

Abstrakt

Glutamát karboxypeptidasa II (GCPII) je zinek-dependentní karboxypeptidasa s vysokou hladinou exprese u karcinomu prostaty. Vzhledem k tomu, že daný enzym představuje ověřený cíl pro terapii a zobrazování rakoviny, je vývoj nových ligandů specifických pro GCPII stále předmětem aktivního akademického a průmyslového výzkumu. Stávající analýzy pro screening knihoven inhibitorů a stanovení účinnosti inhibitorů nejsou však optimální.

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj malých interně zhášených sond, které by mohly být použity pro kontinuální měření enzymatické aktivity GCPII. Tyto sondy jsou odvozeny z přirozených substrátů GCPII a sestávají z páru fluorofor/zhášec spojeného GCPII-hydrolyzovatelným linkerem. Nejprve jsem charakterizovala biofyzikální vlastnosti sond a poté stanovila kinetické parametry jejich hydrolýzy GCPII. Optimalizovaná metoda pro stanovení karboxypeptidasové aktivity byla použita pro určení IC₅₀ u několika GCPII-specifických inhibitorů. Nakonec komplexy mezi neaktivním enzymem a uvedenými sondami byly kokrytalizovány, a pro jeden z komplexů byly provedeny upřesnění a analýza struktury. Naše data naznačují, že sondy jsou zapojeny do nekovalentních interakcí se stejnými aminokyselinovými zbytky aktivního místa enzymu jako přirozené substráty. Vyvinutá analýza může být optimalizována pro vysokovýkonný screening knihoven malých sloučenin pro hledání potenciálních inhibitorů GCPII.

Klíčová slova: glutamát karboxypeptidasa II, interně zhášené fluorescenční sondy, enzymová kinetika, X-ray krystalografie