates from folyl-poly- γ -glutamate (FPG) isolated from human intestine in 1986 (hence **folate hydrolase**, FOLH1) [1], (ii) as *N*-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase cleaving *N*-acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) to *N*-acetyl-L-aspartate (NAA) and L-glutamate isolated from rat brain in 1987 (hence **NAALADase**) [2] and (iii) as an antigen overexpressed in a prostate carcinoma cell line also in 1987 (hence its name **prostate specific membrane antigen, PSMA**) [3]. In the pre-genomics era, it took almost ten years for the scientific community to realize that all three represent an identical protein [4, 5].

GCPII is in humans predominantly expressed in prostate [6-9] and its expression is confined to the secretory epithelial cells [6]. Prostate carcinoma is derived from these cells and carcinoma cells preserve the high expression of membrane bound GCPII [10, 11]. It is also secreted to the seminal plasma [12]. GCPII has been observed also in neovasculature of non-prostatic solid tumors but not in normal vasculature [11, 13, 14]. GCPII is also highly expressed in kidney [10] where it localizes to luminal side of the proximal tubules [6, 11, 15], in brain [6, 16] where it has been found on neurons [15] and astrocytes [16], and in jejunal brush border [1, 6, 17]. GCPII has been found also in liver, spleen [6, 9] and in some studies also in blood [18].

GCPII represents a promising target for diagnosis and treatment of several diseases. An ^{111}In -labeled anti-GCPII antibody known under the trade name ProstaScint is used for imaging of prostate carcinoma *in vivo* [19]. New generation of tracers consisting of small molecule inhibitor conjugated to radionuclide, which are suitable not only for imaging but also for targeted treatment, are in clinical development [20, 21]. At the same time, GCPII serum levels may also be used for diagnostics [18]. Moreover, it has been shown that GCPII inhibition may be neuroprotective in some pathological conditions of central nervous system [22-24]. Recently, its role in the development of

inflammatory bowel disease has been also proposed [25, 26]. To enable clinical exploitation of GCPII, high-affinity competitive inhibitors of GCPII have been identified by rational design [27-29]. However, they bear multiple negative charges and show poor bioavailability [30, 31] and therefore identifying new inhibitor scaffolds is essential to target GCPII in human brain.

Glutamate carboxypeptidase III (GCPIII) is the closest homolog of GCPII. It is also a homodimeric integral membrane glycoprotein located on the cytoplasmic membrane, which shares ~70% amino acid sequence identity and the same topology with GCPII.

Much less information is known about GCPIII than about GCPII. It has been cloned and characterized only in 1999 for the first time. It has been shown that it also possesses *N*-acetylated- α -linked acidic dipeptidase activity (hence its name **NAALADase 2**) [32, 33]. However, it cleaves NAAG with about 10 fold lower efficiency than GCPII, but at the same time is inhibited by GCPII inhibitors with similar potency [34]. Recently, it has been shown that mouse GCPIII can cleave also β -citryl-L-glutamate (BCG) to form citrate and L-glutamate [35] and that it is identical to the membrane bound BCG hydrolase initially isolated from rat testis more than thirty years ago [36, 37].

GCPIII tissue expression is not well described, as antibodies selective for GCPIII are lacking. Using RT-PCR and northern blot, highest amount of GCPIII mRNA has been found in human testes and to a lesser extent in ovary, spleen, placenta and heart [32]. Northern blot analysis showed GCPIII in mouse ovary, testes and lung [33]. The highest BCG hydrolysis was observed in mouse testis, uterus and bladder and to a lesser extent also in kidneys, lungs and other tissues [35]. In rat, highest BCG hydrolyzing activity was observed in testis, lung and heart, but it was detected also in kidney, intestine, brain and other tissues [36]. Unfortunately, different sets of tissues were analyzed in these studies and direct comparison is not possible, however, GCPIII or BCG hydrolyzing activity was consistently observed in reproductive system (testis, ovary and uterus).

Aims of the thesis

1. Development of qRT-PCR methods enabling selective detection of GCPII and its closest homolog GCPIII in human and mice and their quantification in a set of human and mice tissues. Comparison of GCPII tissue expression between human and mice.
2. Development of several orthogonal assays enabling selective quantification of GCPII protein in human blood (sandwich ELISA, DIANA and radioenzymatic assay). Validation of the possibility to use GCPII as a blood serum marker of prostate cancer.
3. Development of novel method for ultrasensitive detection of enzymes and screening for their inhibitors based on the use DNA-linked low molecular weight active site binders of target enzymes. Assessment of its performance on two model targets GCPII and CAIX, which are potential drug targets and potential cancer markers.

List of publications

Publications included in the thesis

- I. Navratil, M., Tykvart, J., Schimer, J., Pachel, P., **Navratil, V.**, Rokob, T.A., Hlouchova, K., Rulisek, L., and Konvalinka, J.: Comparison of human glutamate carboxypeptidases II and III reveals their divergent substrate specificities. *FEBS J.* 2016, 283(13):2528-2545. IF = 3.9.
- II. Knedlik T., Vorlova B., **Navratil V.**, Tykvart J., Sedlak F., Vaculin S., Franek M., Sacha P., and Konvalinka J.: Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has a similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII. *FEBS Open Bio* 2017, 7(9):1362-1378. IF = 2.1.
- III. Knedlik T., **Navratil V.**, Vik V., Pacik D., Sacha P., and Konvalinka J.: Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in human blood. *Prostate* 2014, 74(7):768-780. IF = 3.8.
- IV. **Navratil V.**, Schimer J., Tykvart J., Knedlik T., Vik V., Majer P., Konvalinka J., and Sacha P.: DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(2):e10. IF = 10.2.

Publications not included in the thesis

- V. Hlouchova, K., **Navratil, V.**, Tykvar, J., Sacha, P., and Konvalinka, J.: GCPII variants, paralogs and orthologs. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19(9):1316-1322. IF = 3.2.
- VI. Marusincova, H., Husarova, L., Ruzicka, J., Ingr, M., **Navratil, V.**, Bunkova, L., and Koutny, M.: Polyvinyl alcohol biodegradation under denitrifying conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013, 84:21-28. IF = 3.0.
- VII. **Navratil, V.**, Klusak, V., and Rulisek, L.: Theoretical aspects of hydrolysis of peptide bonds by zinc metalloenzymes. *Chemistry* 2013, 19(49):16634-16645. IF = 5.3.
- VIII. Tykvar, J., **Navratil, V.**, Sedlak, F., Corey, E., Colombatti, M., Fracasso, G., Koukolik, F., Barinka, C., Sacha P., and Konvalinka J.: Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Prostate* 2014, 74(16):1674-1690. IF = 3.8.
- IX. Tykvar, J., Barinka, C., Svoboda, M., **Navratil, V.**, Soucek, R., Hubalek, M., Hradilek, M., Sacha, P., Lubkowski, J., and Konvalinka, J.: Structural and biochemical characterization of a novel aminopeptidase from human intestine. *J. Biol. Chem.* 2015, 290(18):11321-11336. IF = 4.1.
- X. Tykvar, J., Schimer, J., Jancarik, A., Barinkova, J., **Navratil, V.**, Starkova, J., Sramkova, K., Konvalinka, J., Majer, P., and Sacha, P.: Design of highly potent urea-based, exosite-binding inhibitors selective for glutamate carboxypeptidase II. *J. Med. Chem.* 2015, 58(10):4357-4363. IF = 6.3.
- XI. Sacha P., Knedlik T., Schimer J., Tykvar J., Parolek J., **Navratil V.**, Dvorakova P., Sedlak F., Ulbrich K., Strohal J., Majer P., Subr V., and Konvalinka J.: iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016, 55(7):2356-2360. IF = 12.0.

Results and discussion

Selective quantification of GCPII and GCPIII in human and mice tissues

There are many reports on GCPII expression in human tissues [6, 10-13], however, only little is known about the expression of human GCPIII [32] or mouse GCPII [15, 35, 38], even though mice have been extensively used to study GCPII function and its therapeutic targeting of GCPII [20, 23, 39-41].

We thus developed several orthogonal methods for selective quantification of GCPII and GCPIII at mRNA and protein level in human and mouse tissues. We first developed selective qRT-PCR assays for human and mouse GCPII and III and determined their amounts in a set of cDNA tissue libraries. We then also exploited the different substrate specificities of both enzymes in the presence of calcium ions for direct quantification of both proteins in tissue homogenates.

We were the first to quantify GCPIII in human tissues at protein level and these results were in an excellent agreement with the qRT-PCR data, which was more sensitive and was thus used for a larger set of tissues. Highest GCPIII levels were in testes, ovary and placenta. Levels of GCPII obtained by the two methods were again in excellent agreement and also with previous studies. The highest GCPII expression was in prostate, kidney, brain and liver.

In mice, only GCPII was detected directly on protein level, whereas both proteins were detected only via qRT-PCR assay. The highest GCPII expression was observed by both methods in kidney, brain and salivary glands, which is in agreement with the tissue expression in human. However, little or no GCPII was detected in prostate and small intestine. This is in line with previous reports [15, 38], but represents a striking difference to human. GCPII may thus not be responsible for the folate absorption in mice, as it is the case in rats [42]. On the other hand, the lack of GCPII expression in mouse prostate does not necessarily mean a different function of GCPII in mice. GCPII is secreted to the seminal fluid in humans [12] and we have found GCPII expression in mouse testis (in contrast to human), where it may be also secreted to the seminal fluid.

Results are summarized in publications I and II.

My contribution: I developed qRT-PCR assays and quantified GCPII and GCPIII in human and mice tissues and tissue cDNA libraries.

GCPII quantification in blood and its role as PCa serum marker

GCPII is extremely promising target for targeted imaging and targeted therapy of prostate carcinoma (PCa) [43-45] and it has been shown that it may be also used as a serum marker of PCa [18]. However, suitable methods for validating this hypothesis are missing.

We have thus developed several orthogonal assays for the detection of GCPII in human blood. First, we validated that the NAAG cleaving activity is in humans unique to GCPII and used this fact to quantify GCPII in blood via a radioenzymatic assay. At the same time, we also developed a sandwich ELISA to detect GCPII in human blood. Later, we developed also our novel proprietary DIANA assay (described in more detail later). Consequently, we were able to quantify GCPII in human samples by three orthogonal assays.

First, all three methods were in excellent agreement and showed that GCPII levels in blood are about 0.1-10 ng/ml in healthy subjects, which is much less than previously reported. We then used ELISA and DIANA to determine GCPII levels in a small set of clinical samples (n=36) and we have seen virtually no difference between PCa and healthy individuals (**Fig. 1**), which suggest that GCPII is not useful as PCa blood serum marker.

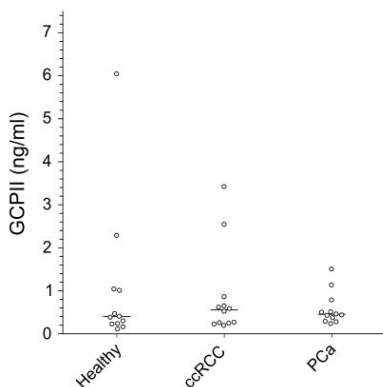


Figure 1: GCPII serum levels in healthy and diseased state.

Plot of GCPII serum levels determined by DIANA in samples from 12 healthy males, 12 males with histologically proven PCa and 10 males and 2 females with histologically proven clear cell renal carcinoma (ccRCC). Horizontal lines are median concentrations.

To confirm that GCPII is not elevated in serum in PCa, GCPII levels were determined by the radioenzymatic assay and ELISA in 110 individuals approx. evenly distributed in several groups of subjects with conditions: localized PCa, generalized PCa, benign prostate hyperplasia, patients after prostatectomy with

undetectable prostate specific antigen (PSA) levels, healthy men and healthy women. We determined also PSA, which is currently used PCa marker, in most of the samples. Even though we have seen tremendous differences in PSA levels between the groups, we did not observe significant difference in GCPII levels between any of the groups, which confirmed, that GCPII serum levels are not useful as PCa marker at all. As we have not seen lowering of GCPII level in patients after radical prostatectomy, we suggest that most of serum GCPII originate from an extraprostatic source (data mentioned in his paragraph are not part of the thesis).

Results are summarized in publication III and IV.

My contribution: I did proof of principle experiments for radioenzymatic assay, developed ELISA and DIANA assays and determined GCPII blood levels in the first set of healthy volunteers and PCa patients.

DIANA assay for detection of enzymes and screening for their inhibitors

In publication IV, we reported the development of DIANA assay suitable for enzyme detection and screening of enzyme inhibitors. This assay is analogous to the immuno-PCR assay described in [46], in which the target protein is captured by an immobilized antibody and then probed by another DNA-linked antibody, which is detected in qPCR. In DIANA assay, the DNA-linked antibody has been replaced by detection probe consisting of a DNA oligonucleotide covalently linked to a small molecule that binds to the active site of a target enzyme (**Fig. 2**).

We developed DIANA assay for GCPII, GCPIII and CAIX, which is also a potential drug target and cancer marker. We showed that DIANA can detect subfemtogram amount of the target enzyme in complex biological matrices, such as blood serum and with a linear range of five to six orders of magnitude (**Fig. 2**). We also showed that its dynamic range and the binding of the probe to the enzyme active site can be exploited to determine the inhibition potency of tested compound from a single tested concentration, which is unique to this method. Moreover, its selectivity enabled us to test inhibitors even with unpurified protein endogenously present in human serum.

My contribution: I designed the study and did majority of the experiments.

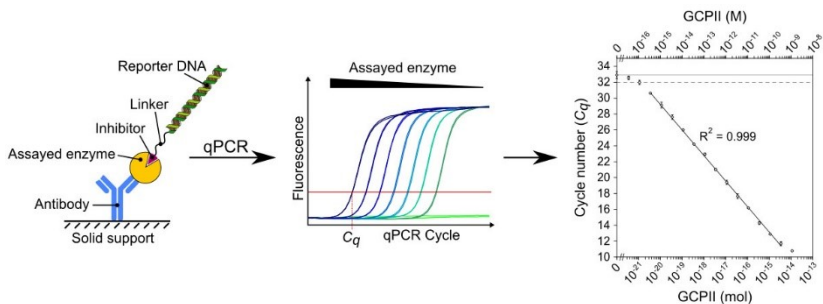


Figure 2: Schematic representation of enzyme detection by DIANA.

A covalent conjugate of an oligonucleotide (marked as reporter DNA) and low molecular weight competitive inhibitor of the target enzyme is used as a detection probe. This probe binds to the active site of the target enzyme, which has been captured on the solid support by an immobilized antibody. The amount of detection probe bound to the enzyme is detected by qPCR in terms of the threshold cycles (C_q), which are indirectly proportional to the logarithm of its concentration.

Conclusions

We developed radioenzymatic and qRT-PCR assays for selective detection of GCPII and GCPIII in human and mice tissues. We did the first comparative study of expression of both proteins in a set of human and mice tissues. We have found significant differences in GCPII expression between human and mouse, most notably in prostate, testis and small intestine.

We developed several orthogonal assays for detection of GCPII in human blood serum. We showed that GCPII is present in blood in approximately 100-fold lower concentration than previously reported. We also showed that GCPII is not elevated in blood of PCa patients and is not useful as PCa marker. PSA thus remains by far the best serum marker for PCa diagnosis.

Finally, we also developed novel proprietary DIANA assay suitable for enzyme detection and screening for enzyme inhibitors. We showed that it can be used for ultrasensitive enzyme detection with broad linear range and that inhibition potency of a tested compound can be determined from a single well measurement. This assay proved as extraordinarily robust assay for screening of inhibitors, showing negligible false negative and false positive rate. We believe that it will become a widely used method both in academic environment and in industrial applications.

References

1. Chandler, C.J., Wang, T.T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1986. **261**(2):928-933.
2. Robinson, M.B., Blakely, R.D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1987. **262**(30):14498-14506.
3. Horoszewicz, J.S., Kawinski, E., *et al.*, *Anticancer Res.*, 1987. **7**(5):927-936.
4. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1996. **2**(9):1445-1451.
5. Carter, R.E., Feldman, A.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996. **93**(2):749-753.
6. Rovenska, M., Hlouchova, K., *et al.*, *Prostate*, 2008. **68**(2):171-182.
7. Cunha, A.C., Weigle, B., *et al.*, *Cancer Lett.*, 2006. **236**(2):229-238.
8. Israeli, R.S., Powell, C.T., *et al.*, *Cancer Res.*, 1994. **54**(7):1807-1811.
9. O'Keefe, D.S., Bacich, D.J., *et al.*, *Prostate*, 2004. **58**(2):200-210.
10. Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., *et al.*, *World J. Surg.*, 2006. **30**(4):628-636.
11. Silver, D.A., Pellicer, I., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1997. **3**(1):81-85.
12. Sokoloff, R.L., Norton, K.C., *et al.*, *Prostate*, 2000. **43**(2):150-157.
13. Chang, S.S., Reuter, V.E., *et al.*, *Cancer Res.*, 1999. **59**(13):3192-3198.
14. Liu, H., Moy, P., *et al.*, *Cancer Res.*, 1997. **57**(17):3629-3634.
15. Huang, X., Bennett, M., *et al.*, *Prostate*, 2004. **61**(1):1-11.
16. Sacha, P., Zamecnik, J., *et al.*, *Neuroscience*, 2007. **144**(4):1361-1372.
17. Troyer, J.K., Beckett, M.L., *et al.*, *Int. J. Cancer.*, 1995. **62**(5):552-558.
18. Xiao, Z., Adam, B.L., *et al.*, *Cancer Res.*, 2001. **61**(16):6029-6033.
19. Taneja, S.S., *Rev. Urol.*, 2004. **6 Suppl 10**:S19-28.
20. Weineisen, M., Schottelius, M., *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2015. **56**(8):1169-1176.
21. Heck, M.M., Retz, M., *et al.*, *J. Urology*, 2016. **196**(2):382-390.
22. Slusher, B.S., Vornov, J.J., *et al.*, *Nat. Med.*, 1999. **5**(12):1396-1402.
23. Bacich, D.J., Wozniak, K.M., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2005. **95**(2):314-323.
24. Olszewski, R.T., Bzdega, T., *et al.*, *Schizophr. Res.*, 2012. **136**(1-3):160-161.
25. Rais, R., Jiang, W., *et al.*, *JCI Insight*, 2016. **1**(12).
26. Date, A.A., Rais, R., *et al.*, *J. Control. Release*, 2017. **263**:132-138.
27. Jackson, P.F., Cole, D.C., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996. **39**(2):619-622.
28. Kozikowski, A.P., Nan, F., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2001. **44**(3):298-301.
29. Majer, P., Jackson, P.F., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003. **46**(10):1989-1996.
30. van der Post, J.P., de Visser, S.J., *et al.*, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 2005. **60**(2):128-136.
31. Rais, R., Wozniak, K., *et al.*, *Plos One*, 2015. **10**(7).
32. Pangalos, M.N., Neefs, J.M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(13):8470-8483.
33. Bzdega, T., Crowe, S.L., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2004. **89**(3):627-635.
34. Hlouchova, K., Barinka, C., *et al.*, *J. Neurochem.*, 2007. **101**(3):682-696.
35. Collard, F., Vertommen, D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2011. **286**(44):38220-38230.
36. Miyake, M., Innami, T., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1983. **760**(2):206-214.
37. Asakura, M., Nagahashi, Y., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995. **1250**(1):35-42.
38. Bacich, D.J., Pinto, J.T., *et al.*, *Mamm. Genome*, 2001. **12**(2):117-123.
39. Benesova, M., Bauder-Wust, U., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2016. **59**(5):1761-1775.
40. Cao, Y., Gao, Y., *et al.*, *BMC Neurosci.*, 2016. **17**:15.
41. Vornov, J.J., Hollinger, K.R., *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 2016. **76**:215-255.
42. Shafizadeh, T.B. and Halsted, C.H., *J. Nutr.*, 2007. **137**(5):1149-1153.
43. Emmett, L., Willowson, K., *et al.*, *J. Med. Radiat. Sci.*, 2017. **64**(1):52-60.
44. Evans, J.D., Jethwa, K.R., *et al.*, *Pract. Radiat. Oncol.*, 2018. **8**(1):28-39.
45. Kopka, K., Benesova, M., *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2017. **58**(Suppl 2):17S-26S.
46. Hendrickson, E.R., Truby, T.M., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1995. **23**(3):522-529.

Curriculum vitae

Václav Navrátil

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR (IOCB AS CR)

Email: vaclav.navratil@uochb.cas.cz

Motivation

Translating science into applications having impact on our lives.

Work experience

Since 2016

Project leader at IOCB AS CR

Leading development and commercialization of the proprietary technology DIANA, which is a unique solution for ultrasensitive enzyme quantification and screening of enzyme inhibitors that I have developed during my previous work.

Education

2007 – 2009

M.Sc. in Theoretical chemistry (Modelling chemical properties of nano- and biostructures), Faculty of Science, Charles University in Prague; diploma thesis “*Study of variant forms of human carboxypeptidase II by combination of experimental and theoretical methods*” supervised by Jan Konvalinka and Lubomir Rulisek at IOCB AS CR.

2004 – 2007

B.Sc. in Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague; bachelor thesis “*Human glutamate carboxypeptidase II and its paralogues*” supervised by Jan Konvalinka at IOCB AS CR.

Publications and patents

Co-author of 11 publications in peer-reviewed impacted international journals.

Co-inventor of several families of international pending patents.

Selected presentations on conferences and conventions

BioVaria 2016 in Munich, GER (oral presentation on DIANA technology)

BIO Convention 2016 in San Francisco, USA (presentation of DIANA technology)

Basel Life Science Week 2016, SUI (oral presentation on DIANA technology)

BioSpot 2017 in Prague, CZE (oral presentation on DIANA technology)

International research experience

2015 Two-week stay at Johns Hopkins University in Baltimore, MD, USA

2017 Two-week stay at a global pharma company, Japan

Language skills

Native czech and german, fluent english