Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Charakterizace rekombinantní myší glutamátkarboxypeptidasy III

Karolína Janoušková

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:
doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 28. 5. 2019 …….

Karolína Janoušková

Poděkování

Děkuji svému školiteli a vedoucímu laboratoře doc. RNDr. Janovi Konvalinkovi, CSc., za vedení práce a umožnění zapojit se do tohoto projektu, RNDr. Pavlovi Šáchovi, Ph.D., za mnohé konzultace, Mgr. Barboře Vorlové, Ph.D., za uvedení do světa experimentů, MUDr. Františkovi Sedlákovi za pomoc při plánování experimentů, Ing. Karolíně Šrámkové za pomoc v laboratoři, Janě Starkové za práci s buněčnými kulturami a celému kolektivu skupiny Proteas lidských patogenů za příjemnou laboratorní atmosféru.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým, kteří mě během studia a vypracovávání bakalářské práce podporovali.

Abstrakt

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, PSMA, NAALADasa) je transmembránová metalopeptidasa a díky štěpení specifických substrátů β-citryl-L-glutamátu (BCG), *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG) a polyglutamylovaných folátů (Pte-Glu_n) je studována jako potenciální terapeutický cíl. Enzymy, které by mohly kompenzovat enzymovou aktivitu a funkce GCPII, jsou proto rovněž relevantními cíli enzymologického výzkumu. Jedním z homologů GCPII s podobnou enzymovou aktivitou je glutamátkarboxypeptidasa III (GCPIII, NAALADasa II).

U rekombinantní myší GCPIII ještě nebyly stanoveny kinetické parametry K_M a k_{cat} popisující její aktivitu. Myší GCPIII je důležité kineticky charakterizovat a porovnat s lidským ortologem, aby bylo zjištěno, jestli je enzymová aktivita tohoto enzymu v myším modelu srovnatelná se situací u člověka.

Rekombinantní myší GCPIII byla kineticky charakterizována. Kinetické parametry rekombinantní myší GCPIII pro substráty NAAG a BCG byly změřeny metodou štěpení radioaktivně značeného substrátu. Kinetika reakce pro substrát Pte-Glu_2 byla analyzována pomocí HPLC.

Z hlediska štěpení NAAGu je lidská GCPIII účinnější než myší ortolog, v případě substrátu BCG jsou enzymy srovnatelné. Tyto výsledky nás posunou blíže k pochopení role GCPIII v nejpoužívanějším zvířecím modelu.

Klíčová slova: glutamátkarboxypeptidasa II, glutamátkarboxypeptidasa III, rekombinantní protein, substrátová specifita, NAAG, BCG, enzymová kinetika

Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII, PSMA, NAALADase) is transmembrane metalopeptidase and due to cleavage of substrates β-citryl-L-glutamate (BCG), *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) and polyglutamylated folates (Pte-Glu_n) is being studied as potential therapeutic target. Enzymes, which could compensate for enzyme activity and functions of GCPII, are thus relevant targets of enzymology as well. One of GCPII´s homologs with similar enzyme activity is mouse glutamate carboxypeptidase III (GCPIII, NAALADase II).

Enzymatic cleavage has not been determined using recombinant mouse GCPIII yet. It is important to kinetically characterize mouse GCPIII so that we can compare enzyme activity with human ortolog. Then we can find out whether mouse model is comparable with human.

Recombinant mouse GCPIII was kinetically characterized. Kinetic parameters (K_M, k_{cat}) for recombinant mouse GCPIII were measured for substrates NAAG and BCG using radioactive assay. Experiments with the substrate Pte-Glu_2 were analyzed using HPLC method.

Although human GCPIII is more effective than mouse ortolog at clearage of NAAG, both enzymes are comparable during hydrolysis of BCG. Those results can contribute to better understanding of the role of GCPIII in the most commonly used animal model.

Keywords: glutamate carboxypeptidase II, glutamate carboxypeptidase III, recombinant protein, substrate specificity, NAAG, BCG, enzyme kinetics

Obsah

1 Teoretická část 1
1.1 Glutamátkarboxypeptidasa II 1
1.1.1 Struktura proteinu GCPII 1
1.1.2 Názvosloví GCPII 3
1.1.3 Exprese GCPII 3
1.1.4 Enzymová aktivita GCPII a její fyziologická funkce 3
1.1.5 Inhibitory GCPII 5
1.1.6 Myši s vyřazeným genem pro GCPII 5
1.1.7 Homology GCPII 6
1.2 Glutamátkarboxypeptidasa III 7
1.2.1 Enzymová aktivita 7
1.3 Porovnání GCPII a GCPIII 8
1.3.1 Struktura proteinů 8
1.3.2 Enzymové reakce 9
1.3.3 Závislost enzymové aktivity na pH a na koncentraci NaCl 10
1.3.4 Exprese v tkáních 11
1.3.5 Vliv dvouvazných kationtů kovů na aktivitu GCPII a GCPIII 12
1.3.6 Kinetické parametry obou enzymů 12
2 Cíle práce 14
3 Praktická část 15
3.1 Materiál 15
3.1.1 Přístroje a pomůcky 15
3.1.2 Chemikálie 16
3.1.3 Další 17
3.2 Metody 19
3.2.1 Příprava rekombinantní ektodomény myší GCPIII 19
3.2.2 SDS-PAGE 23
3.2.3 Barvení stříbrem 23
3.2.4 Zahušťování proteinu na filtru Amicon 24
3.2.5 Gelová permeační chromatografie (GPC) 24
3.2.6 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG 25
3.2.7 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG 27
3.2.8 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu_2 27
4 Výsledky 30
4.1 Příprava proteinu mGCPIII 30
4.2 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG 33
4.2.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu mGCPIII 33

4.2.2 Vzájemné porovnání enzymatické aktivity dimerní a monomerní formy proteinu mGCPIII 33
4.3 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG 35
4.4 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu_2 36
5 Diskuze 38
5.1 Příprava proteinu mGCPIII 38
5.2 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG 38
5.3 Vzájemné porovnání enzymatické aktivity dimerní a monomerní formy proteinu mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG 40
5.4 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG 40
5.5 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu_2 41
6 Závěr 42
7 Seznam zkratek 43
8 Reference 45

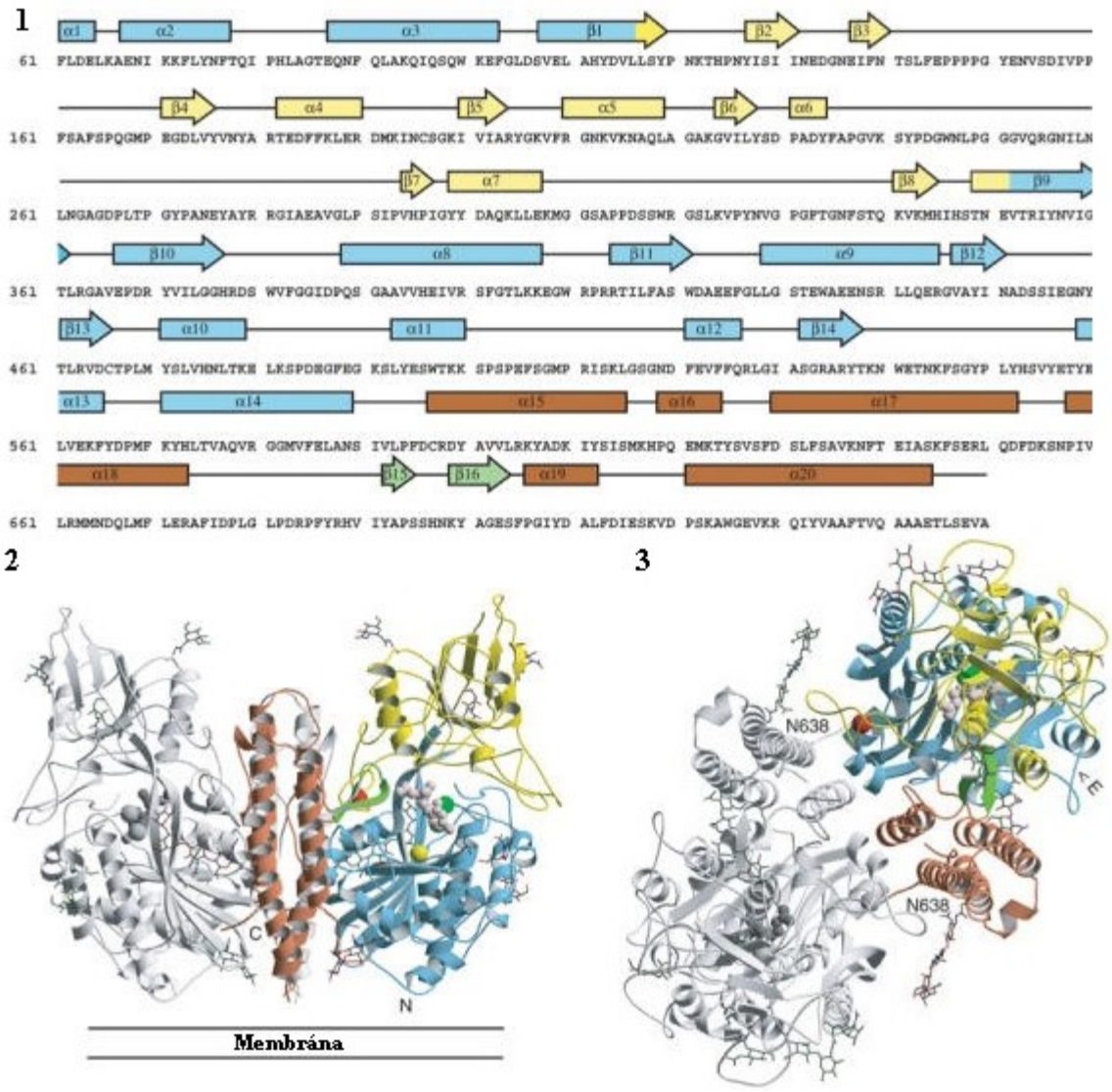
1 Teoretická část

1.1 Glutamátkarboxypeptidasa II

1.1.1 Struktura proteinu GCPII

Glutamátkarboxypeptidasa II, zkráceně GCPII (EC 3.4.17.21), je homodimerní metalopeptidasa patřící do podrodiny M28B (ID M28.010). Monomer je složen ze 750 aminokyselin a ve formě homodimeru má zdánlivou molekulovou hmotnost 200 kDa. Aby byl enzym aktivní, vyžaduje 10 N-glykosylací[1, 2].

Struktura dimeru (*obr*: *1*) obsahuje 2 atomy zinku v aktivních místech. Jedná se o transmembránový glykoprotein II. typu, což znamená, že umístění N-konce je v cytosolu a C-koncové domény jsou v extracelulárním prostoru[3, 4]. Extracelulární část je mnohem větší než intracelulární a má enzymovou aktivitu.



Obrázek 1. **Zobrazení primární a sekundární struktury GCPII a její 3D struktura. 1: Primární a sekundární struktura GCPII s barevně vyznačenými doménami. 2,3: GCPII je homodimerní protein, každá z podjednotek je tvořena třemi doménami – proteasová doména (modrá), apikální doména (žlutá) a C-koncová doména (hnědá). Dvoujaderný zinkový klastr v aktivním místě je vyznačen zelenými kuličkami, Ca^{2+} ion je znázorněn červenou kuličkou a Cl^{-} ion žlutou. Na struktuře je také znázorněn inhibitor GCPI-18431 formou béžových kuliček. Upraveno podle[5].**

GCPII je kódována genem Folh1 lokalizovaným na kratším ramínku chromozomu 11 (p11,2)[6]. Folh1 má velikost cca 62 kbp a skládá se z 19 exonů a 18 intronů. Součástí intronu 3 je enhancer, který reguluje expresi genu v prostatě[7].

1.1.2 Názvosloví GCPII

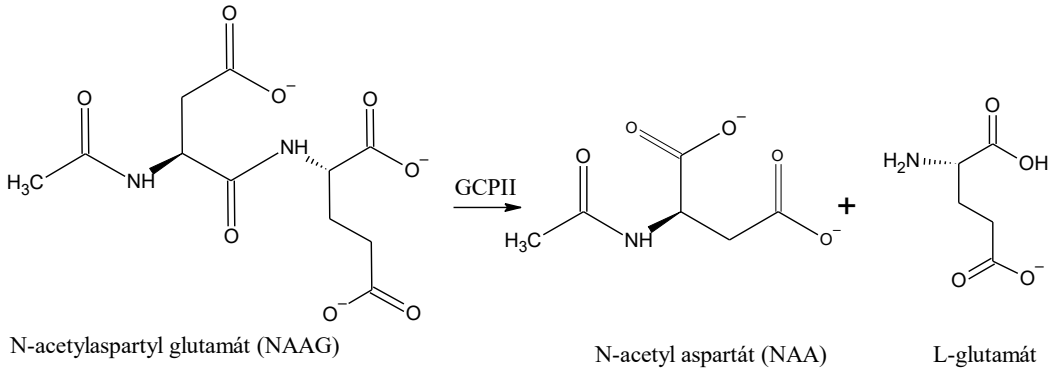
GCPII je známa pod zkratkou PSMA (prostate-specific membrane antigen) a je studována jako slibný marker nádoru prostaty[8, 9], jelikož její exprese je zvýšena při tomto onemocnění[10-15]. Enzymově aktivní GCPII bylaa v roce 1987 izolován z potkaních mozků a byla pojmenována NAALADasa (N-acetylated α-linked acidic dipeptidase) podle hydrolytické aktivity[16]. V roce 1993 byl vyizolován lidský ortolog a podle tkáně, ze které byl získán, byl nezávisle pojmenován PSM/PSMA (prostate-specific membrane antigen)[17, 18]. Protein je též označován jako FOLH1 (folyl-poly-γ-glutamate hydrolase 1) nebo FGCP (folyl-poly-γ-glutamate carboxypeptidase) podle schopnosti štěpit polyglutamylované foláty[19].

1.1.3 Exprese GCPII

GCPII je exprimována v lidském organismu především v centrálním nervovém systému, tenkém střevě a v prostatě[17, 20-23]. Dále je exprimována v nádorové neovaskulatuře a v nádorech prostaty, nicméně fyziologická role v těchto tkáních ještě nebyla objasněna.

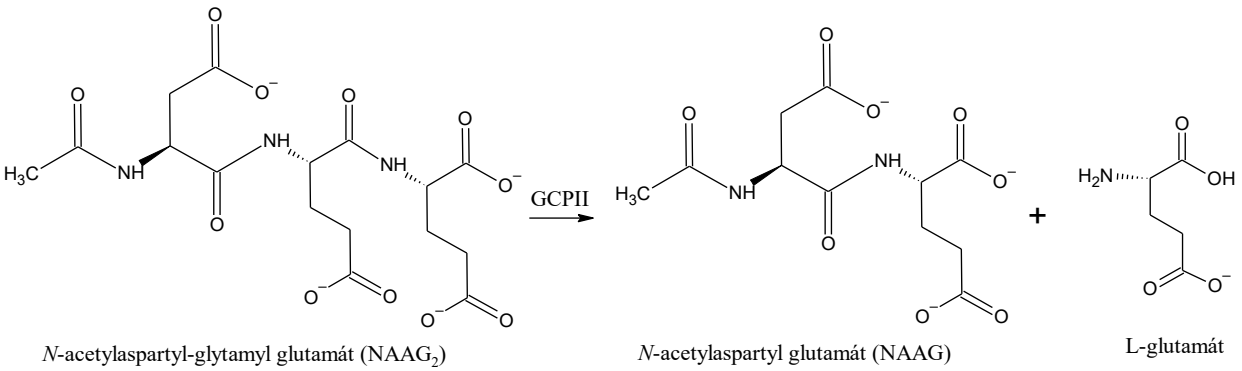
1.1.4 Enzymová aktivita GCPII a její fyziologická funkce

Fyziologickou funkcí GCPII v mozku je degradace nejběžnějšího peptidového neurotransmiteru *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG)[1, 16] (*obr. 2*).



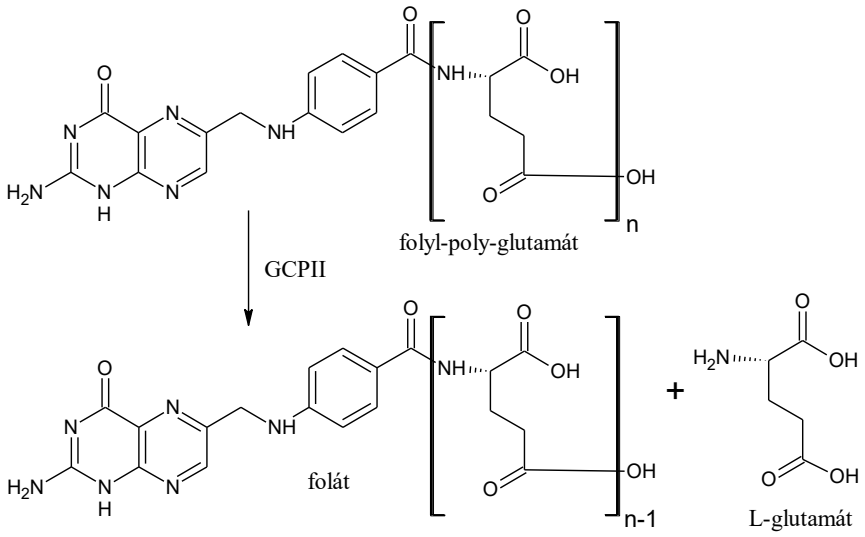
***Obrázek 2*. Hydrolýza *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu pomocí GCPII za uvolnění L-glutamátu.**

GCPII také štěpí *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamát ($NAAG_2$) na NAAG a L-glutamát[24] (*obr. 3*).



***Obrázek 3*. Hydrolýza *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamátu pomocí GCPII za uvolnění L-glutamátu.**

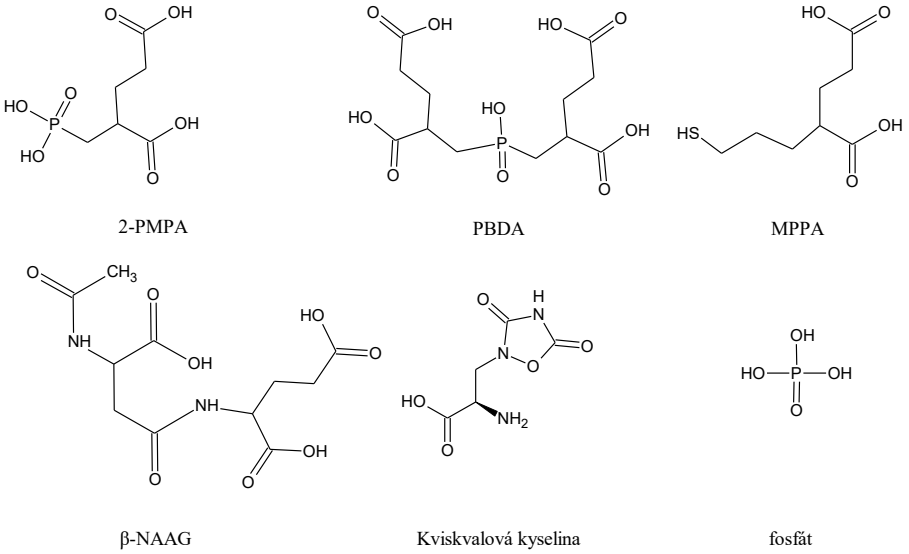
Další funkcí GCPII je odštěpování L-glutamátu z C-konce poly-gama-glutamylovaných folátů – $FolGlu_n$ (pteroyl-L-glutamátu; $PteGlu_n$), prekurzoru vitamínu B9, umožňující absorpci volných folátů ve střevě[19, 25, 26] (*obr. 4*).



***Obrázek 4*. Hydrolýza peptidové vazby folyl-poly-γ-glutamátu na volný folát.**

Enzym se schopností štěpit $FolGlu_n$ byl izolován již v roce 1986[19], nicméně fakt, že se jedná o protein označovaný jako PSMA, byl zjištěn až roku 1996[26]. Množství jmen pro tento enzym je způsobeno nezávislými objevy individuálních enzymových aktivit.

1.1.5 Inhibitory GCPII



Inhibitor	K_I [nM]
2-PMPA	0,3
PBDA	7
MPPA	90
β-NAAG	700
kviskvalová kyselina	1 900
anorganický fosfát	100 000

***Obrázek 5*. Chemické struktury inhibitorů GCPII s uvedenými hodnotami K_I. Inhibitory jsou seřazeny podle vzrůstající hodnoty K_I – jsou to 2-fosfonomethyl-pentandiová kyselina (2-PMPA), 4,4´-fosfincobisbutan-1,3-dikarboxylová kyselina (PBDA), 2-(3-merkaptopropyl)pentandiová kyselina (MPPA), β-NAAG, 2-amino-3-(3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidin-2-yl)propanová kyselina (kyselina kviskvalová), fosfát. Upraveno podle[4].**

Selektivní GCPII inhibitory 2-fosfonomethyl-pentandiová kyselina (2-PMPA) a 4,4´-fosfincobisbutan-1,3-dikarboxylová kyselina (PBDA) (*obr. 5*) vedou ke snížení glutamátu v mozku krys a myší a z toho důvodu mají neuroprotektivní efekt, konkrétně v případě mrtvice, neuropatických bolestí a dalších neurodegenerativních chorob[5, 27-30]. Z tohoto důvodu je GCPII studována jako potenciální terapeutický cíl[31-37].

1.1.6 Myši s vyřazeným genem pro GCPII

Pro zjištění, zda je GCPII jediným enzymem, který hydrolyzuje NAAG, bylo potřeba vyřadit gen pro GCPII. Laboratoře, které se pokusily vytvořit myši s vyřazeným genem pro GCPII, se však neshodovaly ve výsledku. Podle jedné laboratoře byla deficience Folh1 genu letální[38, 39], podle dvou jiných nezávislých[40, 41] laboratoří myši po vyřazení genu pro GCPII nevykazovaly žádný výrazný fenotyp. Spoluprací naší laboratoře s laboratoří doc. Sedláčka (Biocev) byly rovněž získány myši s vyřazeným genem pro GCPII, které nevykazovaly letální fenotyp. Jediný znak, kterým se lišily od myší divokého typu, byly zvětšené semenné váčky u starých zvířat[42].

Bacich a kolegové[40] uvádí, že myši s vyřazeným genem pro GCPII vykazují hydrolytickou aktivitu pro NAAG, přestože imunochemicky nebyla detekována GCPII. Nicméně při použití inhibitorů proti GCPII byla reziduální NAAG hydrolytická aktivita inhibována. To značí přítomnost homologu GCPII, který je schopen hydrolyzovat NAAG a tím tuto aktivitu v myších alespoň částečně kompenzovat. V roce 1999 Pangalos a kolegové objevili dvě nové lidské peptidasy blízce příbuzné GCPII, a to NAALADasu II (GCPIII) a NAALADasu L, z nichž NAALADasa II vykazovala hydrolytickou aktivitu pro NAAG[43].

1.1.7 Homology GCPII

Podle Fitche[44] jsou pojmy homologie, paralogie a ortologie definovány takto:

- Homologie je příbuznost dvou znaků, které pocházejí od společného předcházejícího znaku.
- Paralogie je příbuznost dvou homologních znaků pocházející z duplikace genu.
- Ortologie je příbuznost dvou znaků, která vznikla vývojem dvou biologických druhů ze společného předka.

Příkladem paralogu lidské GCPII je lidská GCPIII. Budeme-li studovat myší GCPIII jedná se o ortolog lidské GCPIII.

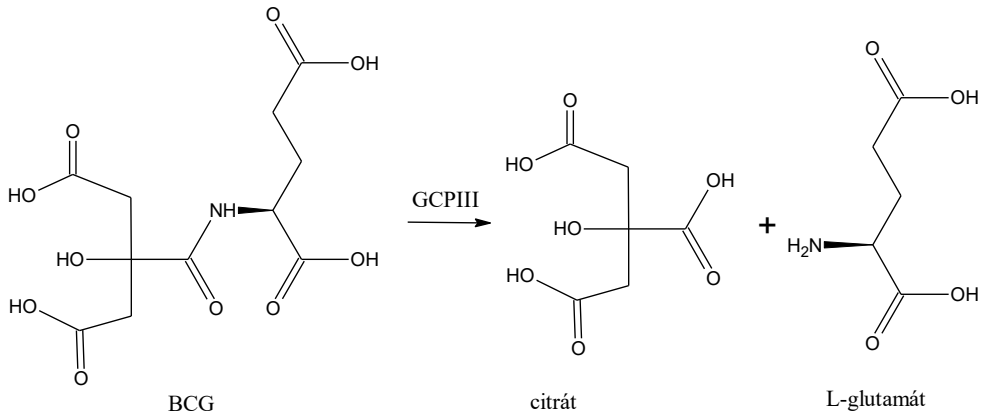
GCP II je studována jako potenciální terapeutický cíl[31-37] (viz *kap.* 1.1.5). Proto jsou její homology, které by mohly kompenzovat její enzymovou aktivitu nebo její další funkce, také relevantními cíli enzymologického výzkumu. Jedním z homologů GCPII je GCPIII.

1.2 Glutamátkarboxypeptidasa III

Glutamátkarboxypeptidasa III, zkráceně GCPIII (ID M28.010)[45], byla objevena v roce 1986 v potkaních varlatech[46] a je známa pod označením NAALADasa II (N-acetylated α-linked acidic dipeptidase II). Předpokládá se, že se jedná o transmembránový protein druhého typu s aminokyselinami 9 – 31 tvořícími transmembránovou část, a doména proteasy je umístěna v extracelulárním prostředí[47]. Karboxypeptidasová aktivita je podmíněna posttranslačními modifikacemi – GCPIII má 7 N-glykosylačních míst[1].

1.2.1 Enzymová aktivita

Do roku 2011 nebyl objeven jiný substrát pro GCPIII než NAAG a $FolGlu_n$, proto byl protein GCPIII znám pouze jako potenciální komplementární enzym pro GCPII. Nicméně poté byl identifikován nový fyziologický substrát pro GCPIII – β-citryl-L-glutamát (BCG), který je GCPIII hydrolyzován na citrát a L-glutamát[48] (*obr. 6*). Je důležité zmínit, že GCPII také štěpí BCG, ale efektivita reakce v přítomnosti GCPII je o 5 řádů nižší než při štěpení GCPIII[49].



***Obrázek 6*. Hydrolýza β-citryl-L-glutamátu (BCG) na citrát a L-glutamát.**

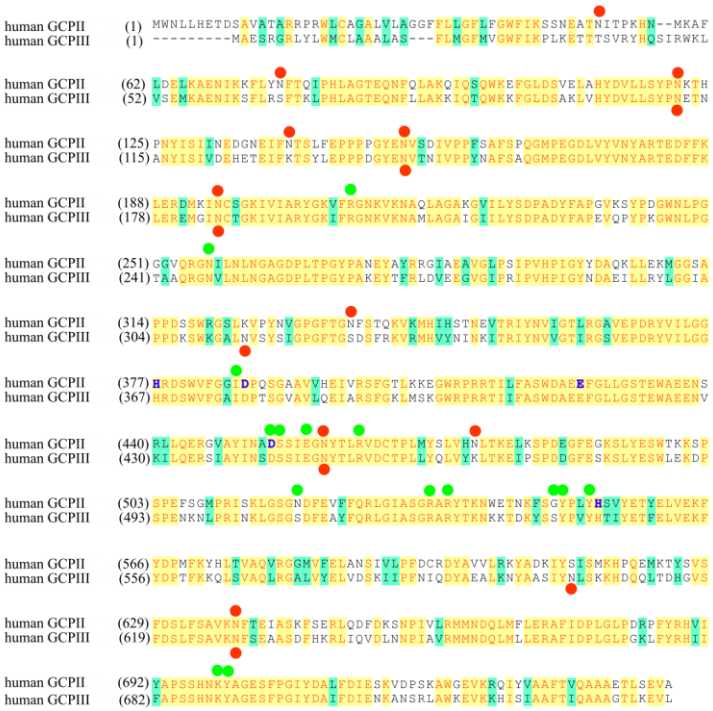
BCG byl poprvé izolován z potkaních mozků v 70. letech 20. století[50]. Následně byl identifikován v potkaních varlatech[46, 51], nicméně funkce BCG je stále neznámá. Jedna z teorií nabízí vysvětlení, že BCG je nízkomolekulární chelator železa a jiných biogenních kovů[52].

Později bylo popsáno i štěpení $NAAG_2$ v přítomnosti GCPIII[24]. Fyziologická funkce GCPIII zůstává neobjasněná.

1.3 Porovnání GCPII a GCPIII

1.3.1 Struktura proteinů

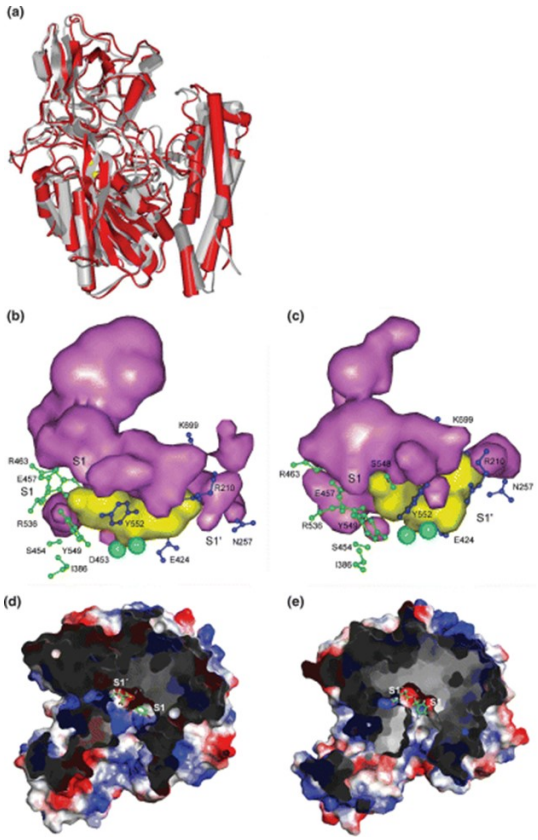
Glutamátkarboxypeptidasa III, vykazuje z 67 % identickou sekvenci jako GCPII a z 81 % podobnost se sekvencí GCPII[43] (*obr. 7*).



***Obrázek 7*. Porovnání sekvencí lidské GCPII a GCPIII. Žlutou barvou je označena shodná sekvence. Zelené kuličky značí předpokládaná místa interakce proteinu s glutamátem (součásti substrátu). Červené kuličky označuje potenciální místa pro N-glykosylaci. Upraveno podle[1].**

Dále má GCPIII téměř identickou 3D strukturu (*obr. 8*) a vykazuje velmi podobnou enzymovou aktivitu[1].

Dutina aktivního místa u GCPII a GCPIII se výrazně liší, hlavně velikostí, tvarem a povrchovým nábojem. Náboj v aktivním místě je důležitý, protože substrát NAAG je záporně nabitý (formální náboj je -3). Porovnáme-li povrchové náboje dutin GCPII a GCPIII, zjistíme, že u obou enzymů převažuje pozitivní náboj, nicméně u GCPII je poměr pozitivního/negativního povrchového náboje 3,6 a u GCPIII pouze 1,7.



***Obrázek 8*. Molekulární model struktury GCPIII a jeho porovnání s GCPII. *Obr. 8a* je 3D zobrazení struktury GCPIII (červeně) na struktuře GCPII (šedě). Atomy zinku jsou vyobrazeny žlutě. *Obr. 8b* a *8c* porovnávají aktivní místa GCPII (*8b*) a GCPIII (*8c*). Žlutou barvou je znázorněn inhibitor 2-(4-jodobenzylfosfonomethyl)-pentandiová kyselina a fialově je zbývající objem dutiny aktivního místa. Je patrné, že objem dutiny aktivního místa GCPIII je výrazně menší než u GCPII, liší se zhruba o 30 %. *Obr. 8d* a *8e* zobrazují rozmístění náboje na GCPII (*8d*) a GCPIII (*8e*). Pozitivně nabitá oblast je vyobrazena modře a negativní červeně. Inhibitor 2-(4-jodobenzylfosfonomethyl)-pentandiová kyselina je umístěn v dutině aktivního místa. Převzato z[1].**

Inhibitory primárně designované pro GCPII vykazují velice podobnou účinnost i proti GCPIII (viz dále). Proto mají velký potenciál uplatnit se pro léčbu chorob spojených s patologickým uvolňováním glutamátu, jelikož mohou blokovat enzymové reakce obou enzymů vedoucí ke tvorbě glutamátu[1].

1.3.2 Enzymové reakce

Bylo zjištěno, že GCPII obsahuje alosterické místo (tzv. „arene binding site exosite“, ABS), které se uplatňuje při štěpení glutamylovaných folátů[25, 53]. Podobná struktura u GCPIII nebyla

nalezena, tím lze vysvětlit, proč GCPII lépe štěpí $FolGlu_{2-6}$. Štěpení $FolGlu_1$ je srovnatelné u obou proteas, protože GCPII nedokáže plně použít ABS pro navázání krátkého substrátu. Dochází k interakci p-aminobenzoové skupiny $FolGlu_1$ s tyrosinem v GCPII a pteridinový kruh interaguje s vedlejším řetězcem argininu v enzymu[25]. Celkem je $FolGlu_1$ vázáno s enzymem dvěma interakcemi.

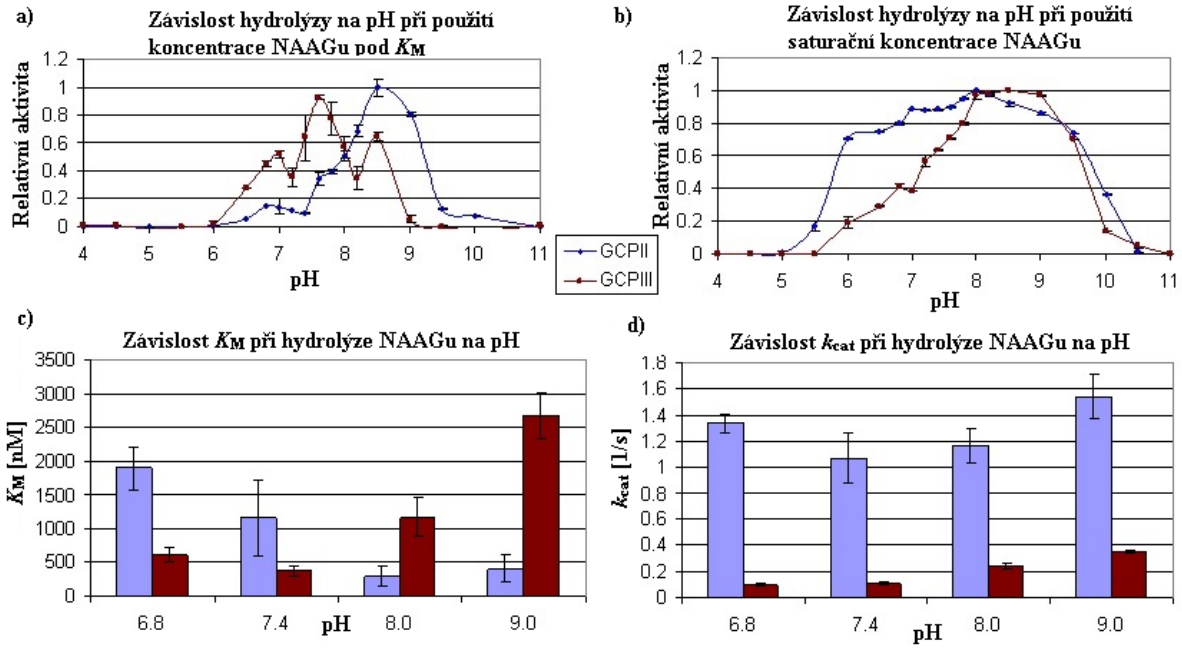
V případě NAAGu tvoří β-karboxylová skupina aspartátu iontovou vazbu s argininy (Arg534, Arg536) a vodíkovou vazbu s argininem Arg519 a dvěma molekulami vody. Kyslík z karbonylové skupiny na acetylu interaguje s vedlejším řetězcem argininů (Arg 536, Arg453, Arg519)[3]. Celkem je NAAG vázán s enzymem osmi interakcemi.

Porovnání vazby BCG do aktivních míst GCPII a GCPIII vysvětluje, proč je vazebná afinita k GCPII malá. Na rozdíl od substrátů NAAG a $FolGlu_n$ má BCG na glutamátu menší elektronovou hustotu a citrát se do aktivního místa GCPII váže pouze jednou interakcí[3, 25]. Slabší interakce s BCG oproti jiným substrátům způsobuje nižší afinitu GCPII k BCG. V případě GCPIII jsou obě karboxylové skupiny citrátu v BCG specificky koordinovány k aminokyselinám v aktivním místě proteinu. Navíc orientace hydroxylové skupiny BCG umožňuje další interakci s glycinem v GCPIII. Výsledkem je vysoká afinita GCPIII k substrátu BCG[49].

1.3.3 Závislost enzymové aktivity na pH a na koncentraci NaCl

Bylo zjištěno (*obr. 9*), že K_M rhGCPII pro NAAG výrazně klesá s růstem pH od pH = 6,8 do pH = 9, zatímco hodnota k_{cat} zůstává v měřeném rozsahu téměř konstantní. Výsledky pro rhGCPIII ukazují, že optimum pro K_M je oproti rhGCPII posunuto více do kyselé oblasti a hodnota k_{cat} roste mezi pH = 6,8 a pH = 9.

Shrneme-li to, platí, že optimum katalytické efektivity rhGCPIII je při pH = 7,4 a pro rhGCPII je hodnota pH posunuta více do bazické oblasti. Dále rhGCPIII je více závislá na pH než rhGCPII a rozdíly v aktivitách těchto dvou metalopeptidas se zvětšují s růstem hodnoty pH[1].



***Obrázek 9*. Závislost hydrolýzy NAAGu na pH pro rhGCPII a rhGCPIII změřená Hlouchovou a kolegy[1]. *Obr. 9a* a *9b* popisují závislost hydrolýzy NAAGu na pH a vzájemně porovnávají tuto závislost pro rhGCPII a rhGCPIII. V případě *9a* je použita 100nM koncentrace substrátu (koncentrace pod K_M), v případě *9b* je použita 100µM koncentrace substrátu (saturační koncentrace). *Obr. 9c* a *9d* popisují závislost kinetických konstant K_M (*9c*) a k_{cat} (*9d*) na pH. Upraveno podle[1].**

K. Hlouchová a kolegové měřili závislost hydrolýzy NAAGu na koncentraci NaCl pro rhGCPII a rhGCPIII[1]. Bylo zjištěno, že rhGCPII lépe váže substrát při vyšších koncentracích soli (50mM NaCl). Oproti tomu rhGCPIII lépe váže substrát při nižších koncentracích soli (20mM NaCl). Výrazná změna u hodnoty k_{cat} je pouze u rhGCPIII, u rhGCPII zůstává její hodnota téměř konstantní. Katalytická efektivita (k_{cat}/K_M) u rhGCPIII koncentrací NaCl není znatelně ovlivněna, zatímco u rhGCPII výrazně roste od 20mM do 150mM NaCl.

1.3.4 Exprese v tkáních

Porovnáme-li expresi proteinů GCPII a GCPIII v lidských tkáních, zjistíme větší množství GCPIII ve varlatech (cca o jeden řád) a menší množství GCPIII v mozku, ledvinách, prostatě a tenkém střevě[49]. Protože ve tkáních, kde dochází ke štěpení NAAGu a $FolGlu_n$ (mozek, tenké střevo), byla stanovena výrazně nižší koncentrace GCPIII než GCPII, předpokládá se, že hlavním substrátem GCPIII je BCG. Předpoklad také potvrzují vyšší koncentrace GCPIII ve varlatech a zvýšená hydrolýza BCG v tomto orgánu[49].

1.3.5 Vliv dvouvazných kationtů kovů na aktivitu GCPII a GCPIII

Již Collard a kolegové v roce 2011[48] uvedli, že zatímco aktivita GCPII není závislá na přítomnosti dvojmocných iontů, účinnost štěpení NAAGu a BCG pomocí GCPIII na jejich přítomnosti závisí. V článku vyslovili hypotézu, že by v přítomnosti dvojmocných iontů docházelo k výměně jednoho ze dvou Zn^{2+} kationtů v aktivním místě danými ionty. Ale tato hypotéza byla později vyvrácena z termodynamického hlediska[49].

Přítomnost Zn^{2+} a Mn^{2+} usnadňuje GCPIII štěpení NAAGu, Zn^{2+} usnadňuje GCPIII štěpení $FolGlu_n$ a přítomnost Ca^{2+} a Mn^{2+} usnadňuje GCPIII štěpení BCG[49]. Navrátil a kolegové v roce 2016 porovnávali aktivitu GCPII a GCPIII v přítomnosti Ca^{2+}, Mn^{2+} a Zn^{2+} při štěpení BCG, NAAG a $FolGlu_1$[49]. Dospěli k závěru, že katalytická efektivita GCPIII je vysoce závislá na přítomnosti kationtů kovů, oproti tomu aktivita GCPII se v přítomnosti/nepřítomnosti iontů neliší. V přítomnosti Ca^{2+} iontů byla efektivita štěpení BCG pomocí GCPIII o dva řády vyšší, Zn^{2+} ionty zvýšily štěpení NAAG a $FolGlu_1$ a Mn^{2+} ionty zvýšily aktivitu GCPIII u všech tří substrátů. Aktivační efekt těchto kationtů je způsoben zvýšením hodnot k_{cat}, zatímco hodnoty K_M zůstaly stejné v porovnání s reakcí bez přídavku iontů[49]. Aktivita GCPIII je tedy ovlivněna přítomností substrátu a lokální koncentrací iontů Ca^{2+} a Zn^{2+} v dané tkáni, optimální jsou koncentrace iontů odpovídající běžným koncentracím v lidské plazmě: Ca^{2+}: 2,5 mM, Zn^{2+}: 0,1 mM. Možným vysvětlením závislosti enzymové aktivity GCPIII na přítomnosti kovů je nižší obsazenost zinečnatých iontů v aktivním místě oproti GCPII[48].

1.3.6 Kinetické parametry obou enzymů

V přiložené *tab. 1* jsou uvedeny publikované hodnoty kinetických parametrů pro enzymy GCPII a GCPIII. První ze zdrojů[1] použil rekombinantní ektodoménu lidské GCPII a GCPIII, podmínky reakce: 0,4 – 400μM substrát, 20mM MOPS, 20mM NaCl, pH 7,4; data byla změřena metodou za využití radioaktivně značeného substrátu. Druhá práce[49] použila jako zdroj lidské GCPII a GCPIII lyzáty z tkání, podmínky reakce: 25mM BTP, pH 7,5, 2,5mM Ca^{2+} a 0,1mM Zn^{2+} (protože v publikaci byly uvedeny jen hodnoty katalytické efektivity k_{cat}/K_M, byly ostatní hodnoty odečteny z grafu uvedeného v článku a mohou být nepřesné). Měření kinetiky bylo provedeno HPLC metodou. Třetí zdroj[54] použil rekombinantní ektodoménu myší a lidské GCPII. Kinetické parametry byly stanoveny radioaktivní metodou (pro substrát NAAG),

podmínky reakce: 20mM NaCl, 20mM MOPS, pH 7,4; a HPLC metodou (pro substrát Pte-Glu_2), podmínky reakce: 25mM BTP, 150mM NaCl, 0,001% (w/w) $C_{12}E_8$, pH 7,4.

***Tabulka 1*. Kinetické parametry GCPII a GCPIII pro substráty NAAG a BCG**

Protein	K_M **[nM]**	k_{cat} **[1/s]**	k_{cat}/K_M **[1/sM]**	**Substrát**	**Zdroj**
rhGCPII	1200 ± 500	1,1 ± 0,2	$(9,3 \pm 4,9) \cdot 10^5$	NAAG	*1*
rhGCPIII	370 ± 70	0,11 ± 0,01	$(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^5$		*1*
GCPIII	500	0,08	$2,16 \cdot 10^5$		*49*
GCPIII, Zn^{2+}	100	0,5	$2,27 \cdot 10^6$		*49*
rmGCPII	1900 ± 100	1,44 ± 0,02	$(7,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$		*54*
rhGCPII	550 ± 60	1,45 ± 0,04	$(2,65 \pm 0,07) \cdot 10^6$		*54*
rmGCPII	290 ± 20	3,63 ± 0,09	$(1,26 \pm 0,08) \cdot 10^7$	Pte-Glu_2	*54*
rhGCPII	39 ± 2	5,09 ± 0,09	$(1,32 \pm 8) \cdot 10^8$		*54*
GCPII	7000	0,0008	$1,7 \cdot 10^2$	BCG	*49*
GCPIII	300	0,05	$1,8 \cdot 10^5$		*49*
GCPIII, Ca^{2+}	1000	12	$1,33 \cdot 10^7$		*49*

Porovnáme-li katalytickou účinnost reakcí, tak GCPII štěpí NAAG a $FolGlu_1$ o dva řády lépe než GCPIII a GCPIII štěpí BCG s účinností o 5 řádů vyšší než GCPII[49].

2 Cíle práce

- Připravit rekombinantní ektodoménu myší glutamátkarboxypeptidasy III.
- Purifikovat tento protein z média pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie.
- Změřit enzymovou aktivitu tohoto myšího proteinu s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG, tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG a Pte-Glu_2 a určit kinetické parametry štěpení.
- Pomocí kinetiky s použitím [^{3}H]NAAG porovnat aktivitu dimerní a monomerní formy myší glutamátkarboxypeptidasy III.

3 Praktická část

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje a pomůcky

pH-metr: 9450 pH meter, Unicam (UK)

spektrofotometr: NanoDrop ND_1000, Thermo Scientific (USA)

laboratorní váhy:

- XA 110/X, RADWAG (Polsko)
- PLS 4000-2, KERN & Sohn GmpH (SRN)
- EK-400H, A&D Engineering, Inc. (USA)

vodní lázeň: Grant Instruments Ltd. (UK)

vertikální polyakrylamidová elektroforéza: Bio-Rad (USA)

inkubátor: Innova44, New Brunswick Scientific (USA)

centrifugy:

- Biofuge Pico, Heraeus Instruments (SRN)
- Allegra X-15R, Beckman Coulter (USA)
- Megafuge 2,0R, Heraeus Instruments (SRN)
- Centifuge 5415R, Eppendorf (SRN)
- Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific (USA)
- Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments (SRN)
- Sorvall Evolution RC, Thermo Scientific (USA)

laminární box: Euroflow Serie, typ EF/S, Telstar (Španělsko)

scintilační kapalinový spektrometr: Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer (USA)

počítání buněk: Countess, Invitrogen (USA)

zahušťovací přístroj: Labscale^{TM} Tangential Flow Filtration System, Millipore (USA)

ultrazvuk: S 30 Elmasonic (SRN)

FPLC: Äkta Purifier, GE Healthcare Services (Švédsko)

UPLC: 1200 Series UPLC, Agilent Technologies (USA)

vortex: MX-S, Dragonlab (Čína)

pipety:

- REPETMAN Electronic Pipette, Gilson (USA)
- 12-channel pipette 20 - 200 µl C200-12, Capp (SRN)
- Pipetman Neo Multichannel (12 channels, 2 – 20 µl), Gilson (USA)
- Pipetman L (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml), Gilson (USA)

3.1.2 Chemikálie

[^{3}H]BCG (tritiovaný β-citryl-L-glutamát)	Elbert, T.; (ÚOCHB)
[^{3}H]NAAG (tritiovaný *N*-acetyl-α-L-aspartyl-L-glutamát)	Perkin Elmer
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
akrylamid	Sigma-Aldrich
BCG (β-citryl-L-glutamát)	Schimer, J.; (ÚOCHB)
Biolock	IBA
blasticidin	Invitrogen
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
BTP (BIS-TRIS propan)	Sigma-Aldrich
$C_{12}E_8$ (octaethylenglykolmonododecyl ether)	Affymetrix
desthiobiotin	Sigma-Aldrich
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
dodecylsulfát sodný	Sigma-Aldrich
dusičnan stříbrný	Lachema
ethanol	Penta
FBS (fetální bovinní sérum)	Gibco
formaldehyd	Penta
glukosa	Lachema
glycerol	Penta
glycin	Duchefa
HABA (4´-hydroxyazobenzen-2-karboxylová kyselina)	Sigma-Aldrich
hydroxid sodný	Penta
chlorid sodný	Penta
chlorid vápenatý	Lach-Ner
isopropanol	Penta
kyselina chlorovodíková	Penta
kyselina mravenčí	Lachema
kyselina octová	Penta
lipidový koncentrát	Life Technologies
methanol	Penta
N,N'-methylen-bis(akrylamid)	USB

NAAG (*N*-acetyl-L-aspartyl-α-L-glutamát)	Sigma-Aldrich
pentahydrát thiosíranu sodného	Penta
peroxodisíran amonný	Serva
Pte-Glu_2	Schircks laboratories
scintilační roztok Rotiszint®Eco-Plus	Roth
síran měďnatý	Lachema
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Fluka
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	USB
Tween 20 (polyoxyethylen sorbitan monolaurate)	USB
uhličitan sodný	Penta

3.1.3 Další

Buněčná linie: *Drosophila* Schneider's S2 cells, Invitrogen (USA)

Kultivační médium: SF900II, Gibco (USA)

Standardy molekulových hmotností proteinů:

- All blue standard, Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad (USA)

Vektory:

- pMTBipSLINTagmEXSTII (Knedlík T., 2017)
- pCoBLAST, Invitrogen (USA)

Enzymy:

- mGCPIII (Vorlová B., 2015)
- hGCPII (Tykvart J., 2013)

Potřeby pro chromatografii:

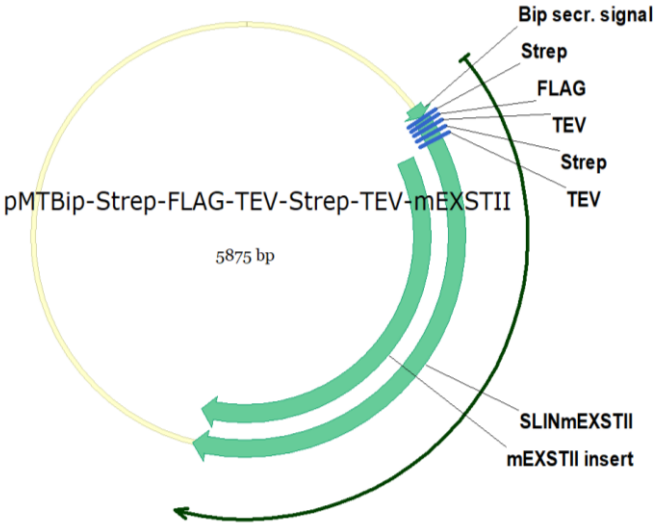
- AG1-X resin, Bio-Rad (USA)
- Kolona HiLoad™ Superdex™ 200 10/300 GL, GE-Healthcare (USA)
- Kolona C18 Acquity UPLC HSS T3 2,1 x 100 mm, Waters (USA)
- Membrána na zahuštění proteinu: Pellicon XL Biomax50 cassette, Millipore (USA)
- Streptavidin Mutein Matrix™, Roche (Švýcarsko)
- Pasteurovy pipety, P-lab (ČR)
- 5ml polypropylenová kolonka, Thermo Scientific (USA)
- 0,22 µm filtrační nitrocelulózová membrána, Millipore (USA)
- filtr Amicon® Ultra 15 ml, Millipore (USA)

Petriho misky 90 mm	GAMA (ČR)
Misky pro buněčné kultury 35 mm, 100 mm	Biotech (ČR)
Transfekční kit Calcium Phosphate	Invitrogen (USA)
PCR stripy	Biogen (ČR)
Špičky na pipety s filtrem 10 µl, 200 µl, 1000 µl	SIPOCH (ČR)
Mikrozkumavky 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt (ČR)
Špičky na Repetmana 0,5 ml; 5 ml; 12,5 ml	Gilson (USA)
Špičky na pipety, Gilson, 10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl	SIPOCH (ČR)
Plastové zkumavky 15 ml, 50 ml	Sarstedt (ČR)
Mikrotitrační 96jamková destička	P-lab (ČR)
Jednorázové pipety 5 ml, 10 ml, 25 ml	Baria (ČR)
Spinery	Corning Incorporated (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rekombinantní ektodomény myší GCPIII

Pro přípravu rekombinantní ektodomény myší GCPIII, byl použit plazmid pMTBipSLINTagmEXSTII, jehož schéma z programu Vector NTI je zobrazeno na *obr. 10*. Plazmid byl vytvořen v naší laboratoři (Knedlík T., 2017) vložením insertu mEXSTII (ektodoména myší GCPIII) do vektoru pMTBipSLIN[55]. Následně byla zkontrolována sekvence plazmidu Sangerovým sekvenováním s použitím vhodně navržených primerů.



Obrázek 10. **Schéma plazmidu pMTBipSLINTagmEXSTII v programu Vector NTI. Exprese proteinu v buňkách je řízena sekrečním signálním místem BiP a protein je sekretován ven z buněk do média. BiP se nachází před částí SLIN, postupujeme-li podle čtecího rámce, proto exprimovaný protein obsahuje nejen část insertu, ale také část SLIN s tagy. SLIN obsahuje skupinu tří tagů v pořadí Strep tag II – FLAG tag – TEV – Strep tag II – TEV[i]. Získaný protein SLINmEXSTII budu v této práci pro jednoduchost označovat mGCPIII.**

[i] Strep tag II odpovídá aminokyselinové sekvenci WSHPQFEK (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Jedná se o syntetický peptid využívaný pro svou specifickou interakci se streptaktinem při afinitní chromatografii. Proteiny obsahující Strep tag II se tedy lépe čistí ze směsi v médiu. Další výhodou Strep tag II je to, že není ovlivněna biochemická funkce proteinu, jeho sbalování a sekrece, purifikace může probíhat při fyziologických podmínkách. FLAG tag je polypeptid tvořený sekvencí DYKDDDDK (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Podobně jako Strep tag II může být využit v afinitní chromatografii. Protein obsahující FLAG tag může být lokalizován na živých buňkách pomocí specifických monoklonálních protilátek. TEV štěpné místo je sekvence aminokyselin ENLYFQG nebo ENLYFQS (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser)). Jedná se o rozpoznávací sekvenci pro velice citlivou proteasu z viru tabákové mozaiky. Použití této proteasy umožňuje odstranění tagů pro afinitní chromatografii.

Médium obsahující protein mGCPIII bylo připraveno Janou Starkovou (body A až D) v naší laboratoři podle následujícího postupu.

A. Příprava S2 buněk

Zamražené S2 buňky[ii] byly rychle rozmraženy při 37 ˚C. K 5 ml média SF900II s 10% FBS o pokojové teplotě byl přidán 1 ml rozmražených buněk. Rozsuspendované buňky byly centrifugovány (500x g/ 2 – 3 minuty), médium bylo dekantováno pro odstranění DMSO a k buňkám bylo nově přidáno 5 ml média. Buňky byly přeneseny do Petriho misky o průměru 35 mm a inkubovány při teplotě 22 – 24 ˚C až do dosažení hustoty v rozmezí 6 – 20 milionů buněk/ml.

B. Pasážování buněk

Při hustotě přibližně 5 milionů buněk/ml v médiu obsahujícím sérum začínají buňky vytvářet shluky a je vhodné buňky rozpasážovat na více misek. Pasážování se doporučuje již při hustotách 2 – 4 miliony buněk/ml.

Po rozsuspendování pipetou jsou buňky rozděleny do nových misek, je k nim přidáno nové médium SF900II s 10% FBS a jsou inkubovány při teplotě 22 – 24 ˚C do dosažení hustoty v rozmezí 6 – 20 milionů buněk/ml.

C. Transfekce

3 ml média SF900II s 10% FBS obsahující přibližně 3 miliony S2 buněk byly umístěny do 35mm misky a byly ponechány narůst při teplotě 22 – 24 ˚C na hustotu přibližně 2 – 4 miliony buněk/ml.

V mikrozkumavce byla připravena transfekční směs obsahující:

- 36 µl 2M $CaCl_2$
- 128,6 µl pMTBipSLINTagmEXSTII (9 µg DNA)
- 3,0 µl pCoBLAST plazmidu (0,5 µg DNA)
- 132,4 µl sterilní vody (do finálního objemu 300 µl)

Do mikrozkumavky obsahující 300 µl HBS (2X HEPES-Buffered Saline) byla za kontinuálního vortexování přidána po kapkách během 3 minut veškerá transfekční směs.

[ii] Hmyzí buňky S2 jsou odvozeny od *Drosophila melanogaster*. Jsou využívány jako jedny z nejběžnějších eukaryotických expresních systémů, protože nejsou náročné na kultivační podmínky. Přestože glykosylace provádějí odlišně od savčích buněk, jsou dostatečné pro aktivitu většiny savčích proteinů[56].

Výsledný roztok byl ponechán při laboratorní teplotě 30 – 40 minut a již během přidávání, ale i následně během inkubace se tvořila jemná sraženina. Po promíchání byla směs po kapkách přidána k připraveným buňkám. Ty byly inkubovány 16 hodin při teplotě 22 – 24 ˚C. Krystaly $Ca_3(PO_4)_2$ byly opatrně odsáty a buňky byly promyty médiem SF900II s 10%FBS. Poté bylo přidáno nové médium a buňky byly inkubovány při teplotě 22 – 24 ˚C 48 hodin. Následně bylo pipetou opatrně odsáto médium a byly přidány 2 ml média SF900II s 10% FBS obsahujícího 20 µg/ml blasticidinu. Selektivní médium bylo vyměňováno každé 4 až 5 dní, dokud rezistentní buňky nezačaly růst (přibližně 3 – 4 týdny).

Aminokyselinová sekvence připraveného proteinu mGCPIII je:

NH_2–WSHPQFEKDYKDDDDKENLYFQGRSAWSHPQFEKGSENLYFQGSGSRSETTTSA
GYHQSIQQKLLSEMKAENIRSFLRSFTKLPHLAGTEQNLLLAKKIQTQWKKFGLDSAN
LVHYDVLLSYPNETNANYVSIVDEHGVEIFKTSYLEPPPDGYENVTNIIPPYNAFSASG
MPEGELVYVNYARTEDFFKLEREMNINCTGKIVIARYGKIFRGNKVKNAMLAGAMGII
LYSDPADYFAPDVQPYPKGWNLPGAAAQRGNVLNLNGAGDPLTPGYPAKEYTFRLPV
EEAVGIPNIPVHPIGYNDAERLLRNLGGAAPPDKSWKGSLNVSYNIGPGFTGSEYSRNI
RMHVNNINKITRIYNVIGTIRGSTEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPTTGTAVLQEIARSF
GKLVNGGWRPRRTIIFASWDAEEFGLLGSTEWAEENAKLLQERSIAYINSDSAIEGNYT
LRVDCTPLLNQLVYKVAREISSPDDGFESKSLYESWLEKDPSPENKECPRINKLGSGSD
FEAYFQRLGIASGRARYTKNKKTDKYSSYPVYHTIYETFELVQNFYDPTFKKQLSVAQ
LRGALVYELADSVVIPFNIQDYAKALKNYAASIFNISKKHDQQLRNHAVSFDPLFSAVK
NFSEAASDFHRRLTQVDLNNPIAVRIMNDQQMLLERAFIDPLGLPGRKFYRHIIFAPSSH
NKYAGESFPGIYDAMFDIENKADPSLAWAEVKKHISIAAFTIQAAAGTLTNVL–**COOH**

D. Nárůst mutantů GCPIII

Do spineru byla v médiu SF900II bez FBS naředěna kultura S2 tak, aby koncentrace nebyla nižší než 2 miliony buněk/ml. Byl přidán lipidový koncentrát (100x naředěný do celkového objemu). Indukce při koncentraci buněk cca 8 milionů/ml byla spuštěna přídavkem $CuSO_4$ (aby byla finální koncentrace 1mM). Protein byl exprimován ve spineru (otáčky 160 rpm, laboratorní teplota) a podle sledované životnosti buněk byla exprese ukončena po uplynutí 9 dní. Nejprve bylo médium krátce centrifugováno (300x g/2 min), poté bylo přelito a usazenina na dně (buňky) byla zlikvidována. Následovala delší centrifugace (13 000x g/10 min). Supernatant byl uskladněn před dalšími pokusy do -80 ˚C.

E. Zakoncentrování média

1 litr zamraženého média s myší GCPIII byl pomalu rozmražen v nádobě se studenou vodou, následně bylo médium centrifugováno při 5 250 g po dobu 15 minut na centrifuze. Médium bylo poté při 4 °C zahuštěno pomocí tangenciální filtrace s pomocí přístroje Labscale™ (Tangential Flow Filtration System, Millipore) na objem cca 80 ml. Po zahuštění bylo zakoncentrované médium centrifugováno při 4 000 g po dobu 15 minut. Poté bylo ke koncentrátu přidáno 2,4 ml Biolocku. Roztok obsahuje avidin a přidává se proto, aby došlo k vyvázání biotinu obsaženého v médiu. Biotin by svou vazbou k streptaktinu bránil vazbě StrepTagII značky k streptaktinu. Veškerý následující postup byl proveden ve 4 °C, aby se protein nedenaturoval.

F. Afinitní chromatografie

Na připravenou 5ml polypropylenovou kolonku (Thermo Scientific, USA) byl nanesen nosič – 2 ml 50% směsi streptaktinu (pro specifickou interakci umožňující přečištění proteinu se StrepTagem II). Nosič byl promyt 3 ml a následně byl ekvilibrován 5 ml Wash pufru (100mM Tris-HCl, pH = 8,0, 150mM NaCl). Poté byl na kolonu nanesen veškerý roztok zahuštěného média za současného jímání frakce FT (flow-through). Následovalo promytí 10 ml Wash pufru a chytání frakce W1 (Wash 1), přídavek 1 ml elučního pufru (100mM Tris-HCl, pH = 8,0, 150mM NaCl, 10mM desthiobiotin; nutno připravit vždy čerstvý) a jímání frakce W2 (Wash 2). Po 15 minutách byl přidán 1 ml elučního pufru a byla jímána frakce E1 (eluce 1). Následně byl postupně přidáván 1 ml elučního pufru a byly chytány frakce E2, E3, E4. Kolona byla promyta 10 ml Wash pufru za jímání frakce W3 (Wash 3). Následovala regenerace kolony 20 ml regeneračního pufru (100mM Tris-HCl, pH = 8,0, 150mM NaCl, 1mM HABA (4′-hydroxyazobenzen-2-karboxylová kyselina)), promytí 20 ml Wash pufru a následně byla kolona uchována při 4 °C v 1 ml Wash pufru.

Následně byla změřena absorbance jednotlivých frakcí na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific). Podle molárního extinkčního koeficientu proteinu mGCPIII ($\lambda_\varepsilon = 114\,270\ \mathrm{dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}}$) byla přepočtena změřená absorbance na koncentraci.

Frakce byly analyzovány diskontinuální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za redukujících podmínek (SDS-PAGE) a následně byly vyvolány stříbrem.

3.2.2 SDS-PAGE

Nejprve byly vzorky se vzorkovým pufrem (3,5 ml 1M Tris (pH 6,8); 3,0 ml glycerol; 1 g SDS; 600 µl 2-merkaptoethanol; 1,2 mg bromfenolová modř; doplněno vodou do 10 ml) v poměru 5:1 umístěny na 10 min do 96 °C, aby došlo k denaturaci proteinů. Následně byl připraven gel: po sestavení aparatury byl připraven 11% separační gel (2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8); 2,5 ml směsi akrylamidu a bisakrylamidu (42,8 g akrylamidu, 1,2 g N,N'-methylen-bis(akrylamidu)); 100 µl 10% (w/v) SDS, 10 µl TEMED; 100 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného (APS); doplněno vodou do 10 ml) a byl nalit do aparatury. Po zatuhnutí byl převrstven 6% zaostřovacím gelem (1,25 ml 1 M Tris (pH 6,8); 0,75 ml směsi akrylamidu a bis(akrylamidu) (42,8 g akrylamidu, 1,2 g N,N'-methylen-bis(akrylamidu)); 50 µl 10% (w/v) SDS; 10 µl TEMED; 50 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného (APS); doplněno vodou do 5 ml). Následně byla aparatura naplněna elektrodovým pufrem (15,1 g Tris; 94 g glycin; 5 g SDS; 900 ml voda; pH 8,8) zředěným 1:4 deionizovanou vodou, do jamek od hřebenů byly naneseny vzorky proteinů z jednotlivých frakcí po purifikaci. Aparatura byla zapojena ke zdroji stejnosměrného proudu a separace probíhala při konstantním napětí 140 V po dobu přibližně 75 min (dokud bromfenolová modř dosáhla konce gelu). Proteiny byly následně detekovány barvením stříbrem.

3.2.3 Barvení stříbrem

Všechny následující kroky byly prováděny s gelem z SDS-PAGE umístěným v plastové nádobce na míchačce při laboratorní teplotě. Gel byl inkubován s cca 10 ml fixačního roztoku (12% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol, 0,5 ml 37% formaldehydu) po dobu 30 minut. Poté byl roztok odlit a ke gelu bylo přidáno asi 10 ml promývacího roztoku (50% (v/v) methanol). Po 15 minutách inkubace byl roztok vyměněn za čerstvý promývací roztok, tento postup byl opakován celkem třikrát. Poté byl gel po dobu 1 minuty inkubován s exponačním roztokem ($Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ – 0,2 g/l H_2O). Gel byl opláchnut destilovanou vodou 3 x 20 s. Následovala inkubace s impregnačním roztokem ($AgNO_3$ – 2 g/l, 0,5 ml 37% formaldehydu, doplněno destilovanou vodou do 1 l). Gel byl opět opláchnut destilovanou vodou 3 x 20 s. Gel byl inkubován s vyvolávacím roztokem (Na_2CO_3 – 60 g/l,

$Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ – 4 mg/l, 0,5 ml 37% formaldehydu, doplněno destilovanou vodou do 1l) až do dostatečného obarvení. Poté byl omyt destilovanou vodou 3 x 20 s. Byl přilit druhý promývací roztok (12% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol) na cca 10 minut. Gel byl inkubován s uchovávacím roztokem (50% (v/v) methanol) přes noc.

3.2.4 Zahušťování proteinu na filtru Amicon

Po vyhodnocení gelu a získaných dat z Nanodropu (Thermo Scientific) byly spojeny frakce, které obsahovaly protein. Následně byly z původního objemu 3 ml koncentrovány na přibližně 250 µl pomocí filtru Amicon (Merck; 15ml zkumavka, projdou látky do M_W = 30 000).

Zkumavka s filtrem byla naplněna vybranými frakcemi a poté byla umístěna na centrifugu a centrifugována 10 min při 3500 g. Poté byl odlit permeát (přibližně 2 ml), který protekl přes filtr do spodní části zkumavky, a k zahuštěnému vzorku byly přidány 2 ml pufru (10mM BTP-HCl, 150mM NaCl, pH = 7,4; 4,38 g NaCl a 1411,6 mg BTP bylo rozpuštěno ve 400 ml MiliQ vody, pH bylo upraveno na 7,4 a následně byl objem doplněn do 500 ml; pufr byl přefiltrován přes 0,22 µm nitrocelulosový filtr a odvzdušněn). Postup byl opakován 3x, aby byl vzorek převeden do prostředí pufru a následně byl objem vzorku zakoncentrován na cca 250 µl. Nakonec byl vzorek pipetován do standardní mikrozkumavky a byl centrifugován při 13 000x g 10 minut.

Takto připravený vzorek byl změřen na Nanodropu (Thermo Scientific) a jeho koncentrace byla 9,286 mg/ml.

3.2.5 Gelová permeační chromatografie (GPC)

GPC bylo provedeno na koloně HiLoad™ Superdex™ 200 10/300 GL (GE-Healthcare) s mrtvým objemem 7 ml a celkovým objemem 24 ml. Nejprve byl nastaven maximální tlak na 1,5 MPa, přístroj a 500µl injekční ventil byl promyt od ethanolu odvzdušněnou destilovanou vodou s průtokem 1 ml/min.

Původní vzorek o cca 250 µl byl naředěn přídavkem 500 µl mobilní fáze (10mM BTP-HCl, 150mM NaCl, pH = 7,4; 4,38 g NaCl a 1411,6 mg BTP bylo rozpuštěno ve 400 ml MiliQ vody, pH bylo upraveno na 7,4 a následně byl objem doplněn do 500 ml; pufr byl přefiltrován přes 0,22 µm nitrocelulosový filtr a odvzdušněn) a byl nadávkován na FPLC ve dvou dávkách (400 µl a následně cca 350 µl). Po nadávkování byl průtok upraven na 0,5 ml/min, od 5 ml bylo spuštěno sbírání frakcí po 0,5 ml a byla zaznamenávána absorbance při 280 nm.

Frakce, které podle chromatogramu obsahovaly protein, byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a barvením stříbrem (viz výše). Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny inkubací 5 µl frakce s 1 µl SB (6x koncentrovaného) po dobu 5min při 95 °C.

Koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla změřena spektrofotometricky na Nanodropu (Thermo Scientific). Vybrané frakce byly spojeny, alikvotovány a rychle zamraženy v kapalném dusíku. Koncentrace připraveného proteinu byla stanovena aminokyselinovou analýzou.

3.2.6 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG

96jamková destička byla umístěna na led a podle plánu (příklad rozpisu je uveden v *tab. 2*) bylo do jamek destičky napipetováno potřebné množství reakčního pufru. Protein uchovávaný po alikvotech v -80 °C byl rozmražen při laboratorní teplotě, poté byl poklepáním promíchán, centrifugován 10 s při 500x g a následně umístěn na led. Byl naředěn na potřebné koncentrace pipetováním do vychlazeného reakčního pufru (25mM BTP, 150mM NaCl, 1mM $ZnCl_2$, 0,001% $C_{12}E_8$, pH 7,4) a důkladným promícháním pipetou. Poté byl enzym podle plánu pipetován do jamek destičky obsahujících reakční pufr tak, že každá reakce měla objem 90 µl. Destička byla umístěna do vodní lázně předehřáté na 37 °C tak, aby byl celý objem reakce pod hladinou. Po vytemperování reakcí (cca 5 min) bylo multikanálovou pipetou do reakcí přidáno 10 µl substrátu (směs 50nM [^{3}H]NAAG – značený tritiem na uhlíkatém skeletu glutamátu C_3, C_4 – a 950nM NAAG – neznačený) a reakce byly promíchány. Po uplynutí 30 minut byly reakce zastaveny přídavkem 100 µl stopovacího pufru (200mM KH_2PO_4, 2mM 2-merkaptoethanol, pH 7,4) a důkladně promíchány pomocí multikanálové pipety. Následovala separace ionexovou chromatografií. Do skleněných Pasteurových pipet o počtu odpovídajícímu reakcím byly naneseny 2 ml nosiče AG 1-X8 (Bio-Rad) suspendovaného v odvzdušněné deionizované H_2O v poměru 1:1. Kolonka byla dvakrát promyta odvzdušněnou deionizovanou vodou. Na kolonky byl nanesen veškerý objem reakce – cca 200 µl vzorku. Do scintilačních lahviček bylo dáno 6 ml scintilačního roztoku Rotiszint®Eco-Plus (Roth) a lahvičky byly umístěny pod kolonky s nanesenými vzorky. Navázaný glutamát byl eluován 2 x 1,25 ml 1M HCOOH do scintilačních lahviček, roztok byl důkladně promíchán na vortexu.

Scintilace byla změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) a získaná data byla vyhodnocena.

***Tabulka 2*. Rozpis prováděných reakcí.**

Reakce	*m* enzymu ve 100 µl reakce [ng]	*V* enzym [µl]	*V* pufr [µl]	substrát *c* finální [nM]	*V* substrát [µl]		
1	blank	0	90,0	80	10		
2	blank	0	90,0	160	10		
3	blank	0	90,0	320	10		
4	blank	0	90,0	960	10		
5	blank	0	90,0	1280	10		
6	blank	0	90,0	20000	10		
7	total, 640	1	89,0	80	10	hGCPII	0,64 mg/ml
8	total, 640	1	89,0	160	10		
9	total, 640	1	89,0	320	10		
10	total, 1280	2	88,0	960	10		
11	total, 1920	3	87,0	1280	10		
12	total, 7040	11,0	79,0	20000	10		
13	0,5	0,5	89,5	80	10	mGCPIII	1 ng/µl
14	0,5	0,5	89,5	80	10		
15	0,9	0,9	89,1	160	10		
16	0,9	0,9	89,1	160	10		
17	1,8	1,8	88,2	320	10		
18	1,8	1,8	88,2	320	10		
19	4	4,0	86,0	640	10		
20	4	4,0	86,0	640	10		
21	5	5	85	960	10		
22	5	5	85	960	10		
23	7	7,0	83,0	1280	10		
24	7	7,0	83,0	1280	10		
25	13	13,0	77,0	1920	10		
26	13	13,0	77,0	1920	10		
27	22	2,2	87,8	3840	10		10 ng/µl
28	22	2,2	87,8	3840	10		
29	29	2,9	87,1	5000	10		
30	29	2,9	87,1	5000	10		
31	57	5,7	84,3	10000	10		
32	57	5,7	84,3	10000	10		
33	114	11,4	78,6	20000	10		
34	114	11,4	78,6	20000	10		
35	178	17,8	72,2	40000	10		
36	178	17,8	72,2	40000	10		

Od původní naměřené hodnoty DPM (rozpad za minutu) pro danou reakci byla odečtena hodnota tzv. „blanku“ – slepého pokusu (bez přidaného enzymu). Totéž bylo odečteno od hodnoty tzv. „totalu“, což je vzorek, kde měl být veškerý substrát přeměněn na produkt. Pro

změření totalu byl použit aktivnější protein hGCPII. Následně byla dopočtena konverze podle vztahu:

$$\text{konverze} = \frac{\text{DPM bez blanku}}{\text{total bez blanku}}$$

Dále byla vypočtena koncentrace vzniklého produktu po provedení reakce podle vztahu:

$$c_{\text{produkt}}\,[\text{nM}] = \text{konverze} \cdot c_{\text{NAAG}}\,[\text{nM}]$$

a finální koncentrace enzymu po provedení reakce o objemu 100 µl podle vztahu:

$$c_{\text{enzym}}[\text{nM}] = \frac{m_{\text{enzym}}[\text{ng}]}{M_{\text{mGCPIII}}\,[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot V_{\text{enzym}}\,[\mu\text{l}] \cdot 10^6}$$

$M_{\text{mGCPIII}} = 90\,089\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Výsledná rychlost byla vypočtena ze vztahu:

$$v\,[\text{s}^{-1}] = \frac{c_{\text{produkt}}}{c_{\text{enzym}} \cdot t}$$

kde t je čas probíhající reakce, tedy 1800 s.

3.2.7 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG

Měření enzymové aktivity s použitím značeného substrátu BCG probíhalo podle stejného principu a pracovního postupu jako při použití značeného NAAGu. Jediným rozdílem bylo to, že reakce probíhaly 20 minut a byl použit jiný reakční pufr (20mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 5mM $CaCl_2$, 0,1% Tween 20, pH 7,4) a substrát (směs 50nM [^{3}H]BCG – značený tritiem na uhlíkatém skeletu glutamátu, C_3, C_4 – a 950nM BCG – neznačený).

3.2.8 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu$_2$

Enzymová aktivita proteinu mGCPIII s použitím substrátu Pte-Glu$_2$ byla změřena s pomocí kolegy MUDr. Františka Sedláka v naší laboratoři podle následujícího postupu.

Destička byla umístěna na led a podle plánu bylo do jamek destičky napipetováno potřebné množství reakčního pufru (25mM BTP, 150mM NaCl, 1mM $ZnCl_2$, 0,001% $C_{12}E_8$, pH 7,4). Protein uchovávaný po alikvotech v -80 °C byl rozmražen při laboratorní teplotě, poté byl poklepáním promíchán, centrifugován 10 s při 500x g a následně umístěn na led. Byl naředěn na potřebnou koncentraci pipetováním do vychlazeného reakčního pufru a důkladným promícháním pipetou. Poté byl naředěný enzym pipetován do jamek destičky tak,

že každá reakce měla objem 75 µl a obsahovala 2 ng enzymu. Destička byla umístěna do vodní lázně předehřáté na 37 °C tak, aby byl celý objem reakce pod hladinou. Po vytemperování reakcí (cca 5 min) bylo multikanálovou pipetou do reakcí přidáno 25 µl substrátu, takže finální koncentrace substrátu Pte-Glu_2 byly od 0,0390625 µM do 10 µM a reakce byly promíchány. Po uplynutí 20 minut byly reakce ukončeny přídavkem 10 µl stopovacího pufru (25mM BTP, 150mM NaCl, 20µM PMPA, pH 7,4). Poté byly produkty reakce analyzovány na UPLC (Agilent Technologies).

Po propláchnutí celého přístroje mobilní fází (25mM fosfátového pufru – směsí Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4, pH 6; 2,7% acetonitril, 0,02% azid sodný) byla reakční směs analyzována na koloně C18 Acquity UPLC HSS T3 2,1 x 100 mm. Eluce substrátu a produktu reakce byla provedena isokraticky při průtoku 0,4 ml/min, teplota kolony byla 40,0 °C. Analyty byly detekovány při 280 nm. Získané vrcholy odpovídající substrátu a produktu byly integrovány a získaná data byla následně vyhodnocena.

Zintegrované obsahy vrcholů odpovídající Pte-Glu_2 a Pte-Glu_1 byly přepočteny na látkové množství v pmol podle předem provedené kalibrace pomocí známých koncentrací $PteGlu_2$. Původní látkové množství substrátu $n_{\mathrm{PteGlu}_{2,poč}}$ v reakci odpovídá součtu látkových množství n_{PteGlu_2} a n_{PteGlu_1} na konci reakce. Z toho lze následně dopočítat konverzi:

$$\text{konverze} = \frac{n_{\mathrm{PteGlu}_1}[\mathrm{pmol}]}{n_{\mathrm{PteGlu}_{2,poč}}\,[\mathrm{pmol}]}$$

Dále bylo vypočteno, kolik pmol produktu vznikne za sekundu:

$$v\,[\mathrm{pmol}\cdot\mathrm{s}^{-1}] = \frac{n_{\mathrm{PteGlu}_1}[\mathrm{pmol}]}{t\,[\mathrm{s}]}$$

kde t je čas probíhající reakce, tedy 1200 s. Látkové množství enzymu bylo vypočteno ze vztahu:

$$n_{\mathrm{enzym}}[\mathrm{pmol}] = \frac{m_{\mathrm{enzym}}[\mathrm{ng}]}{M_{\mathrm{mGCPIII}}\,[\mathrm{g}\cdot\mathrm{mol}^{-1}]\cdot 10^3}$$

$M_{\mathrm{mGCPIII}} = 90\,089\ \mathrm{g}\cdot\mathrm{mol}^{-1}$.

Výsledná rychlost byla vypočtena ze vztahu:

$$v\,[\mathrm{s}^{-1}] = \frac{v\,[\mathrm{pmol}\cdot\mathrm{s}^{-1}]}{n_{\mathrm{enzym}}[\mathrm{pmol}]}$$

Koncentrace substrátu v reakci byla vypočtena z původního látkového množství substrátu $n_{\mathrm{PteGlu}_{2,poč}}$: $c_{\mathrm{substrát}}\,[\mathrm{nM}] = \frac{n_{\mathrm{PteGlu}_{2,poč}}\,[\mathrm{pmol}]}{V_{\mathrm{reakce}}[\mu\mathrm{l}]\cdot 10^{-3}} = n_{\mathrm{PteGlu}_{2,poč}}\,[\mathrm{pmol}]\cdot 10$

protože V_{reakce}= 100 µl.

4 Výsledky

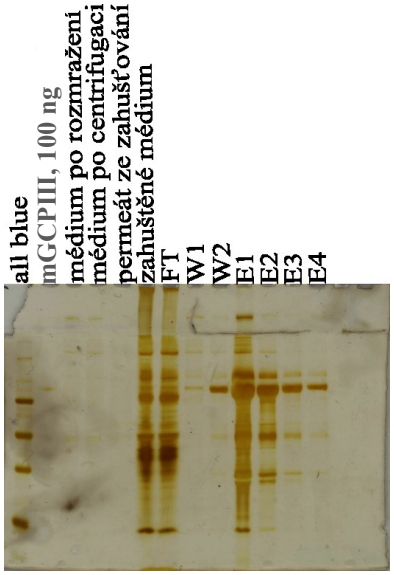
4.1 Příprava proteinu mGCPIII

V naší laboratoři bylo Janou Starkovou připraveno 1000 ml média obsahujícího protein mGCPIII. Médium bylo centrifugováno a zahuštěno z původního objemu na přibližně 80 ml. Následně byl protein přečištěn afinitní chromatografií za použití streptaktinového nosiče. Z afinitní chromatografie byly získány frakce W1, W2 (promytí kolony), E1, E2, E3 (eluce pomocí desthiobiotinu). Jejich absorbance byla změřena na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific). Podle molárního extinkčního koeficientu proteinu mGCPIII ($\lambda_\varepsilon = 114\,270$ dm3 · mol^{-1} · cm^{-1}; 1 [A280]≈0,77 mg/ml) byla přepočtena změřená absorbance na koncentraci (*tab*. 3).

***Tabulka 3*. Absorbance vzorků při 280 nm získaná na Nanodropu (Thermo Scientific) a jejich koncentrace.**

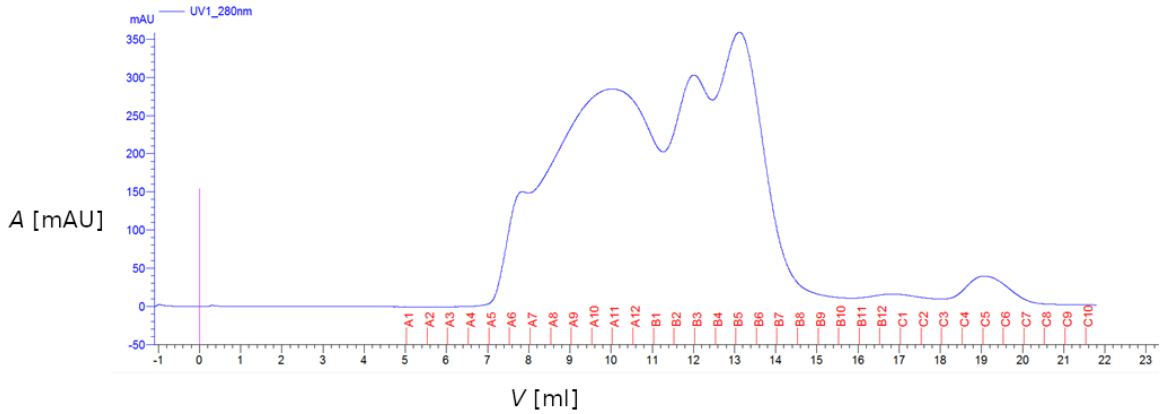
Vzorek	A280	*c* protein [mg/ml]
W1	0,061	0,047
W2	0,308	0,237
E1	2,023	1,558
E2	0,164	0,126
E3	0,076	0,059

Pro další analýzu bylo provedeno SDS-PAGE (*obr. 11*).



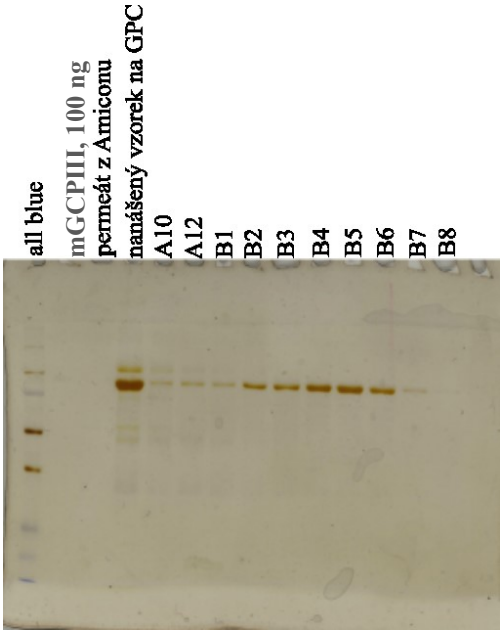
***Obrázek 11*. Průběh afinitní chromatografie GCPIII analyzovaný pomocí SDS-PAGE detekovaný barvením stříbrem. Postupně bylo naneseno 1ul média po rozmražení, centrifugaci a zahuštění, 1 µl proteklého materiálu (FT). Permeátu vzniklého při zahušťování média a frakcí W1, E1, E2, E3, E4 bylo naneseno 10 µl. V případě frakce W2 bylo naneseno 7 µl. Podmínky: 11% gel, 150 V, 75 minut.**

Na gelu je patrné, že frakce W1 – W2 a E1 – E4 obsahují protein potřebné velikosti (při porovnání se standardem mGCPIII – připraven v naší laboratoři B. Vorlovou, 2015). Následně byly spojeny frakce W2, E1 a E2, byly přibližně 12x zahuštěny a přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie (*obr. 12*).



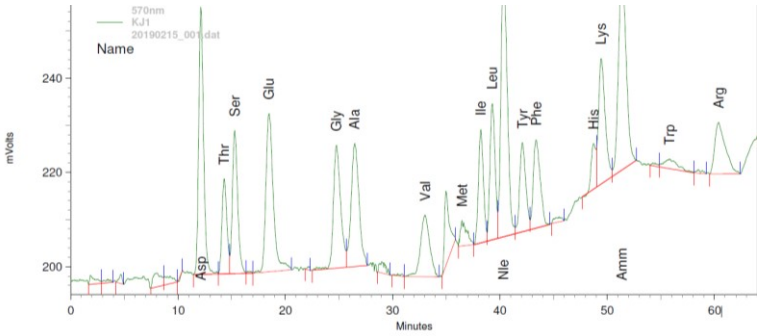
Obrázek 12. **Chromatogram z gelové permeační chromatografie – závislost absorbance při 280 nm na retenčním objemu a rozdělení do frakcí.**

Nasbírané frakce A10, A12 a B1 – B8 byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE a barvením stříbrem (*obr. 13*).



Obrázek 13. **Průběh gelové permeační chromatografie mGCPIII pomocí SDS-PAGE s detekcí pomocí stříbra. Permeátu proteklého při zahušťování na filtru Amicon bylo naneseno 10 µl. Dále byl nanesen 1 µl ze vzorku, který byl přečišťován na GPC, vzorku z frakcí A10 – B8 bylo naneseno 5 µl. Podmínky: 11% gel, 150 V, 75 minut.**

Podle získaných dat byly spojeny frakce obsahující protein v předpokládané dimerní formě: B2 a B3, frakce byly alikvotovány a zamraženy v kapalném dusíku. Pro budoucí analýzu byly rovněž spojeny frakce obsahující protein v předpokládané monomerní formě: B5 a B6. Pro přesné určení koncentrace proteinu byla Dr. Radko Součkem provedena aminokyselinová analýza (*obr. 14*).



Name	RT (min)	Area	Amount (nmol)
Asp	12,13	1792465	3,358
Thr	14,30	643368	1,220
Ser	15,30	1034852	1,765
Glu	18,50	1610387	3,135
Gly	24,77	1225632	2,126
Ala	26,46	1335580	2,268
Val	33,03	773750	1,392
Met	36,46	221336	0,406
Ile	38,23	781195	1,521
Leu	39,30	958206	1,875
Nle	40,36	2354642	4,558
Tyr	42,10	748648	1,365
Phe	43,40	836737	1,523
His	48,73	299179	0,566
Lys	49,43	1140036	1,737
Amm	51,36	2108263	3,778
Trp	55,83	178260	0,415
Arg	60,40	747818	1,365

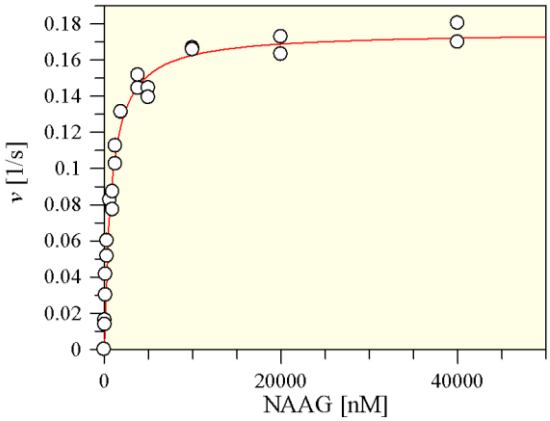
***Obrázek 14*. Data získaná z aminokyselinové analýzy dimerní formy mGCPIII.**

Z naměřených dat byla vypočtena koncentrace připraveného proteinu: $c = 0{,}163 \pm 0{,}003$ mg/ml (byly použity hodnoty pro aminokyseliny Ala, Gly, Glx, Asx). Z původního objemu média 1000 ml bylo připraveno 0,33 mg dimerní formy proteinu mGCPIII (celkem 2 ml po spojení frakcí B2 a B3 z obou nástřiků).

4.2 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG

4.2.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu mGCPIII

Po provedení reakcí podle plánu uvedeného u metody měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG byla naměřená data vyhodnocena v programu GraFit (*obr. 15,*) a byla získána hodnota K_M a k_{cat}.



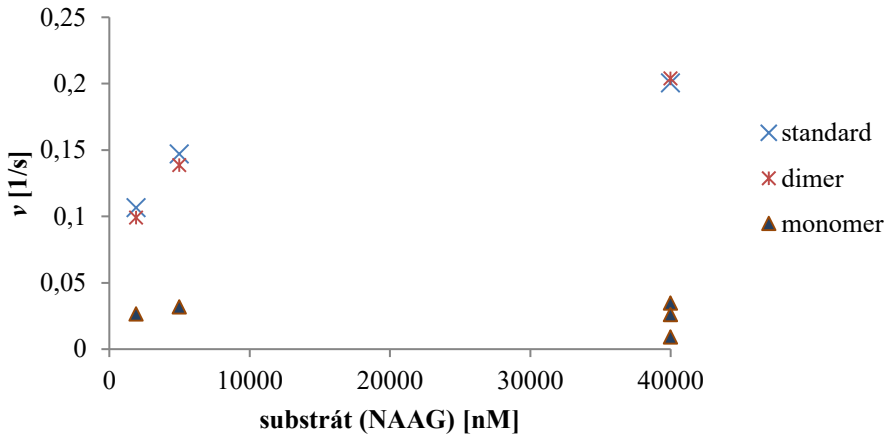
***Obrázek 15*. Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu, NAAGu. Pro experimentální detaily viz *kap.* 3.2.6, *str.* 25.**

Byly získány tyto kinetické parametry pro substrát NAAG:

$$K_M = 790 \pm 60 \text{ nM } (7\ \%);\ k_{cat} = 0{,}156 \pm 0{,}003 \text{ s}^{-1}\ (2\ \%).$$

4.2.2 Vzájemné porovnání enzymové aktivity dimerní a monomerní formy proteinu mGCPIII

Po provedení reakcí metodou měření enzymové aktivity s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG byla vyhodnocená data vynesena do grafu závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu, NAAGu (*obr. 16*).

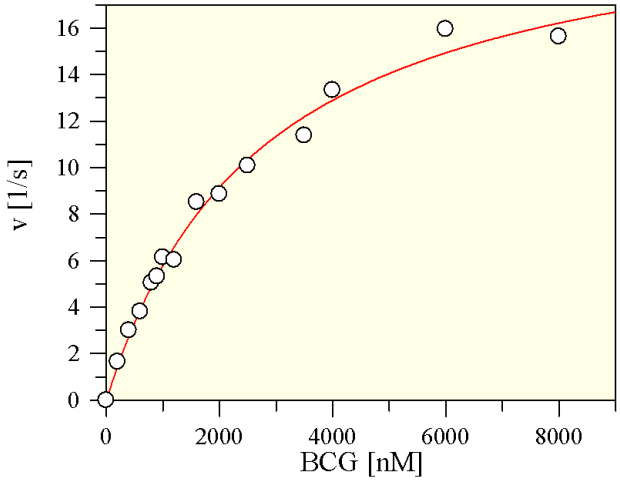


***Obrázek 16*. Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu, NAAGu, pro porovnání aktivity dimerní a monomerní formy.**

Výsledky potvrzují předpoklad, že monomerní forma mGCPIII je mnohem méně aktivní než dimerní forma, nicméně monomer vykazuje reziduální aktivitu.

4.3 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG

Po provedení reakcí byla naměřená data vyhodnocena podobně jako reakce se substrátem NAAG. Data byla analyzována v programu GraFit (*obr. 17*) a byla získána hodnota K_M a k_{cat}.



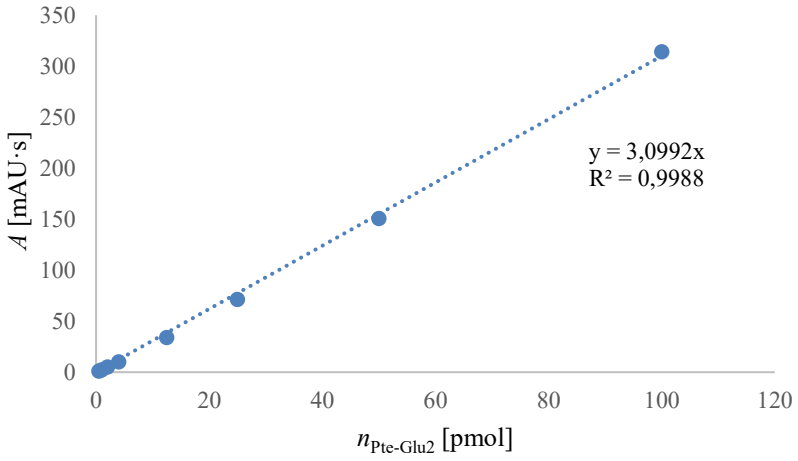
***Obrázek 17*. Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu, BCG. Experimentální detaily viz *kap.* 3.2.7, *str.* 27.**

Byly získány tyto kinetické parametry pro substrát BCG:

$$K_M = 2\,800 \pm 200 \text{ nM } (7\ \%);\ k_{cat} = 21{,}8 \pm 0{,}9 \text{ s}^{-1}\ (4\ \%).$$

4.4 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu$_2$

Nejprve byla na přístroji UPLC změřena kalibrační řada (*obr. 18*):

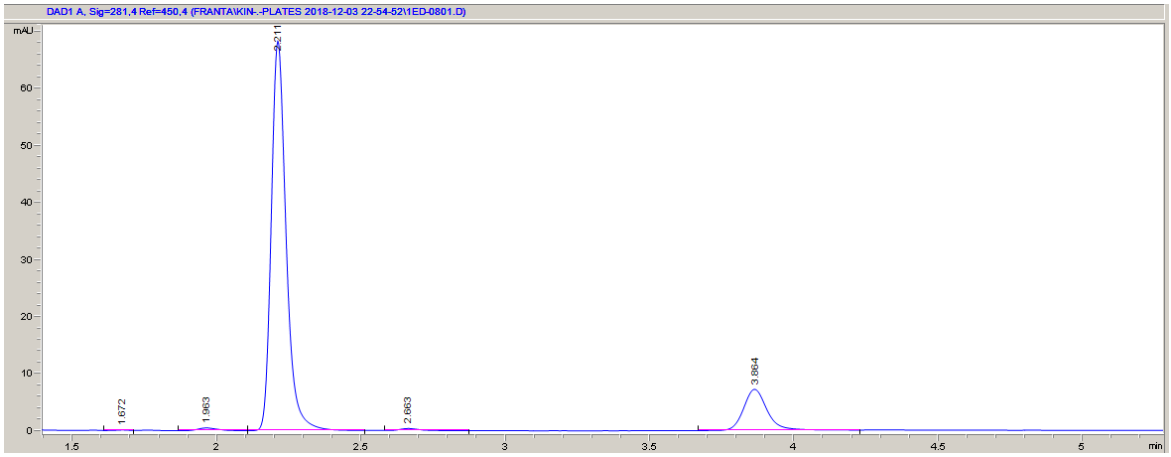


***Obrázek 18*. Kalibrační řada závislosti plochy pod křivkou při absorbanci 280 nm na látkovém množství Pte-Glu$_2$.**

Po proložení závislosti přímkou, byla získána rovnice popisující vztah obsahu a látkového množství:

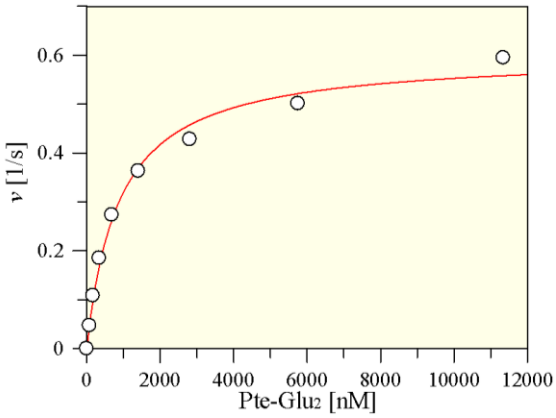
$$A = 3{,}0992 \cdot n$$

Po provedení reakcí byla pro každou reakční směs změřena závislost absorbance na retenčním čase (*obr. 19*).



***Obrázek 19*. Analýza reakční směsi hydrolýzy Pte-Glu$_2$ enzymem mGCPIII pomocí UPLC – závislost absorbance na retenčním čase reakční směsi po ukončení reakce. Experimentální detaily jsou uvedeny v *kap.* 3.2.8 *str.* 27. Směs je tvořena nerozštěpeným substrátem Pte-Glu$_2$ a produktem reakce Pte-Glu$_1$. Malé nečistoty v blízkosti prvního vrcholu (Pte-Glu$_2$) jsou adukty substrátu.**

Po naměření chromatogramů pro všechny reakce byly vrcholy odpovídající substrátu a produktu zintegrovány a získaná data byla následně vyhodnocena. Jelikož glutamát neabsorbuje při 280 nm, můžeme použít pro výpočet látkového množství Pte-Glu_1 stejnou kalibrační přímku jako pro Pte-Glu_2. Data byla analyzována v programu GraFit (*obr. 20*) a byla získána hodnota K_M a k_{cat}.



***Obrázek 20*. Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu, Pte-Glu_2.**

Byly získány tyto kinetické parametry pro substrát Pte-Glu_2:

$K_M = 900 \pm 100$ nM (9 %); $k_{cat} = 0{,}60 \pm 0{,}02$ s^{-1} (3 %).

5 Diskuze

5.1 Příprava proteinu mGCPIII

Z 1000 ml média bylo zahuštěním, afinitní purifikací a následně gelovou permeační chromatografií získáno 0,33 mg čisté dimerní formy proteinu mGCPIII. Nízký výtěžek oproti přípravě jiných rekombinantních proteinů v naší laboratoři je způsoben tím, že velká část proteinu byla ve formě neaktivního monomeru a byla oddělena od formy dimerní pomocí GPC.

Ze získaných dat z GPC a z následně provedeného SDS-PAGE (*obr. 12, 13*) bylo zjištěno, že protein přečištěný afinitní chromatografií obsahoval nečistoty s větším retenčním objemem (V = 19 ml) a nečistoty s menším retenčním objemem (V = 10 ml). Z pozice vrcholů lze říci, že vrchol s retenčním objemem 12 ml odpovídá dimerní formě mGCPIII a vrchol s retenčním objemem 13,5 ml odpovídá monomerní formě. Podle SDS-PAGE lze dále říci, že protein po GPC neobsahuje jiné nečistoty, nicméně vrcholy monomeru a dimeru vlivem malého rozdílu retenčních objemů nelze zcela oddělit.

Z předchozích pokusů s proteinem mGCPIII v naší laboratoři víme, že se dimerní forma enzymu rozpadá na monomer (např. měření na Thermofluoru – opakovaně rozmražený protein měl rozdílnou denaturační teplotu od čerstvě rozmraženého).

5.2 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG

Po změření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG byly získány tyto kinetické parametry: K_M = 790 $\pm$ 60 nM (7 %); k_{cat} = 0,156 $\pm$ 0,003 s^{-1} (2 %). V *tab.* 4 srovnáváme tyto hodnoty s dalšími publikovanými kinetickými konstantami pro homology GCPII.

Porovnáme-li (*tab. 4*) tuto hodnotu K_M s hodnotou pro rekombinantní lidskou GCPIII (K_M = 370 $\pm$ 70 nM), potom rhGCPIII má 2x vyšší afinitu k NAAGu. Přestože v případě mGCPIII byly použity aktivující Zn^{2+} ionty a jiný pufr (BTP má lepší vlastnosti než MOPS, MOPS mírně inhibuje aktivitu GCPII a GCPIII), lidská GCPIII lépe štěpí NAAG.

Tabulka 4. **Porovnání získaných parametrů pro štěpení NAAGu s publikovanými výsledky.**

Protein	K_M [nM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/ K_M [1/sM]	Podmínky	Zdroj
rhGCPII	1200 ± 500	1,1 ± 0,2	(9,3 ± 4,9) · 10^5	20mM MOPS; 20mM NaCl; pH 7,4	*1*
rhGCPIII	370 ± 70	0,11 ± 0,01	(3,0 ± 0,6) · 10^5		
GCPIII	500	0,08	2,16 · 10^5	25mM BTP; pH 7,5	*49*
GCPIII, Zn^{2+}	100	0,5	2,27 · 10^6	25mM BTP; 0,1mM Zn^{2+}; pH 7,5	
rmGCPII	1900 ± 100	1,44 ± 0,02	(7,7 ± 0,1) · 10^5	20mM NaCl; 20mM MOPS; pH 7,4	*54*
rhGCPII	550 ± 60	1,45 ± 0,04	(2,65 ± 0,07) · 10^6		
mGCPIII	790 ± 60	0,156 ± 0,003	(2,0 ± 0,1) · 10^5	25mM BTP; 150mM NaCl; 1mM $ZnCl_2$; 0,001% $C_{12}E_8$; pH 7,4	Tato bakalářská práce

Porovnáme-li hodnotu K_M s hodnotou pro rekombinantní lidskou GCPII (K_M = 1200 ± 500 nM), potom lidská GCPII má 1,5x nižší afinitu k NAAGu.

Porovnáme-li hodnotu K_M s hodnotou pro lidskou GCPIII v přítomnosti Zn^{2+} ($K_M \approx$ 100 nM), lidská GCPIII má 8x vyšší afinitu k NAAGu. Přestože v případě mGCPIII byla použita vyšší koncentrace aktivujících Zn^{2+} iontů (1mM místo 0,1mM v případě lidské GCPIII) lidská GCPIII lépe štěpí NAAG.

Jestliže srovnáme získané parametry s rmGCPII (K_M = 1900 ± 100 nM), zjistíme, že mGCPIII má 2,4x vyšší afinitu k NAAGu. Zvýšená afinita může být způsobena přítomností aktivujících Zn^{2+} iontů.

Porovnáme-li získané číslo přeměny s publikovanými výsledky, potom mGCPIII přemění za jednu sekundu 1,5x více NAAGu než rhGCPIII (k_{cat} = 0,11 ± 0,01 s^{-1}), lidská GCPIII v přítomnosti Zn^{2+} ($k_{cat} \approx$ 0,5 s^{-1}) přemění za jednu sekundu 3x více NAAGu než mGCPIII. Vyšší číslo přeměny u mGCPIII oproti rhGCPIII je tedy pravděpodobně způsobeno přítomností aktivujících Zn^{2+} iontů.

Rekombinantní myší GCPII (k_{cat} = 1,44 ± 0,02 s^{-1}) přemění dokonce 9x více než mGCPIII, přestože při použití myší GCPIII reakce probíhala v přítomnosti Zn^{2+} aktivujících iontů a v jiném reakčním pufru (BTP má lepší vlastnosti než MOPS, MOPS mírně inhibuje aktivitu GCPII a GCPIII).

5.3 Vzájemné porovnání enzymové aktivity dimerní a monomerní formy proteinu mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG

Porovnáme-li enzymovou aktivitu monomerní a dimerní formy mGCPIII, tak výsledky potvrzují předpoklad, že monomer vykazuje mnohem menší aktivitu než dimer. Residuální aktivita monomerního proteinu pozorovatelná na *obr. 16* může být způsobena tím, že GPC neumožnilo dokonalou separaci dimeru a monomeru (vrcholy mají podobný retenční objem, viz *obr. 12*), tudíž je v alikvotu s monomerem v malém množství přítomen i dimer. Ze získaných dat je zřejmé, že enzymová aktivita dimeru je srovnatelná se standardem mGCPIII (Vorlová, 2015).

5.4 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG

Po změření enzymové aktivity mGCPIII s použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG byly získány tyto kinetické parametry:

$$K_M = 2\,800 \pm 200 \text{ nM } (7\,\%);\ k_{cat} = 21{,}8 \pm 0{,}9 \text{ s}^{-1}\ (4\,\%).$$

V *tab*. 5 uvádíme srovnání námi naměřených hodnot s údaji pro podobné reakce publikované v literatuře.

***Tabulka 5*. Porovnání získaných parametrů pro štěpení BCG s publikovanými výsledky.**

Protein	K_M [nM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/K_M [1/sM]	Podmínky	Zdroj
GCPII	7000	0,0008	$1{,}7 \cdot 10^2$	25mM BTP; pH 7,5	*49*
GCPIII	300	0,05	$1{,}8 \cdot 10^5$		
GCPIII, Ca^{2+}	1000	12	$1{,}33 \cdot 10^7$	25mM BTP; pH 7,5; 2,5mM Ca^{2+}	
mGCPIII	2800 ± 200	21,8 ± 0,9	$(7{,}8 \pm 0{,}2) \cdot 10^6$	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 5 mM $CaCl_2$; 0,1% Tween 20; pH 7,4	Tato bakalářská práce

Porovnáme-li tato data (*tab. 5*) s hodnotami pro lidskou GCPIII v přítomnosti Ca^{2+} ($K_M \approx 1$ μM; $k_{cat} \approx 12$ s^{-1}), lidská GCPIII má 3,2x vyšší afinitu k BCG, ale mGCPIII přemění za sekundu 2x více substrátu. Rozdíl mezi enzymy může být způsoben použitím odlišných pufrů a především jiné koncentrace $CaCl_2$: v případě mGCPIII 5mM $CaCl_2$, v případě lidské GCPIII

2,5mM $CaCl_2$. Ca^{2+} ionty zvyšují efektivitu štěpení substrátu BCG[49]. Koncentrace 5mM $CaCl_2$ byla zvolena na základě předchozích experimentů provedených v naší laboratoři Mgr. Barborou Vorlovou, Ph.D. Rozdíl v získaných kinetických parametrech může být dále způsoben rozdílnými metodami měření. V případě měření aktivity lidské GCPIII byla použita metoda HPLC, v případě proteinu mGCPIII byla použita metoda štěpení tritiovaného substrátu.

5.5 Měření enzymové aktivity mGCPIII s použitím Pte-Glu$_2$

Po změření enzymové aktivity mGCPIII s použitím substrátu Pte-Glu$_2$ byly získány tyto kinetické parametry: $K_M = 900 \pm 100$ nM (9 %); $k_{cat} = 0{,}60 \pm 0{,}02$ s^{-1} (3 %).

V *tab.* 6 srovnáváme tyto hodnoty s dalšími publikovanými kinetickými konstantami pro homology GCPII:

***Tabulka 6*. Porovnání získaných parametrů pro štěpení Pte-Glu$_2$ s publikovanými výsledky.**

Protein	K_M [nM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/ K_M [1/sM]	Podmínky	Zdroj
rmGCPII	290 ± 20	3,63 ± 0,09	$(1{,}26 \pm 0{,}08) \cdot 10^7$	25mM BTP; 150mM NaCl; 0,001% $C_{12}E_8$; pH 7,4	[54]
rhGCPII	39 ± 2	5,09 ± 0,09	$(1{,}32 \pm 8) \cdot 10^8$		
mGCPIII	900 ± 100	0,60 ± 0,02	$(6{,}7 \pm 0{,}5) \cdot 10^5$	25mM BTP; 150mM NaCl; 1mM $ZnCl_2$; 0,001% $C_{12}E_8$; pH 7,4	Tato bakalářská práce

Jestliže srovnáme získané parametry (*tab. 6*) s rmGCPII (K_M = 290 ± 20 nM; $k_{cat} = 3{,}63 \pm 0{,}09$ s^{-1}) zjistíme, že rmGCPII má 3x vyšší afinitu k Pte-Glu$_2$ a přemění 6x více substrátu za sekundu. rmGCPII je účinnějším enzymem, přestože v případě proteinu mGCPIII reakční pufr obsahoval Zn^{2+} ionty, které podle publikovaných výsledků[49] mají v případě štěpení Pte-Glu$_2$ aktivační efekt.

6 Závěr

1. V S2 expresním systému byla připravena rekombinantní ektodoména myší glutamátkarboxypeptidasy III, mGCPIII.

2. Protein byl purifikován pomocí afinitní chromatografie a následně pomocí gelové permeační chromatografie. Enzymaticky aktivní dimerní forma proteinu byla zamražena pro následné měření kinetiky.

3. S použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]NAAG byly změřeny kinetické parametry K_M a k_{cat} reakce. Lidská GCPIII má 8x vyšší a rmGCPII má 2,4x nižší afinitu k substrátu. Lidská GCPIII přemění 3x více substrátu za sekundu a rmGCPII dokonce 9x více. Z hlediska štěpení NAAGu je lidská GCPIII účinnější než myší ortolog a myší GCPII je účinnější než myší GCPIII.

4. Měřením kinetiky s použitím [^{3}H]NAAG bylo zjištěno, že monomerní forma proteinu vykazuje mnohem menší aktivitu než dimer mGCPIII.

5. S použitím tritiovaného substrátu [^{3}H]BCG byly změřeny kinetické parametry K_M a k_{cat} reakce. Lidská GCPIII má 3,2x vyšší afinitu k BCG, ale mGCPIII přemění za sekundu 2x více substrátu. Z hlediska štěpení BCG jsou lidská GCPIII a mGCPIII srovnatelné, je vhodné využít myší model.

6. Byly změřeny kinetické parametry K_M a k_{cat} popisující štěpení substrátu $PteGlu_2$. rmGCPII má 3x vyšší afinitu k Pte-Glu_2 a přemění 6x více substrátu za sekundu než mGCPIII. Při měření kinetiky s $PteGlu_2$ je rmGCPII účinnějším enzymem.

7 Seznam zkratek

Ala	Alanin
APS	peroxodisíran amonný
Asx	aspartát, asparagin
BCG	β-citryl-L-glutamát
BTP	BIS-TRIS propan
Da	Daltony
DMSO	dimethylsulfoxid
FBS	fetální bovinní sérum
GCPII	glutamátkarboxypeptidasa II
GCPIII	glutamátkarboxypeptidasa III
Glu	kyselina glutamová
Glx	glutamát, glutamin
Gly	glycin
GPC	gelová permeační chromatografie
k_{cat}	číslo přeměny (turnover number)
kDa	1000 Daltonů
K_i	Inhibiční konstanta
K_M	Michaelisova konstanta
mGCPIII	rekombinantní ektodoména myší GCPIII se SLIN tagem
MOPS	3-(N-morpholin)propansulfonová kyselina
NAAG	*N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
Pte-Glu_2	pteroyl-L-$glutamát_2$
rhGCPII	rekombinantní lidská GCPII
rhGCPIII	rekombinantní lidská GCPIII
SB	vzorkový pufr
SDS	dodecylsulfát sodný

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultra Performance Liquid Chromatography)
v/v	objem kapalné látky v konečném objemu roztoku
w/v	hmotnost rozpuštěné látky v konečném objemu roztoku

8 Reference

[1] Hlouchova, K., Barinka, C., Klusak, V., Sacha, P., Mlcochova, P., Majer, P., Rulisek, L., and Konvalinka, J. (2007) Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III, *J Neurochem 101*, 682-696.

[2] Barinka, C., Rinnova, M., Sacha, P., Rojas, C., Majer, P., Slusher, B. S., and Konvalinka, J. (2002) Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II, *J Neurochem 80*, 477-487.

[3] Klusak, V., Barinka, C., Plechanovova, A., Mlcochova, P., Konvalinka, J., Rulisek, L., and Lubkowski, J. (2009) Reaction mechanism of glutamate carboxypeptidase II revealed by mutagenesis, X-ray crystallography, and computational methods, *Biochemistry 48*, 4126-4138.

[4] Barinka, C. (2003) Glutamate Carboxypeptidase II, Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze

[5] Mesters, J. R., Barinka, C., Li, W., Tsukamoto, T., Majer, P., Slusher, B. S., Konvalinka, J., and Hilgenfeld, R. (2006) Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer, *EMBO J 25*, 1375-1384.

[6] O'Keefe, D. S., Su, S. L., Bacich, D. J., Horiguchi, Y., Luo, Y., Powell, C. T., Zandvliet, D., Russell, P. J., Molloy, P. L., Nowak, N. J., Shows, T. B., Mullins, C., Vonder Haar, R. A., Fair, W. R., and Heston, W. D. (1998) Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene, *Biochim Biophys Acta 1443*, 113-127.

[7] Watt, F., Martorana, A., Brookes, D. E., Ho, T., Kingsley, E., O'Keefe, D. S., Russell, P. J., Heston, W. D., and Molloy, P. L. (2001) A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1, *Genomics 73*, 243-254.

[8] Huber, F., Montani, M., Sulser, T., Jaggi, R., Wild, P., Moch, H., Gevensleben, H., Schmid, M., Wyder, S., and Kristiansen, G. (2015) Comprehensive validation of published immunohistochemical prognostic biomarkers of prostate cancer -what has gone wrong? A blueprint for the way forward in biomarker studies, *Br J Cancer 112*, 140-148.

[9] Queisser, A., Hagedorn, S. A., Braun, M., Vogel, W., Duensing, S., and Perner, S. (2015) Comparison of different prostatic markers in lymph node and distant metastases of prostate cancer, *Mod Pathol 28*, 138-145.

[10] Horoszewicz, J. S., Kawinski, E., and Murphy, G. P. (1987) Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients, *Anticancer Res 7*, 927-935.

[11] Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P., and Murphy, G. P. (1998) Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases, *Cancer 82*, 2256-2261.

[12] Murphy, G., Ragde, H., Kenny, G., Barren, R., 3rd, Erickson, S., Tjoa, B., Boynton, A., Holmes, E., Gilbaugh, J., and Douglas, T. (1995) Comparison of prostate specific membrane antigen, and prostate specific antigen levels in prostatic cancer patients, *Anticancer Res 15*, 1473-1479.

[13] Gregorakis, A. K., Holmes, E. H., and Murphy, G. P. (1998) Prostate-specific membrane antigen: current and future utility, *Semin Urol Oncol 16*, 2-12.

[14] Xiao, Z., Adam, B. L., Cazares, L. H., Clements, M. A., Davis, J. W., Schellhammer, P. F., Dalmasso, E. A., and Wright, G. L., Jr. (2001) Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease, *Cancer Res 61*, 6029-6033.

[15] Schmidt, B., Anastasiadis, A. G., Seifert, H. H., Franke, K. H., Oya, M., and Ackermann, R. (2003) Detection of circulating prostate cells during radical prostatectomy by standardized PSMA RT-PCR: association with positive lymph nodes and high malignant grade, *Anticancer Res 23*, 3991-3999.

[16] Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., and Coyle, J. T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain, *J Biol Chem 262*, 14498-14506.

[17] Israeli, R. S., Powell, C. T., Corr, J. G., Fair, W. R., and Heston, W. D. (1994) Expression of the prostate-specific membrane antigen, *Cancer Res 54*, 1807-1811.

[18] Israeli, R. S., Powell, C. T., Fair, W. R., and Heston, W. D. (1993) Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen, *Cancer Res 53*, 227-230.

[19] Chandler, C. J., Wang, T. T., and Halsted, C. H. (1986) Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization, *J Biol Chem 261*, 928-933.

[20] Troyer, J. K., Beckett, M. L., and Wright, G. L., Jr. (1995) Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) in tissue extracts and body fluids, *Int J Cancer 62*, 552-558.

[21] Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D., and Cordon-Cardo, C. (1997) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues, *Clin Cancer Res 3*, 81-85.

[22] Chang, S. S., Reuter, V. E., Heston, W. D., Bander, N. H., Grauer, L. S., and Gaudin, P. B. (1999) Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature, *Cancer Res 59*, 3192-3198.

[23] Renneberg, H., Friedetzky, A., Konrad, L., Kurek, R., Weingartner, K., Wennemuth, G., Tunn, U. W., and Aumuller, G. (1999) Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissues: implication for the use of PSM reverse transcription polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread, *Urol Res 27*, 23-27.

[24] Lodder-Gadaczek, J., Becker, I., Gieselmann, V., Wang-Eckhardt, L., and Eckhardt, M. (2011) N-acetylaspartylglutamate synthetase II synthesizes N-acetylaspartylglutamylglutamate, *J Biol Chem 286*, 16693-16706.

[25] Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C., and Konvalinka, J. (2014) Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-l-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II, *FEBS J 281*, 3228-3242.

[26] Pinto, J. T., Suffoletto, B. P., Berzin, T. M., Qiao, C. H., Lin, S., Tong, W. P., May, F., Mukherjee, B., and Heston, W. D. (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells, *Clin Cancer Res 2*, 1445-1451.

[27] Slusher, B. S., Vornov, J. J., Thomas, A. G., Hurn, P. D., Harukuni, I., Bhardwaj, A., Traystman, R. J., Robinson, M. B., Britton, P., Lu, X. C., Tortella, F. C., Wozniak, K. M., Yudkoff, M., Potter, B. M., and Jackson, P. F. (1999) Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury, *Nat Med 5*, 1396-1402.

[28] Harada, C., Harada, T., Slusher, B. S., Yoshida, K., Matsuda, H., and Wada, K. (2000) N-acetylated-alpha-linked-acidic dipeptidase inhibitor has a neuroprotective effect on mouse retinal ganglion cells after pressure-induced ischemia, *Neurosci Lett 292*, 134-136.

[29] Zhang, W., Slusher, B., Murakawa, Y., Wozniak, K. M., Tsukamoto, T., Jackson, P. F., and Sima, A. A. (2002) GCPII (NAALADase) inhibition prevents long-term diabetic neuropathy in type 1 diabetic BB/Wor rats, *J Neurol Sci 194*, 21-28.

[30] Ghadge, G. D., Slusher, B. S., Bodner, A., Canto, M. D., Wozniak, K., Thomas, A. G., Rojas, C., Tsukamoto, T., Majer, P., Miller, R. J., Monti, A. L., and Roos, R. P. (2003) Glutamate carboxypeptidase II inhibition protects motor neurons from death in familial amyotrophic lateral sclerosis models, *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, 9554-9559.

[31] Subasinghe, N., Schulte, M., Chan, M. Y., Roon, R. J., Koerner, J. F., and Johnson, R. L. (1990) Synthesis of acyclic and dehydroaspartic acid analogues of Ac-Asp-Glu-OH and their inhibition of rat brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALA dipeptidase), *J Med Chem 33*, 2734-2744.

[32] Jackson, P. F., Cole, D. C., Slusher, B. S., Stetz, S. L., Ross, L. E., Donzanti, B. A., and Trainor, D. A. (1996) Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase, *J Med Chem 39*, 619-622.

[33] Nan, F., Bzdega, T., Pshenichkin, S., Wroblewski, J. T., Wroblewska, B., Neale, J. H., and Kozikowski, A. P. (2000) Dual function glutamate-related ligands: discovery of a novel, potent inhibitor of glutamate carboxypeptidase II possessing mGluR3 agonist activity, *J Med Chem 43*, 772-774.

[34] Whelan, J. (2000) NAALADase inhibitors: A novel approach to glutamate regulation, *Drug Discov Today 5*, 171-172.

[35] Neale, J. H., Olszewski, R. T., Gehl, L. M., Wroblewska, B., and Bzdega, T. (2005) The neurotransmitter N-acetylaspartylglutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia, *Trends Pharmacol Sci 26*, 477-484.

[36] Tsukamoto, T., Majer, P., Vitharana, D., Ni, C., Hin, B., Lu, X. C., Thomas, A. G., Wozniak, K. M., Calvin, D. C., Wu, Y., Slusher, B. S., Scarpetti, D., and Bonneville, G. W. (2005) Enantiospecificity of glutamate carboxypeptidase II inhibition, *J Med Chem 48*, 2319-2324.

[37] Zhou, J., Neale, J. H., Pomper, M. G., and Kozikowski, A. P. (2005) NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy, *Nat Rev Drug Discov 4*, 1015-1026.

[38] Tsai, G., Dunham, K. S., Drager, U., Grier, A., Anderson, C., Collura, J., and Coyle, J. T. (2003) Early embryonic death of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) homozygous mutants, *Synapse 50*, 285-292.

[39] Han, L., Picker, J. D., Schaevitz, L. R., Tsai, G., Feng, J., Jiang, Z., Chu, H. C., Basu, A. C., Berger-Sweeney, J., and Coyle, J. T. (2009) Phenotypic characterization of mice heterozygous for a null mutation of glutamate carboxypeptidase II, *Synapse 63*, 625-635.

[40] Bacich, D. J., Ramadan, E., O'Keefe, D. S., Bukhari, N., Wegorzewska, I., Ojeifo, O., Olszewski, R., Wrenn, C. C., Bzdega, T., Wroblewska, B., Heston, W. D., and Neale, J. H. (2002) Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate, *J Neurochem 83*, 20-29.

[41] Gao, Y., Xu, S., Cui, Z., Zhang, M., Lin, Y., Cai, L., Wang, Z., Luo, X., Zheng, Y., Wang, Y., Luo, Q., Jiang, J., Neale, J. H., and Zhong, C. (2015) Mice lacking glutamate carboxypeptidase II develop normally, but are less susceptible to traumatic brain injury, *J Neurochem 134*, 340-353.

[42] Vorlova, B., Sedlak, F., Kasparek, P., Sramkova, K., Maly, M., Zamecnik, J., Sacha, P., and Konvalinka, J. (2019) A novel PSMA/GCPII-deficient mouse model shows enlarged seminal vesicles upon aging, *Prostate 79*, 126-139.

[43] Pangalos, M. N., Neefs, J.-M., Somers, M., Verhasselt, P., Bekkers, M., van der Helm, L., Fraiponts, E., Ashton, D., and Gordon, R. D. (1999) Isolation and Expression of Novel

Human Glutamate Carboxypeptidases with N-Acetylated α-Linked Acidic Dipeptidase and Dipeptidyl Peptidase IV Activity, *Journal of Biological Chemistry 274*, 8470-8483.

[44] Fitch, W. M. (2000) Homology a personal view on some of the problems, *Trends Genet 16*, 227-231.

[45] Hlouchova, K., Navratil, V., Tykvart, J., Sacha, P., and Konvalinka, J. (2012) GCPII variants, paralogs and orthologs, *Curr Med Chem 19*, 1316-1322.

[46] Miyake, M., Innami, T., and Kakimoto, Y. (1983) A beta-citryl-L-glutamate-hydrolysing enzyme in rat testes, *Biochim Biophys Acta 760*, 206-214.

[47] Bzdega, T., Crowe, S. L., Ramadan, E. R., Sciarretta, K. H., Olszewski, R. T., Ojeifo, O. A., Rafalski, V. A., Wroblewska, B., and Neale, J. H. (2004) The cloning and characterization of a second brain enzyme with NAAG peptidase activity, *J Neurochem 89*, 627-635.

[48] Collard, F., Vertommen, D., Constantinescu, S., Buts, L., and Van Schaftingen, E. (2011) Molecular identification of beta-citrylglutamate hydrolase as glutamate carboxypeptidase 3, *J Biol Chem 286*, 38220-38230.

[49] Navratil, M., Tykvart, J., Schimer, J., Pachl, P., Navratil, V., Rokob, T. A., Hlouchova, K., Rulisek, L., and Konvalinka, J. (2016) Comparison of human glutamate carboxypeptidases II and III reveals their divergent substrate specificities, *FEBS J 283*, 2528-2545.

[50] Miyake, M., Kakimoto, Y., and Sorimachi, M. (1978) Isolation and identification of beta-citryl-L-glutamic acid from newborn rat brain, *Biochim Biophys Acta 544*, 656-666.

[51] Miyake, M., Kume, S., and Kakimoto, Y. (1982) Correlation of the level of beta-citryl-L-glutamic acid with spermatogenesis in rat testes, *Biochim Biophys Acta 719*, 495-500.

[52] Hamada-Kanazawa, M., Kouda, M., Odani, A., Matsuyama, K., Kanazawa, K., Hasegawa, T., Narahara, M., and Miyake, M. (2010) beta-Citryl-L-glutamate is an endogenous iron chelator that occurs naturally in the developing brain, *Biol Pharm Bull 33*, 729-737.

[53] Zhang, A. X., Murelli, R. P., Barinka, C., Michel, J., Cocleaza, A., Jorgensen, W. L., Lubkowski, J., and Spiegel, D. A. (2010) A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules, *J Am Chem Soc 132*, 12711-12716.

[54] Knedlik, T., Vorlova, B., Navratil, V., Tykvart, J., Sedlak, F., Vaculin, S., Franek, M., Sacha, P., and Konvalinka, J. (2017) Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has a similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII, *FEBS Open Bio 7*, 1362-1378.

[55] Tykvart, J., Sacha, P., Barinka, C., Knedlik, T., Starkova, J., Lubkowski, J., and Konvalinka, J. (2012) Efficient and versatile one-step affinity purification of in vivo biotinylated proteins: expression, characterization and structure analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II, *Protein Expr Purif 82*, 106-115.

[56] Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B., and Marz, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins, *Glycoconj J 16*, 109-123.