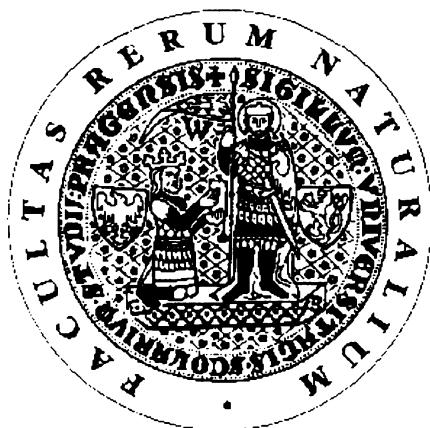


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie



Bakalářská práce

Myší glutamát karboxypeptidasa II: klonování, exprese a aktivita

Tomáš Knedlík

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

Praha 2008

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233218488

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 856/08 stud.
(biochemie)*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením svého školitele Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 3. 6. 2008

Tomáš Kredlík
.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. V první řadě děkuji mému školiteli Janu Konvalinkovi za velmi přátelský a laskavý přístup a za mnoho pomoci a rad (nejen) během tvorby této práce. Mirka Rovenská a Pavlík Šácha byli těmi, kteří mě provázeli na mých prvních biochemických krůčcích, a za jejich ochotu, podporu a především trpělivost jim patří moje velké poděkování. Nemohu zapomenout na Peťuchu a Klárku - nejenom za jejich častou pomoc, ale také za jejich pozitivní a optimistický vliv jsem jim velmi vděčný. Bimči, JaněJ, Hillary, klukům z GCPII a HIVákům děkuji za to, že díky nim byla atmosféra v laboratoři i mimo ni velice přátelská a příjemná.

Dále bych chtěl poděkovat celé své rodině za podporu, která se mi celý život od nich dostává. Děkuji také Veronice, která mi byla velkou oporou nejen během psaní této práce.

Obsah

Seznam zkratk	3
1. Úvod	5
2. Teoretická část	6
2.1 GCPII na úrovni DNA	6
2.2 GCPII na úrovni mRNA	6
2.2.1 Alternativní sestřih	6
2.2.1.1 PSM'	7
2.2.1.2 PSM-C	8
2.2.1.3 PSM-D	8
2.2.1.4 PSM-E	8
2.3 GCPII na úrovni proteinu	9
2.3.1 Enzymatické aktivity GCPII	9
2.3.1.1 NAALADasová aktivita GCPII	9
2.3.1.2 Foláthydrolasová aktivita GCPII	10
2.3.2 Struktura GCPII	11
2.3.2.1 Celková struktura GCPII	11
2.3.2.2 Glykosylace GCPII	13
2.3.2.3 Aktivní místo GCPII	13
2.3.2.4 Mechanismus katalyzované reakce	14
2.4 GCPII a neuropatologie	14
2.4.1 Neurotransmitery glutamát a NAAG	14
2.4.2 Glutamátová excitotoxicita	15
2.4.3 GCPII jako terapeutický cíl při mozkové mrtvici	16
2.5 GCPII a její role v prostatě	16
2.5.1 Exprese GCPII v prostatě a karcinomu prostaty	16
2.5.2 Strategie diagnostiky rakoviny prostaty využívající GCPII	17
2.6 Homology lidské GCPII	17
2.6.1 Myší GCPII	17
2.6.2 Prasečí a krysí GCPII	18
3. Cíle práce	20
4. Experimentální část	21
4.1 Materiál	21
4.2 Přístroje	23
4.3 Metody	24
4.3.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	24
4.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza	25
4.3.3 Extrakce DNA z agarosového gelu	25
4.3.4 TOPO TA-klonování	25
4.3.5 Štěpení, defosforylace a ligace DNA	26
4.3.6 Cílená mutagenese s využitím PCR	27
4.3.7 Přečištění DNA ze směsi po mutagenesi	28
4.3.8 Transformace bakterií <i>E. coli</i> DH5 α	28

4.3.9 Midipreparace plasmidové DNA	29
4.3.10 Stanovení koncentrace DNA.....	29
4.3.11 Sekvenování plasmidové DNA.....	29
4.3.12 Maxipreparace plasmidové DNA (s využitím PEG 8000).....	30
4.3.13 Purifikace plasmidové DNA (pro transfekci do savčích buněk).....	31
4.3.14 Transfekce savčích buněk	32
4.3.15 Sklizení, promytí a homogenizace savčích buněk	32
4.3.16 Stanovení koncentrace celkového proteinu v lyzátu savčích buněk	32
4.3.17 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukujících podmínek (SDS-PAGE).....	33
4.3.18 Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western Blot).....	33
4.3.19 Barvení polyakrylamidového gelu stříbrem.....	34
4.3.20 Měření aktivity myší GCPII (v lyzátu transfekovaných buněk HEK293) s použitím radionuklidu	35
5. Výsledky	36
5.1 Klonování genu pro myší GCPII do plasmidu pcDNA4.....	36
5.2 Mutageneze G240A	37
5.3 Mutageneze E287N.....	39
5.4 Klonování cDNA mGCPII do plasmidu pTRE.....	40
5.5 Transfekce a exprese mGCPII	41
5.6 Měření aktivity hydrolýzy NAAG účinkem mGCPII	42
6. Diskuze.....	43
7. Závěr.....	45
8. Seznam citované literatury	46

Seznam zkratek

[³ H]NAAG	N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát značený tritiem
2-PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová
7E11-C5.3	myší monoklonální protilátka proti GCPII
APS	peroxidisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
bp	pár bází (z angl. base-pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	Úřad pro schvalování léčiv a potravin (z angl. Food and Drug Administration)
FOLH	foláthydrolasa
GCPII	glutamátkarboxypeptidasa II
GCPIII	glutamátkarboxypeptidasa III
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
HEK293	buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinových buněk (z angl. human embryonic kidney cells)
IUBMB	Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (z angl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
kDa	kilodalton
kb	tisíc párů bází
LNCaP	buněčná linie odvozená od metastáz karcinomu prostaty do lymfatických uzlin (z angl. lymph node carcinoma of the prostate)
MCAO	uzavření cévy arteria cerebri media (z angl. middle cerebral artery occlusion)
mGCPII	myší glutamátkarboxypeptidasa II
mGluR	metabotropní glutamátové receptory
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAA	N-acetyl-L-aspartát

NAAG	N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát
NAALADasa	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase
NAALADasaL	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PC-3	buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty
PSM'	alternativně sestřižená forma GCPII
PSMA	membránový antigen specifický pro prostatu (z angl. prostate-specific membrane antigen)
PSM-C	alternativně sestřižená forma GCPII
PSM-D	alternativně sestřižená forma GCPII
PSM-E	alternativně sestřižená forma GCPII
rhGCPII	rekombinantní lidská GCPII
RIS	radioimunoscintigrafie
RT-PCR	z angl. reverse transcriptase polymerase chain reaction
TEMED	tetramethylethylendiamin
TfR	transferinový receptor
TGF- β	transformující růstový faktor β (z angl. transforming growth factor)
wt	přirozená forma (z angl. wild-type)

1. Úvod

Lidská glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII, E.C. 3.4.17.21) je transmembránová metalopeptidasa, jež je exprimována v mnoha tkáních lidského těla, zejména v prostatě, mozku, ledvinách a tenkém střevě [1, 2]. Díky faktu, že se vyskytuje v rozličných orgánech, byla nejprve studována pod několika různými jmény, aniž se vědělo, že se jedná o tentýž protein – v mozku jako NAALADasa (z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase), v tenkém střevě jako foláthydrolasa (FOLH) neboli folylpoly- γ -glutamátcarboxypeptidasa a v prostatě jako „membránový antigen specifický pro prostatu“ (PSMA; z angl. prostate-specific membrane antigen). Teprve po deseti letech bylo rozpoznáno, že se jedná o jeden a tentýž protein, který byl na doporučení Názvoslovné komise IUBMB pojmenován glutamátcarboxypeptidasa II [3, 4, 5]. I přes toto doporučení se ale v jednotlivých oborech stále můžeme setkat se všemi uvedenými názvy GCPII. V této práci je užívání „nedoporučených“ názvů GCPII omezeno na minimum, použity byly jen v případech, kde usnadnily orientaci v dané problematice.

I přes intenzivní výzkum je funkce GCPII ve většině orgánů stále neznámá, výjimku tvoří mozek a tenké střevo. V mozku GCPII hydrolyzuje neurotransmiter N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát (NAAG) na N-acetyl-L-aspartát (NAA) a volný glutamát (tzv. NAALADasová aktivita) [6], čímž se podílí na regulaci dějů na synapsi. V tenkém střevě člověka a prasete odštěpuje koncové glutamáty z pteroylpoly- γ -glutamátu za vzniku pteroylglutamátu (tj. folátu), což umožňuje vstřebávání různorodé směsi polyglutamylovaných folátů přijatých v potravě přes střevní stěnu (tzv. foláthydrolasová aktivita) [4]. V prostatě je fyziologická funkce GCPII neznámá, protože však během vývoje nádoru prostaty dochází ke zvýšení exprese GCPII, využívá se jako marker tohoto zhoubného onemocnění [7].

GCPII se vyskytuje nejenom u člověka; orthology lidské GCPII byly popsány například u krysy, prasete či myši. Myší protějšek GCPII vykazuje 86% identitu a 91% podobnost aminokyselinové sekvence s lidskou GCPII. Navíc myší GCPII vykazuje, stejně jako lidská GCPII, NAALADasovou a foláthydrolasovou aktivitu [8].

GCPII se již využívá při diagnostice nádorových onemocnění prostaty a mohla by se stát i významným terapeutickým cílem v léčbě nádorů prostaty a mozkových onemocnění. Myš a myší ortholog lidské GCPII by mohly představovat vhodný zvířecí model, který je potřebný pro vývoj nových léčebně-diagnostických metod. Proto jsme se rozhodli tento enzym připravit v rekombinantní formě a charakterizovat jej.

2. Teoretická část

2.1 GCPII na úrovni DNA

Gen pro lidskou GCPII se skládá z 19 exonů a 18 intronů, má velikost zhruba 62 kb genomové DNA [9] a nachází se na chromosomu 11 [10]. Studie určily lokus 11p11-p12 jako gen kódující GCPII a lokus 11q14 označily jako sídlo genu homologního s GCPII [9]. Lokus 11q14 byl poté přiřazen genu pro GCPIII (glutamátcarboxypeptidasa III), enzym velmi příbuzný GCPII [11].

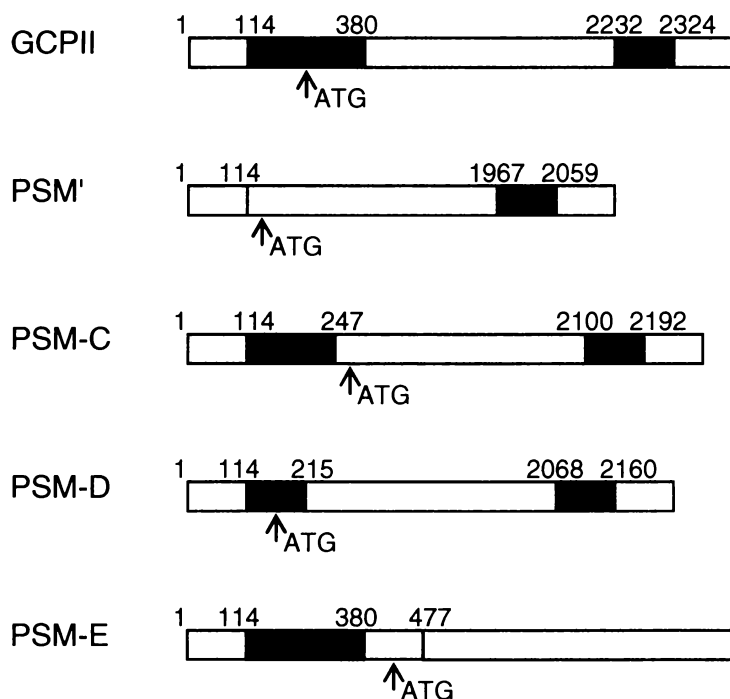
Na chromosomu 11 (lokus 11q12) byl lokalizován i gen pro třetí příbuzný enzym NAALADasuL (z angl. NAALADasa-like) [11].

2.2 GCPII na úrovni mRNA

Zpočátku se všeobecně věřilo, že mRNA GCPII je exprimována specificky pouze v prostatě. Později bylo metodou „ribonuclease protection assay“ prokázáno, že mRNA je sice exprimována především v prostatě, ale v určitém množství i v lidském mozku, slinných žlázách a v tenkém střevě [12]. Následně byla tato mRNA detekována pomocí RT-PCR (z angl. reverse-transcriptase polymerase chain reaction) v mnoha různých lidských tkáních – ve varlatech, nadvarlatech, semenných váčcích, srdci, játrech, plicích, ledvinách, brzlíku a štítné žláze [13]. Tato práce naznačila, že exprese GCPII není omezena pouze na prostatu [13]. Exprese mRNA GCPII i v jiných tkáních než v prostatě byla potvrzena i dalšími skupinami [11, 14].

2.2.1 Alternativní sestřih

GCPII (zde je vhodné připomenout i její další název „prostate-specific membrane antigen, PSMA) je kódována mRNA o délce 2653 nukleotidů [7]. V prostatě jsou ale známy i další, alternativně sestřižené formy mRNA GCPII – PSM', PSM-C, PSM-D a PSM-E. Nejdéle známou variantou je PSM' objevená Su *et al.* roku 1995 (Obr. 1, str. 7).



Obr. 1: cDNA GCPII (PSMA) a jejích čtyř alternativně sestřižených variant

Čísla značí jednotlivé nukleotidy, ATG signál pro zahájení translace (iniciační kodon pro Met). V sekvenci PSM' jsou nukleotidy 114 – 380 genomové sekvence GCPII odstraněny alternativním sestřihem (červeně v GCPII). PSM-C a PSM-D využívají stejné donorové sestřihové místo jako PSM' (nukleotid 114), ale odlišné akceptorové sestřihové místo nacházející se v intronu genu pro GCPII, což vede ke vzniku nového exonu (fialově, resp. zeleně). PSM-E obsahuje ve srovnání s GCPII insertovanou oblast 97 nukleotidů (žlutě); zároveň je v její sekvenci deletována oblast 93 nukleotidů přítomná v ostatních variantách (hnědě). Upraveno podle [15, 16].

2.2.1.1 PSM'

Při zkoumání exprese mRNA GCPII ve zdravé prostatě pomocí RT-PCR byla identifikována kromě běžné mRNA GCPII i její alternativně sestřižená forma označovaná jako PSM'. Transkripce PSM' začíná od stejného promotoru jako transkripce GCPII, ale alternativním sestřihem dochází k delecí 266 nukleotidů blízko 5'-konce mRNA GCPII (nukleotidy 114 – 380) [17].

mRNA PSM' je tudíž kratší (2387 nukleotidů) oproti mRNA GCPII (2653 nukleotidů). Chybějící oblast obsahuje iniciační kodon pro translaci a kodony pro intracelulární a transmembránovou část GCPII [7]. Translace mRNA PSM' proto využívá nový iniciační kodon [17] a produkuje tak cytosolární protein, který postrádá prvních 59 aminokyselin přítomných v GCPII [17].

2.2.1.2 PSM-C

Transkripce PSM-C začíná na stejném místě jako v případě GCPII a PSM'. PSM-C obsahuje stejné donorové sestřihové místo jako PSM' (nukleotid 114), ale využívá jiné akceptorové sestřihové místo, které se nachází v intronu 1 genu pro GCPII. Transkripcí tak vzniká mRNA obsahující 133 nukleotidů navíc ve srovnání s PSM'. Za zmínku stojí fakt, že PSM-C využívá stejný iniciační kodon pro translaci jako PSM' a translace by tak vedla k produkci proteinu identického s PSM' [18].

2.2.1.3 PSM-D

Při sestřihu za vzniku PSM-D se využívá stejné donorové sestřihové místo jako v případě PSM' a unikátní akceptorové sestřihové místo nacházející se v intronu 1 genu pro GCPII. PSM-D tak obsahuje nový exon, ve kterém se nachází i nový iniciační kodon pro translaci [18].

2.2.1.4 PSM-E

cDNA PSM-E obsahuje ve srovnání s GCPII nový exon – oblast o velikosti 97 nukleotidů insertovanou do cDNA GCPII; zároveň je v sekvenci cDNA PSM-E deletována oblast o velikosti 93 nukleotidů. Kromě těchto dvou rozsáhlých inzercí/delecí se obě sekvence liší ještě ve dvou nukleotidech [15], ovšem je otázkou, zda tyto bodové mutace nevznikly v průběhu experimentu.

S využitím RT-PCR byla mRNA PSM-E detekována pouze v nádorech prostaty a v buňkách LNCaP, nikoliv v buňkách PC-3 a v dalších testovaných neprostatických nádorech (nádory ledvin, močového měchýře, prsu, ilea či duodena) [15]. To je podstatný rozdíl oproti mRNA GCPII, kterou je možno detekovat ve velkém množství jak v normální prostatě, v nádorové prostatě a v buňkách LNCaP, tak v menším množství i v neprostatických nádorech.

Díky faktu, že PSM-E je specificky exprimována pouze v nádorech prostaty a nikoliv v jiných nádorech [15], by mohla PSM-E sloužit jako nový a vhodnější marker pro nádorová onemocnění prostaty namísto GCPII. Exprese mRNA PSM-E v rakovině prostaty je stejně jako v případě GCPII závislá na stupni malignity nádoru [15].

2.3 GCPII na úrovni proteinu

2.3.1 Enzymatické aktivity GCPII

GCPII se vyznačuje dvěma enzymatickými aktivitami:

1. NAALADasovou aktivitou, která spočívá v hydrolyze dipeptidu N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamátu (NAAG) [6]
2. foláthydrolasovou aktivitou, jež je spojena s odštěpováním koncových glutamátů z polyglutamylovaných folátů [4]

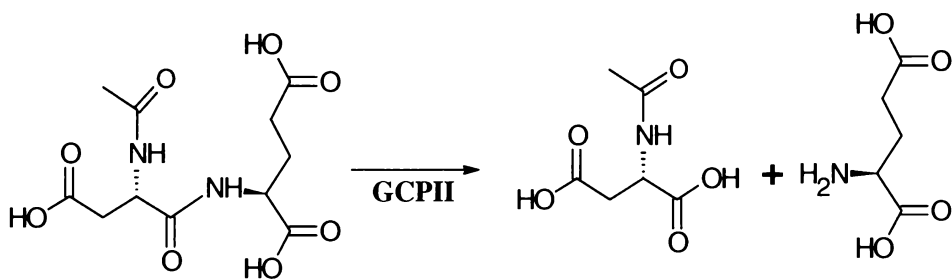
2.3.1.1 NAALADasová aktivita GCPII

První z enzymových aktivit GCPII se vztahuje k jejímu výskytu v mozku, kde se nachází v membráně astrocytů [2, 19, 20]. GCPII se tak může účastnit modulace dějů probíhajících na nervových synapsích, a to hydrolyzou svého endogenního substrátu, peptidového neurotransmiteru NAAG [21, 22]. NAAG je nejrozšířenějším peptidovým neurotransmiterem v savčím mozku, kde se vyskytuje ve vysokých koncentracích, zvláště pak v mozkovém kmeni [23].

Tato aktivita byla poprvé charakterizována *in vitro* na synaptosomálních membránách z krysího mozku Robinsonem *et al.* [6] a poté i dalšími skupinami [24, 25]. Později byla tato aktivita pozorována i *in vivo* za pomoci aplikace radioaktivně značeného substrátu ($[^3\text{H}]$ NAAG); současnou aplikací inhibitorů resp. aktivátorů GCPII byla potvrzena role této peptidasy jako enzymu katabolizujícího NAAG *in vivo* [26, 27].

Účinkem GCPII je peptidová vazba v NAAG, uvolněném do synaptické štěrbině, hydrolyzována za vzniku N-acetyl-L-aspartátu (NAA) a volného L-glutamátu (Obr. 2, str. 10).

Podrobněji je o GCPII, její roli v mozku a glutamátové excitotoxicitě pojednáno v kapitole 2.3.3 GCPII a neuropatologie.



N-acetyl-L-Asp- α -L-Glu (NAAG)

N-acetyl-L-Asp (NAA)

L-Glu

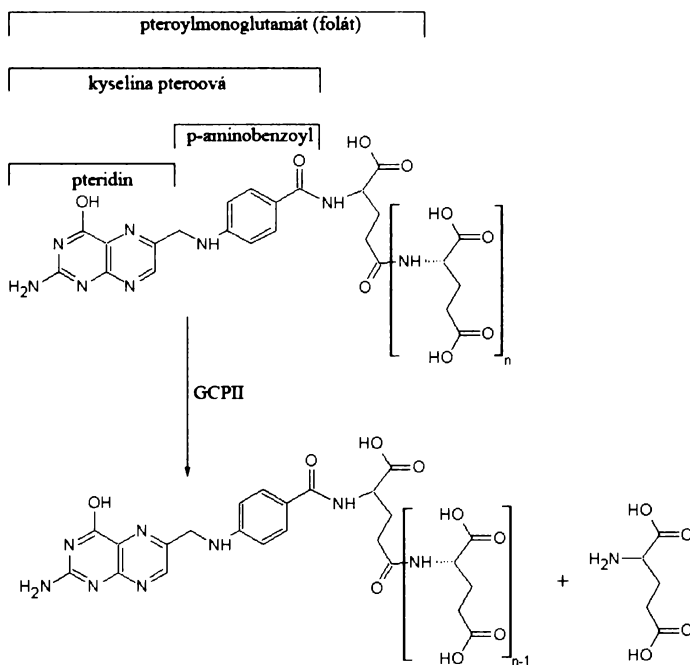
Obr. 2: Schéma hydrolyzy N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamátu (NAAG)

GCPII katalyzuje hydrolyzu neurotransmiteru NAAG; produkty reakce jsou N-acetyl-L-aspartát (NAA) a L-glutamát.

2.3.1.2 Foláthydrolasová aktivita GCPII

GCPII funguje i jako γ -glutamátcarboxypeptidasa (foláthydrolasa) zpracovávající glutamylované substráty na bázi folátu [4, 28].

GCPII je lokalizována na povrchu řasinkových buněk střevní sliznice [28, 29], kde odštěpuje terminální glutamát z folylpoly- γ -glutamátů (tj. z pteroylpoly- γ -glutamátů) [4, 28], jež jsou vedle NAAG dalšími endogenními substráty GCPII (Obr. 3).



Obr. 3: Vzorec folylpoly- γ -glutamátu a jeho hydrolyza GCPII

V tenkém střevě GCPII odštěpuje koncový glutamát z folylpoly- γ -glutamátu za uvolnění L-glutamátu. Upraveno podle [30].

Bylo pozorováno, že GCPII má velmi podobnou afinitu pro polyglutamylované deriváty folátu s různým počtem připojených glutamylů (2 až 5), avšak afinita k monoglutamylovaným derivátům je přibližně tisíckrát nižší [30].

Touto aktivitou se GCPII účastní trávení směsi folylpoly- γ -glutamátů přijatých v potravě [29], neboť polyglutamylovaná část je účinkem GCPII hydrolyzována za vzniku volného folátu [31, 32, 33], který je specifickým přenašečem transportován do buňky [34], kde je opětovně polyglutamylován a využit pro buněčný metabolismus [35, 36, 37].

2.3.2 Struktura GCPII

2.3.2.1 Celková struktura GCPII

Glutamátcarboxypeptidasa II je membránový glykoprotein II. typu o velikosti 750 aminokyselin [38]. GCPII je členem rodiny metalopeptidas M28, klanu MH. Rodina M28 se vyznačuje konzervovanými aminokyselinovými zbytky pro vazbu zinečnatých kationtů v aktivním místě a vazbu substrátu [39].

Na základě primární struktury byla predikována molekulová hmotnost GCPII okolo 84 kDa, ovšem v důsledku poměrně rozsáhlé glykosylace se molekulová hmotnost nativního proteinu pohybuje okolo 100 kDa [38, 40, 41].

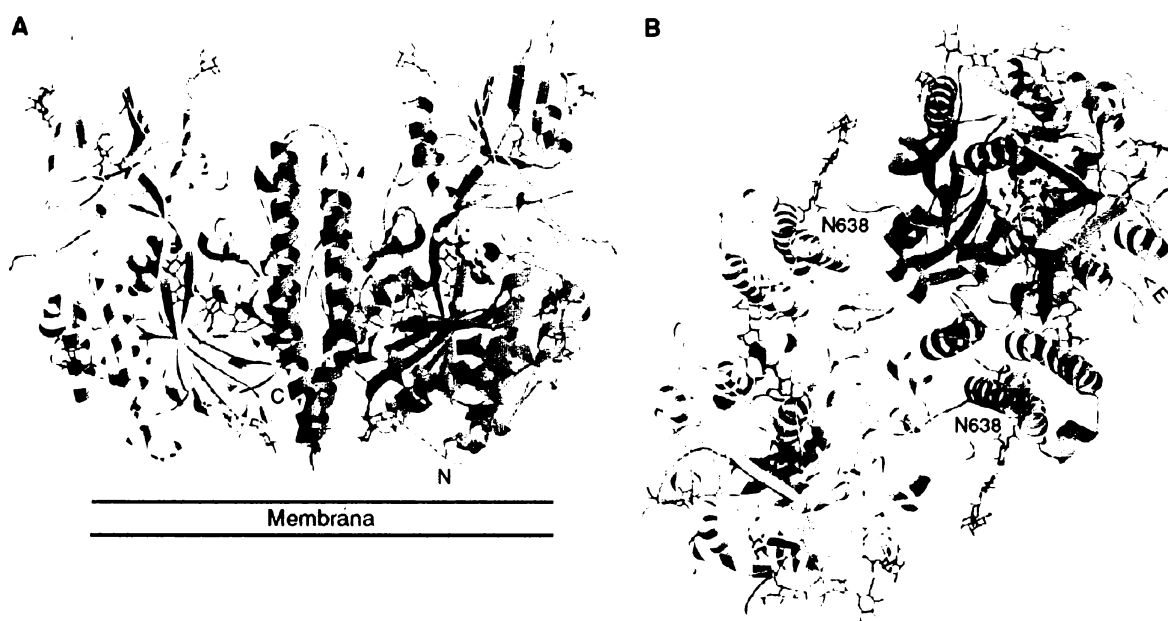
GCPII má krátkou N-koncovou cytosolární část složenou z 18 aminokyselin (aminokyseliny 1 – 18), následuje transmembránová část o velikosti 25 aminokyselin (19 – 43) a poté extracelulární část (44 – 750).

Část extracelulární domény GCPII vykazuje poměrně značnou homologii s transferinovým receptorem (54% podobnost na úrovni cDNA) [38]. Právě homologie GCPII s transferinovým receptorem (TfR1) umožnila predikovat doménovou organizaci GCPII (později se tato predikce ukázala jako chybná) a způsob jejího ukotvení v membráně [39]. Na základě homologie s aminopeptidasami rodiny M28 (konkrétně s aminopeptidasami ze *Streptomyces griseus* a *Vibrio proteolyticus*) bylo predikováno i katalytické místo GCPII [39].

Krystalové struktury extracelulární části rekombinantní lidské GCPII (rhGCPII) byly publikovány až poměrně nedávno [42, 43]. Tyto struktury ukázaly, že extracelulární část GCPII se skládá ze tří domén: proteasové (doména I, aminokyseliny 57 - 116 a 352 - 590), apikální (doména II, aminokyseliny 117 - 351) a C-koncové čili helikální (doména III, aminokyseliny 591 - 750), které se všechny tři podílí na vazbě substrátu a tvorbě aktivního místa (Obr. 4, str. 12) [42, 43]. Mesters *et al.* [43] publikovali krystalové struktury

glykosylované extracelulární části rhGCPII v komplexu se silným inhibitorem GPI-18431 (tj. kyselina (S)-2-(4-jodbenzylfosfonomethyl)pentandiová), se slabým inhibitorem fosfátem a s produktem hydrolýzy glutamátem. Tyto struktury odhalují různé uspořádání aktivního místa, což ukazuje na indukované přizpůsobení aktivního místa při reakci.

Krystalová struktura ukazuje GCPII jako nekovalentně asociovaný homodimer [43]; stejně tak i na povrchu nádorových buněk je GCPII exprimována jako homodimer [44]. Pro dimerizaci postačuje již ektodoména GCPII, a tak je možné, že dimerizuje i zkrácená cytosolární forma PSM' [44]. Dle Schülke *et al.* je enzymaticky aktivní pouze dimer GCPII, ovšem tato skutečnost ještě nebyla nezávisle potvrzena [44].



Obr. 4: Krystalová struktura extracelulární části lidské GCPII

A, B: Trojrozměrné struktury dimeru GCPII. Jedna podjednotka je šedá, druhá je zbarvena dle domén (proteasová modře, apikální žlutě, helikální červenohnědě). Zinečnaté kationty jsou znázorněny zelenými kuličkami, Cl⁻ pak žlutou a Ca²⁺ červenou. Inhibitor je znázorněn šedými kuličkami. Znázorněno je i sedm sacharidových zbytků (šedě). Přístup k aktivnímu místu je označen „E“ (na struktuře B). A, pohled *en face*; B, pohled shora. Upraveno podle [43].

V krystalové struktuře GCPII byly identifikovány kromě dvou zinečnatých kationtů, potřebných pro katalytickou aktivitu enzymu, další dva ionty: chloridový anion Cl⁻ a vápenatý kation Ca²⁺ [43]. Chloridový anion je lokalizován ve spodní části S1-podmísta a podílí se na stabilizaci argininových zbytků v aktivním místě [43, 45]. Vápenatý kationt je již příliš daleko od aktivního místa (více než 19 Å), než aby se mohl přímo účastnit katalýzy GCPII. Jeho role

spočívá spíše v tom, že pomocí koordinačních interakcí drží pohromadě domény I a II. Navíc hraje pravděpodobně i důležitou úlohu v dimerizaci monomerů [43].

2.3.2.2 Glykosylace GCPII

Lidská GCPII obsahuje ve své struktuře celkem 10 N-glykosylačních míst, která jsou všechna obsazena sacharidovými řetězci [28, 38, 46, 47].

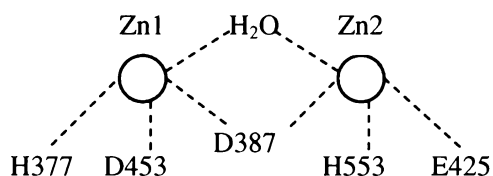
Glykosylace hraje důležitou roli pro správné sbalení proteinu a pro jeho následnou sekreci a subcelulární transport. Mutováním zmíněných N-glykosylačních míst bylo zjištěno, že jejich glykosylace je naprosto zásadní pro enzymatickou aktivitu proteinu [47].

Krystalové struktury GCPII ukázaly, že žádný z oligosacharidových řetězců není v přímém kontaktu s navázaným substrátem [42, 43]. Ztráta enzymatické aktivity v důsledku absence glykosylace tak pravděpodobně plyne z určitých nepřímých efektů, jako je např. špatné poskládání proteinu či blokování dimerizace [42].

2.3.2.3 Aktivní místo GCPII

Aktivní místo GCPII je tvořeno aminokyselinovými zbytky všech tří domén a z povrchu proteinu k němu vede asi 20 Å dlouhý tunel [43]. Nezastupitelnou úlohu v katalýze hrají dva zinečnaté kationty lokalizované v aktivním místě. Oba ionty jsou asymetricky přemostěny molekulou vody a β -karboxylátem Asp387. Dalšími ligandy jsou pro Zn(1) His377 a Asp453, pro Zn(2) Glu425 a His553 (Obr. 5). Speno *et al.* cílenou mutagenézí těchto aminokyselin prokázali, že tyto ligandy Zn^{2+} jsou nezbytné pro enzymatickou aktivitu GCPII [48].

Vzdálenosti mezi ligandy a kationty Zn^{2+} se mění v závislosti na tom, zda je aktivní místo volné či obsazené [39, 42, 43].



Obr. 5: Schématické znázornění ligandů Zn^{2+} v aktivním místě

Zinečnaté kationty jsou znázorněny žlutými kuličkami, jejich ligandy jsou popsány.

2.3.2.4 Mechanismus katalyzované reakce

Na základě trojrozměrných struktur GCPII a podle analogie s jinými metalopeptidasami byl navržen následující mechanismus reakce:

Náboj zinečnatých kationtů polarizuje vazbu O-H v molekule vody vázané v aktivním centru [49, 50]. Poté karboxylát Glu424 odejme z molekuly vody proton za vzniku hydroxidového aniontu vázaného na zinečnatý kation [43, 50, 51, 52, 53]. Vzniklý hydroxidový anion nukleofilně atakuje karbonylový uhlík (aktivovaný polarizací vazby C=O působením Zn^{2+}) peptidové vazby substrátu. Po rozštěpení peptidové vazby substrátu přenáší Glu424 proton na N-konec produktu (v případě NAAG na α -aminoskupinu glutamátu) [42, 43, 54, 55].

2.4 GCPII a neuropatologie

Jak již bylo zmíněno v kapitole o enzymatických aktivitách GCPII, hydrolýzou neurotransmiteru NAAG se GCPII podílí na modulaci glutamátové neurotransmise. Proto je studium její funkce významné z hlediska možného terapeutického využití.

2.4.1 Neurotransmitery glutamát a NAAG

L-Glutamát je nejrozšířenějším excitačním neurotransmiterem v savčí centrální nervové soustavě (CNS). Zvýšená množství glutamátu jsou však spojena s poruchami CNS [56].

NAAG je nejrozšířenějším peptidovým neurotransmiterem v nervovém systému savců [56, 57]. Nachází se jak v neuronech, tak v gliových buňkách, kde probíhá jeho enzymatická syntéza z N-acetylaspartátu (NAA) [58, 59].

NAAG specificky aktivuje receptory mGluR3 [60]. Spekuluje se, že je také smíšeným slabým agonistou/antagonistou NMDA receptorů [61]. NAAG je specificky inaktivován účinkem GCPII za vzniku N-acetyl-L-aspartátu a L-glutamátu [6], jak již bylo uvedeno.

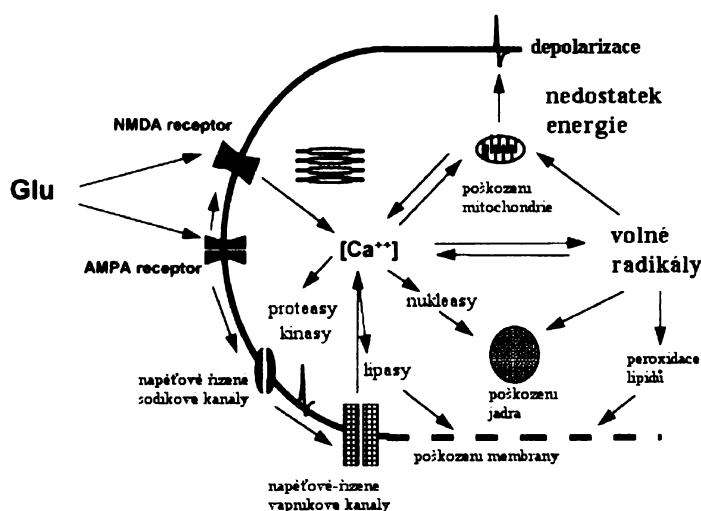
NAAG vykazuje neuroprotektivní účinek, neboť aktivuje receptory mGluR3 na gliových buňkách, což vede k sekreci ochranného transformujícího růstového faktoru β (TGF- β , z angl. transforming growth factor) [62].

2.4.2 Glutamátová excitotoxicita

Ačkoliv je glutamát naprosto nepostradatelný pro nervovou soustavu, je nadměrná koncentrace glutamátu spojena s poškozením a následnou smrtí neuronů [63]. Změněná množství glutamátu jsou spojována s mozkovou mrtvicí či neurodegenerativními chorobami jako jsou Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a schizofrenie [56, 64, 65].

V případě zvýšené koncentrace glutamátu dochází ke zvýšené excitaci glutamátových receptorů, což vede ke spuštění kaskády intracelulárních pochodů, které ve svém výsledku působí toxicky a mohou vést až k buněčné smrti (tzv. **excitotoxicita**) [66, 67].

Nedostatek kyslíku při ischemii vede ke snížení až zastavení procesu výroby ATP. To má za následek zastavení činnosti ATP-dependentních iontových pump, což vede k narušení iontové rovnováhy a následné depolarizaci, která umožní iontům (včetně Ca^{2+}) proniknout do buňky. V buňce po depolarizaci způsobí Ca^{2+} uvolnění glutamátu, který aktivuje NMDA receptory, jejichž excitace umožní další influx Ca^{2+} do buňky. Koncentrace Ca^{2+} v buňce vzroste také díky poškozené funkci membránového $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ přenašeče, jehož elektrochemická hnací síla je snížena depolarizací. Koncentrace intracelulárního Ca^{2+} je obvykle velmi nízká ($\sim 10^{-7}$ M) a zvýšení hladiny Ca^{2+} v buňce stimuluje aktivitu mnoha enzymů (nukleasy, lipasy, cytosolární proteasy aktivované Ca^{2+} , cytosolární kinasy závislé na Ca^{2+}), jejichž činnost vede až ke smrti buňky [67, 68] (Obr. 6).



Obr. 6: Schéma glutamátové excitotoxicity

Nedostatek energie v buňce způsobí depolarizaci, která vede ke zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} . Vysoká koncentrace Ca^{2+} v buňce aktivuje mnoho metabolických drah vedoucích až ke smrti buňky. Upraveno podle [67].

2.4.3 GCPII jako terapeutický cíl při mozkové mrtvici

Při mrtvici dochází k nedostatečnému prokrvení mozkové tkáně (ischemii). Jako model mozkové mrtvice u krysy se používá metoda uzavření cévy *arteria cerebri media* (MCAO, z angl. middle cerebral artery occlusion).

Bylo prokázáno, že selektivní inhibice GCPII výrazně snižuje poškození mozku při MCAO u krysy [69]. Neuroprotektivního účinku inhibicí GCPII se dosahuje dvěma mechanismy [56]:

1. snižuje se koncentrace volného glutamátu, jenž by působil excitotoxicky
2. zvyšuje se koncentrace NAAG, který je specifickým agonistou mGluR3 receptorů

Aktivace presynaptických receptorů mGluR3 vede k inhibici dalšího uvolnění neurotransmiterů (včetně glutamátu) z presynaptické buňky [70], aktivace gliových receptorů mGluR3 stimuluje uvolnění neuroprotektivních trofických faktorů, např. TGF- β [71, 72, 73].

Inhibice GCPII je zajímavým terapeutickým cílem, neboť její účinky jsou znatelné pouze při zvýšené glutamátové excitaci, tzn. inhibice GCPII neovlivňuje základní hladinu glutamátu, ale snižuje jeho nadměrné množství [74].

2.5 GCPII a její role v prostatě

Ačkoliv je GCPII ve zdravé prostatě exprimována ve velkém množství, je role GCPII v prostatě stále neznámá. I přes to je GCPII potenciálním cílem jak pro diagnostiku nádorových onemocnění prostaty, tak i pro jejich léčbu, a to díky zvýšení své exprese v karcinomu prostaty a membránové lokalizaci.

2.5.1 Exprese GCPII v prostatě a karcinomu prostaty

GCPII, v prostatě poprvé identifikovaná monoklonální protilátkou 7E11-C5.3 [75], je exprimována epiteliálními buňkami prostaty, a to jak zdravé, tak i neoplastické [75, 76].

V nádorech prostaty a jejich metastázách je exprese GCPII mnohonásobně zvýšena [76] a navíc závislá na koncentraci androgenů – při snížení hladiny androgenů (buď chirurgicky či medikamenty) dochází k dalšímu zvýšení exprese GCPII [77].

GCPII je také selektivně exprimována v neovaskulatuře (nově tvořených cévách) mnoha typů nádorů, avšak nebyla detekována v neovaskulatuře prostatických nádorů [1, 78, 79].

2.5.2 Strategie diagnostiky rakoviny prostaty využívající GCPII

Vhodná léčba nádorových onemocnění prostaty vyžaduje přesné informace o velikosti nádoru, jeho lokalizaci apod. V praxi se pro zjištění těchto informací používá radioimunoscintigrafie (RIS) využívající radioaktivně značené monoklonální protilátky [80].

Nejznámější radiografický test využívá radioimunokonjugátu monoklonální protilátky 7E11-C5.3 s indiem 111 (ProstaScint, Cytogen Corporation). ProstaScint byl schválen k užívání americkou FDA v roce 1997 [81].

2.6 Homology lidské GCPII

Homologie je příbuznost dvou libovolných znaků (proteinů, nukleových kyselin, apod.), které pocházejí ze společného předcházejícího znaku. Homologie je nejobecnější pojem a dále se rozlišuje na orthologii a paralogii.

Paralogie je příbuznost dvou znaků, která vznikla duplikací genu pro tento znak. Je tedy zřejmé, že paralogy se vyskytují v jednom organismu.

Orthologie je příbuznost dvou znaků, která vznikla oddělením dvou biologických druhů ze společného prapředka. Orthology tedy často plní stejnou funkci u dvou rozdílných organismů [82].

Myší, prasečí a krysí orthology lidské GCPII jsou taktéž transmembránovými metalopeptidasami, s předpokládánou podobnou topologií k lidské GCPII. Všechny tři orthology mají vysokou homologii primární sekvence s lidskou GCPII, zejména pak v oblasti aktivního místa a ligandů zinečnatých kationtů. Celkem 7 potenciálních glykosylačních míst je konzervováno u všech čtyř homologů [8, 28, 46] (Obr. 7, str. 19).

Zvířecí orthology lidské GCPII jsou důležité z toho pohledu, že vhodný zvířecí model je nepostradatelný pro vývoj a testování nových léčebných a diagnostických metod. U správného modelového organismu musí daný ortholog odpovídat lidské GCPII, zejména pokud jde o sekvenční podobnost, distribuci v tkáních, aktivitu či možnosti inhibice [83].

2.6.1 Myší GCPII

Myší GCPII je 752 aminokyselin dlouhá membránová metalopeptidasa, která vykazuje na úrovni aminokyselinové sekvence 86% identitu a 91% podobnost s lidskou GCPII.

Pozorovaná molekulová hmotnost okolo 100 kDa naznačuje, že je alespoň na některých ze svých 10 potenciálních glykosylačních míst glykosylována [84].

Při testování exprese myší GCPII na úrovni mRNA pomocí přenosu mRNA na membránu („Northern Blotting“) byl pozorován majoritní transkript o velikosti přibližně 2500 bp, který byl přítomen především v mozku a ledvinách, méně pak ve vaječnicích, varlatech a slinné žláze. Velmi překvapivě nebyla pozorována žádná exprese mRNA GCPII v myší prostatě a tenkém střevě, tedy dvou orgánech, které se u člověka vyznačují vysokou expresí GCPII [8]. Stejně tak nebyla u myší pozorována žádná alternativně sestřižená forma mRNA GCPII odpovídající např. PSM' [8, 85].

Myší GCPII vykazuje jak NAALADasovou, tak i foláthydrolasovou aktivitu, které je možné inhibovat klasickými inhibitory lidské GCPII [8].

2.6.2 Prasečí a krysí GCPII

Prasečí i krysí GCPII jsou stejně jako myší GCPII vysoce homologní s lidskou GCPII. Kompletní cDNA prasečí GCPII obsahuje otevřený čtecí rámeček 2253 nukleotidů, který kóduje 751 aminokyselin dlouhý protein s 91% identitou a 92% podobností s lidskou GCPII. V sekvenci prasečí GCPII se vyskytuje 12 potenciálních glykosylačních míst; díky glykosylaci je pozorovaná molekulová hmotnost proteinu okolo 120 kDa oproti 84 kDa deglykosylovaného enzymu [28].

V případě krysí GCPII obsahuje cDNA otevřený čtecí rámeček o velikosti 2256 nukleotidů, což odpovídá 752 aminokyselin dlouhému polypeptidu, který má 85% identitu a 89% podobnost s lidskou GCPII. Sekvence obsahuje 10 potenciálních N-glykosylačních míst, díky čemuž se molekulová hmotnost glykoproteinu pohybuje okolo 100 kDa [46, 86].

Nedávno byla publikována systematická studie zabývající se expresí a enzymatickou aktivitou GCPII v jednotlivých tkáních člověka, prasete a krysy [83]. Z výsledků plyne, že katalytická účinnost (k_{cat}/K_M) štěpení NAAG je u rekombinantních extracelulárních částí lidské, prasečí a krysí GCPII podobná. Co se týče exprese orthologů lidské GCPII v různých tkáních, bylo zjištěno, že v krysí a prasečí prostatě je prakticky zanedbatelné množství GCPII, stejně jako v krysím ileu a jejunu. To je podstatný rozdíl oproti příslušným lidským tkáním, ve kterých je exprese GCPII velmi vysoká [83].

	1				69
lidská GCPII	(1)	MWNLHQRDSDVATRRPRWAGALVLA-GFFGFLFGWFIKPNK-FL-ELKA			
myší GCPII	(1)	MWNRRDSDVATRRPRWAGALVLA-GFFGFLFGWFIKPNK-FL-ELKA			
prasečí GCPII	(1)	MWNPQRDSDVATRRPRWAGALVLA-GFFGFLFGWFIKPNK-FL-ELKA			
krysí GCPII	(1)	MWNQRDSDVATRRPRWAGALVLA-GFFGFLFGWFIKPNK-FL-ELKA			
					138
lidská GCPII	(68)	ENIKFLYNFTQI PHLAGTEINF LAKQIQWKEFGLDVELDYDVLSSYPNKT PNYISII EDGN			
myší GCPII	(70)	ENIKFLYNFTQI PHLAGTEINF LAKQIQWKEFGLDVELDYDVLSSYPNKT PNYISII EDGN			
prasečí GCPII	(69)	ENIKTFLYNFTQI PHLAGTEINF LAKQIQWKEFGLDVELDYDVLSSYPNKT PNYISII EDGN			
krysí GCPII	(70)	ENIKFLYNFTQI PHLAGTEINF LAKQIQWKEFGLDVELDYDVLSSYPNKT PNYISII EDGN			
					207
lidská GCPII	(137)	EIFTSLSEPPGYENSDVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMKICSGKI IARY			
myší GCPII	(139)	EIFKTSLSSEQPPGYENSDVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMKICSGKI IARY			
prasečí GCPII	(138)	EIFTSLSEPPGYENSDVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMKICSGKI IARY			
krysí GCPII	(139)	EIFKTSLAELSPPGYENSDVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMKICSGKI IARY			
					276
lidská GCPII	(206)	GFRGNVVKNAQLAGAKGILYSDPADYFAPVSYPDGWNLPGGGVQQRGNLNLNGAGDPLTPGYPA			
myší GCPII	(208)	GFRGNMVKNAQLAGAKGILYSDPADYFAPVSYPDGWNLPGGGVQQRGNLNLNGAGDPLTPGYPA			
prasečí GCPII	(207)	GFRGNVVKNAQLAGAKGILYSDPADYFAPVSYPDGWNLPGGGVQQRGNLNLNGAGDPLTPGYPA			
krysí GCPII	(208)	GFRGNVVKNAQLAGAKGILYSDPADYFAPVSYPDGWNLPGGGVQQRGNLNLNGAGDPLTPGYPA			
					345
lidská GCPII	(275)	NEAYRRGALAVGLPIPVHPIGYDAQKLEMGAPPDSSWGLLVPYVNGPGFAGNFSQKVK			
myší GCPII	(277)	NEAYRRGALAVGLPIPVHPIGYDAQKLEHMGAPPDSSWGLLVPYVNGPGFAGNFSQKVK			
prasečí GCPII	(276)	NEAYRRGALAVGLPRIIPVHPIGYDAQKLEMGAPPDSSWGLLVPYVNGPGFAGNFSQKVK			
krysí GCPII	(277)	NEAYRRGALAVGLPIPVHPIGYDAQKLEHMGAPPDSSWGLLVPYVNGPGFAGNFSQKVK			
					414
lidská GCPII	(344)	HIHSTEVRIYNVIGTLGAEPRDYVILGGHRDWWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRFGLLKKEGRP			
myší GCPII	(346)	HIHSTEVRIYNVIGTLGAEPRDYVILGGHRDWWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRFGLLKKEGRP			
prasečí GCPII	(345)	HIHSDVVKRIYNVIGTLGAEPRDYVILGGHRDWWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRFGLLKKEGRP			
krysí GCPII	(346)	HIHSTEVRIYNVIGTLGAEPRDYVILGGHRDWWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRFGLLKKEGRP			
					483
lidská GCPII	(413)	RRTLFASWDAEEGLGSTEWAEESRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMSLVNLTKE			
myší GCPII	(415)	RRTLFASWDAEEGLGSTEWAEESRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMSLVNLTKE			
prasečí GCPII	(414)	RRTLFASWDAEEGLFGSTEWAEESRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMSLVNLTKE			
krysí GCPII	(415)	RRTLFASWDAEEGLGSTEWAEESRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMSLVNLTKE			
					552
lidská GCPII	(482)	KSPDEGFEGKSLSWTKKSPSEFIGPRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKWNNKSY			
myší GCPII	(484)	KSPDEGFEGKSLSWTKKSPSEFIGPRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKWNNKSY			
prasečí GCPII	(483)	KSPDEGFEGKSLSWTKKSPSEFIGPRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKWNNKSY			
krysí GCPII	(484)	KSPDEGFEGKSLSWTKKSPSEFIGPRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKWNNKSY			
					621
lidská GCPII	(551)	LYHSVYETYELVKFYDPMFKYHLVAQVRGVFELANSVVPFDCCYAVALLNAKYSISMKHP			
myší GCPII	(553)	LYHSVYETYELVKFYDPMFKYHLVAQVRGVFELANSVVPFDCCYAVALLNAKYSISMKHP			
prasečí GCPII	(552)	LYHSVYETYELVKFYDPMFKYHLVAQVRGVFELANSVVPFDCCYAVALLNAKYSISMKHP			
krysí GCPII	(553)	LYHSVYETYELVKFYDPMFKYHLVAQVRGVFELANSVVPFDCCYAVALLNAKYSISMKHP			
					690
lidská GCPII	(620)	QEMKTYMSFDSLFSAVKNFTASFNRRQIDKNPILRNDQLMLERAFIPLGLPDRFYR			
myší GCPII	(622)	QEMKTYMSFDSLFSAVKNFTASFNRRQIDKNPILRNDQLMLERAFIPLGLPDRFYR			
prasečí GCPII	(621)	QEMKTYMSFDSLFSAVKNFTASFNRRQIDKNPILRNDQLMLERAFIPLGLPDRFYR			
krysí GCPII	(622)	QEMKTYMSFDSLFSAVKNFTASFNRRQIDKNPILRNDQLMLERAFIPLGLPDRFYR			
					752
lidská GCPII	(689)	HIYAPSSHNKYGESFPGIYDALFDINNVSKAWVEVKRQIYATFTVQAAA TLSEV			
myší GCPII	(691)	HIYAPSSHNKYGESFPGIYDALFDISKVNASKAWNEVKRQIYATFTVQAAA TLSEV			
prasečí GCPII	(690)	HIYAPSSHNKYMGESFPGIYDALFDINNVSKAWVEVKRQIYATFTVQAAA TLSEV			
krysí GCPII	(691)	HIYAPSSHNKYGESFPGIYDALFDINNVTSKAWREVVKRQIYATFTVQAAA TLSEV			

Obr. 7: Porovnání aminokyselinové sekvence lidské, myší, prasečí a krysí GCPII.

Identické sekvence jsou zvýrazněny žlutě, konzervativní modře, podobné zeleně a rozdílné bíle.

Jednotlivé sekvence proteinů byly získány z proteinové databáze GenPept, NCBI. Přístupové kódy pro lidskou, myší, prasečí a krysí GCPII jsou (v tomto pořadí) Q04609, AAI19606, NP_999549 a AAC53423.

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo:

1. připravit vektory pro rekombinantní expresi myší GCPII a ověřit jejich správnost
2. připravit myší GCPII heterologní expresí v savčích buňkách a ověřit její aktivitu

4. Experimentální část

4.1 Materiál

[³ H]NAAG (tritiovaný N-acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamát)	Perkin Elmer
2-merkптоethanol	Sigma
akrylamid	Sigma
ampicilin	Biotika
azid sodný	Penta
bromfenolová modř	Sigma
Casein Blocker v TBS	Thermo Scientific
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
deoxyribonukleotidy	Top-Bio
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
dodecylsulfát sodný	Sigma
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Lachema
EDTA, disodná sůl	Sigma
ethanol	Penta
ethanol pro UV spektroskopii	Penta
fenol	Sigma
GelRed	Biotium
glukosa	Lachema
glycerol	Penta
glycin	Duchefa
hydroxid draselný	Penta
hydroxid sodný	Penta
chlorid lithný	Sigma
chlorid sodný	Penta
chloroform	Lachema
ionex AG 1-X8	Bio-Rad
isopropanol	Penta
kyselina chlorovodíková	Penta
kyselina mravenčí	Lachema
kyselina octová	Penta

LB agar	Sigma
LB medium	Sigma
Lipofectamin 2000 Reagent.....	Invitrogen
lysozym.....	Serva
methanol	Penta
MOPS (kyselina 3-(N-morfolino)propansulfonová).....	Duchefa
N,N'-methylen- <i>bis</i> (akrylamid).....	USB
NAAG (N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát)	Sigma
Optimem	Gibco
peroxidisíran amonný.....	Serva
sacharosa.....	Fluka
scintilační roztok Rotiszint [®] Eco-Plus	Roth
TEMED (tetramethylethylendiamin)	Fluka
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan).....	USB
triton X-100.....	Serva
X-gal	USB

Bakteriální kmeny: *Escherichia coli* DH5 α

Restrikční endonukleasy: KpnI, XhoI, XbaI, DpnI.....	New England BioLabs
DNA Polymerasy: Pfu DNA Polymerasa.....	Promega
Taq DNA Polymerasa	New England BioLabs
Ostatní enzymy: T4 DNA Ligasa.....	New England BioLabs
Antarctic phosphatase	New England BioLabs
Ribonukleasa A	Sigma

4.2 Přístroje

- pH-metr: 9450 pH meter, Unicam (USA)
- přístroj pro PCR: T-Gradient Thermocycler, Biometra (SRN)
- spektrofotometr: NanoDrop 1000, Thermo Scientific (USA)
- spektrofotometrická čtečka: GENios, Tecan (Švýcarsko)
- autokláv: MLS-3020U Sanyo Labo Autoclave, Sanyo (Japonsko)
- transiluminátor: Electronic Dualwave Transilluminator, Ultra-Lūm (USA)
- laboratorní váhy: HL-400, A&D Engineering, Inc. (USA)
EK-400H, A&D Engineering, Inc. (USA)
- vodní lázeň: Grant Instruments Ltd.(UK)
Thermomix BU B.Braun (SRN)
- rotační inkubátor: Sanyo-Gallenkamp Orbital Incubator (UK)
- horizontální agarosová elektroforéza:
zdroj MP-500P, Major Science (Taiwan)
aparatura B1A Owl Separation Systems, Inc. (USA)
- vertikální polyakrylamidová elektroforéza: Sigma (USA)
- blotovací přístroj: aparatura: Trans-Blot SD, Bio-Rad (USA)
zdroj: PowerPac HC, Bio-Rad (USA)
- inkubátory: TCH 100, Laboratorní přístroje Praha (CZ)
MCO-17AI CO₂ Incubator, Sanyo (Japonsko)
- centrifugy: Biofuge Pico, Heraeus Instruments (SRN)
Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments (SRN)
Megafuge 2,0R, Heraeus Instruments (SRN)
Centifuge 5415R, Eppendorf (SRN)
- mikroskopy: fluorescenční mikroskop Olympus IX81, Tokio (Japonsko)
světelný mikroskop Nikon TMS (Japonsko)
- fotoaparát: SP-5000UZ, Olympus (Japonsko)
- CCD kamera: LAS-3000 CCD Camera, Fujifilm (Japonsko)
- laminární box: BSB4A Laminar Flow Box, Gelaire (Austrálie)
- scintilační kapalinový spektrometr: Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Waltham (USA)
- sonikátor: Soniprep 150, Sanyo (Japonsko)

4.3 Metody

4.3.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena podle pokynů výrobce (Promega) [87].

Reakční směs:

templátová DNA:	10 ng
<i>sense</i> primer (20 μ M):	1 μ l
<i>antisense</i> primer (20 μ M):	1 μ l
směs deoxyribonukleotidů (10 mM):	1 μ l
Pfu-pufr (10 \times):	5 μ l
Pfu DNA polymerasa (2-3 U/ μ l):	1 μ l
HPLC-H ₂ O:	do 50 μ l

Podmínky reakce:

1. iniciační denaturace:	94 °C / 30 s
2. denaturace:	94 °C / 45 s
3. hybridizace primerů:	50 °C / 60 s
4. polymerace DNA:	72 °C / 4 min
5. dokončení polymerace:	72 °C / 8 min

Kroky (2) až (4) byly provedeny celkově ve 30 cyklech. Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny na horizontální agarosové elektroforéze (viz kapitola 4.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza).

Použité primery:

FmusNA1i: 5'- AAA GGT ACC AAA GAT GTG GAA CGC ACT GCA GG -3'

RmusGCP752ok2: 5'- AAA CTC GAG TTA AGC TAC TTC CCT CAG AGT C -3'

Primer FmusNA1i je specifický pro počátek sekvence genu myší GCPII a obsahuje restriční místo pro enzym KpnI.

Primer RmusGCP752ok2 je specifický pro konec sekvence genu myší GCPII a obsahuje restriční místo pro enzymy XhoI a XbaI.

4.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza

Roztoky:

- a) 50× TAE pufr: 2 M Tris; 1 M CH₃COOH; 0,05 M EDTA; pH 8,0
- b) vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa; 0,1 (w/v) bromfenolová modř; 0,02% NaN₃

V Erlenmayerově baňce bylo připraveno 30 ml 1% (w/v) agarosy v 1× TAE pufru. Po rozpuštění agarosy zahřátím v mikrovlnné troubě byl roztok doplněn destilovanou vodou na původní objem a byly do něj přidány 3 µl barviva GelRed (1:10000) pro vizualizaci DNA. Po promíchání byl roztok nalit do připravené aparatury a byly do něj umístěny hřebeny. Po zatuhnutí gelu byly hřebeny vyjmuty a aparatura zalita 1× TAE pufrem tak, aby jeho hladina sahala asi 3 mm nad povrch gelu. Do jamek se poté nanášely vzorky DNA smíchané se vzorkovým pufrem v poměru 5:1.

Pro odhad délky fragmentů DNA byl použit jako standard tzv. λ-DNA marker (tj. DNA bakteriofága-λ štěpená restriční endonukleasou BstEII). Elektroforéza byla prováděna při 125 V po dobu 20 – 30 minut. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí transiluminátoru Electronic Dualwave Transilluminator a výsledky zdokumentovány fotoaparátem SP-5000UZ (Olympus).

4.3.3 Extrakce DNA z agarosového gelu

Pro další použití DNA, která byla rozdělena pomocí agarosové elektroforézy, byl vzorek DNA vyříznut z agarosového gelu a DNA byla extrahována z gelu podle protokolu ke „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) [88].

Ke gelu s DNA byl přidán trojnásobný objem QG-pufru (předpoklad: 1 µg gelu = 1 µl) a směs byla inkubována při 37 °C asi 15 min (do rozpuštění gelu). Roztok obsahující DNA byl poté nanesen na QIA-kolonku a centrifugován (13000×g, 1 min). Poté byla kolonka promyta 750 µl PE-pufru a dvakrát centrifugována (13000×g, 1 min). Čistá DNA byla z kolonky eluována 30 µl destilované vody.

4.3.4 TOPO TA-klonování

TOPO TA-klonování využívá koncových adenosinových přesahů na fragmentech DNA vytvořených činností např. Taq DNA polymerasy při PCR. TOPO TA-klonování bylo provedeno dle návodu „TOPO TA-Cloning“ (Invitrogen) [89].

Neměla-li DNA adenosinové přesahy, byla adenylována Taq DNA polymerasou užitím PPP Master Mix (Top-Bio; 10 µl DNA; 12,5 µl PPP Master Mix; 2,5 µl HPLC-H₂O; 72 °C/20min).

V mikroskopu bylo smícháno 2 µl DNA, 0,5 µl roztoku solí (200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂) a 0,5 µl pCR[®]II-TOPO[®] vektoru (dodávaným v kitu) a vzniklý roztok byl ponechán 10 minut při pokojové teplotě. Pak byla tato směs přenesena ke kompetentním TOP10 buňkám (dodávaným v kitu) a lehce promíchána proklepáním dna mikroskopu. Reakce byla inkubována 10 minut na ledu a poté následoval tepelný šok (42 °C, 30 s). Po něm byly buňky okamžitě přeneseny na led a bylo k nim přidáno 250 µl S.O.C. media (dodávané v kitu). Následně byly vzorky s buňkami umístěny na do rotačního inkubátoru, kde byly protřepávány 1 hod při 37 °C. Po inkubaci bylo 300 µl suspenze buněk nanášeno na Petriho misku s LB agarem a ampicilinem (o výsledné koncentraci 100 µg/ml) a X-Gal (USB; 1,6 mg X-Gal/miska). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

4.3.5 Štěpení, defosforylace a ligace DNA

Štěpení DNA odpovídajícími restrikčními endonukleasami bylo provedeno v reakčním objemu 50 µl podle návodu výrobce restrikčních enzymů. Množství DNA a doba štěpení byly závislé na účelu štěpení (obvykle 50 ng - 4 µg DNA a 1 - 8 hod), teplota štěpení byla 37 °C.

Defosforylace DNA byla provedena v reakčním objemu 20 µl (16 µl roztoku DNA; 2 µl 10×NEB-pufu pro „Antarctic phosphatase“, NEB; 2 µl „Antarctic phosphatase“, NEB). Reakce byla inkubována 20 min při 37 °C a následně zastavena zahříváním na 65 °C po dobu 5 min.

Fragmenty DNA štěpené týmiž restrikčními endonukleasami byly spolu ligovány v celkovém reakčním objemu 10 µl, při 16 °C a po dobu nejméně 10 hod. Množství T4-ligasy (400 U/µl) a T4-ligačního pufu bylo 1 µl. Množství vektoru a insertu bylo určeno odhadem z intenzity proužků DNA na předligační agarosové elektroforéze. Poměr množství vektor:insert byl přibližně 1:3.

4.3.6 Cílená mutagenese s využitím PCR

Mutagenese byla provedena podle protokolu ke „QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) [90]. Gen pro myši GCPII, který naše laboratoř obdržela od Dr. Hestona (Cleveland, USA), obsahoval po translaci do aminokyselinové sekvence dvě mutace oproti přirozené formě myši GCPII uvedené v databázi (databáze GenBank, resp. GenPept, NCBI; přístupový kód pro cDNA: BC119605; pro protein: AAI19606). Byly proto navrženy dvě dvojice primerů pro mutagenesi, které měly tyto mutace odstranit (viz Tab. 1, str. 28).

Reakční směs i podmínky reakce byly nastaveny dle pokynu výrobce [90], templátovou DNA byl plasmid pcDNA4mGCPII (tj. plasmid pcDNA4 obsahující gen pro myši GCPII nesoucí zmíněné dvě mutace).

reakční směs:

templátová DNA:	3,3 ng
pár komplementárních primerů (20 μM):	1 μl/primer
směs deoxyribonukleotidů (10 mM):	1 μl
Pfu-pufr (10×):	5 μl
Pfu DNA polymerasa (2-3 U/μl):	1 μl
HPLC-H ₂ O:	do 50 μl

podmínky reakce:

1. iniciační denaturace:	94 °C / 30 s
2. denaturace:	94 °C / 30 s
3. hybridizace primerů:	55 °C / 60 s
4. polymerace DNA:	68 °C / 15 min
5. koncová polymerace:	68 °C / 15 min

Kroky denaturace (2) až (4) byly provedeny celkově ve 20 cyklech. Použité primery jsou uvedeny v Tab. 1 (str. 28).

Po provedení mutagenese bylo 50 μl reakční směsi štěpeno 1 μl restriční endonukleasy DpnI (20 U/μl) po dobu 1 hod při 37 °C. Endonukleasa DpnI štěpí pouze metylovanou DNA; jelikož DNA vzniklá metodou PCR není metylována, není enzymem DpnI štěpena, a proto po štěpení zůstanou zachovány pouze plasmidy nesoucí požadovanou mutaci [90].

Tab. 1: Tabulka použitých primerů pro mutagenezi

Mutace	Označení primeru	Sekvence (5' → 3')
G240A	FmusNAmutG240A	GCTGACTACTTTGTTTCCTGC G GGTGAAGTCCTATCC
	RmusNAmutG240A	GGATAGGACTTCACCC G CAGGAACAAAGTAGTCAGC
E287N	FmusNAmutE287N-2	CATGAGTTGACAA A C G GCTGTTGGCCTTC
	RmusNAmutE287N-2	GAAGGCCAACAGC G T T TGTCAACTCATG

Dvojice komplementárních primerů použitých při odstraňování mutací v myši GCPII metodou cílené mutagenese pomocí PCR. Trojice nukleotidů kodující měněnou aminokyselinu je znázorněna barevně, měněný nukleotid je podtržen (v případě mutace G240A: GGG -> GCG (wt); v případě mutace E287N: GAA -> AAC (wt)).

4.3.7 Přečištění DNA ze směsi po mutagenezi

Jelikož reakční směs po mutagenezi obsahovala také nezreagované primery a deoxyribonukleotidy, DNA polymerasu a také později přidaný enzym DpnI, bylo nutné ji pro pozdější účinnou transformaci bakterií *E. coli* přečistit. Čištění bylo provedeno metodou „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) [88].

Vzorek DNA byl smíchán s desetinásobným objemem QG-pufu, nanesen na QIA-kolonku a centrifugován (13000×g, 1 min). Poté byla kolonka promyta 750 µl PE-pufu a dvakrát centrifugována (13000×g, 1 min). Čistá DNA byla z kolonky eluována 30 µl destilované vody.

4.3.8 Transformace bakterií *E. coli* DH5α

Přibližně 100 ng plasmidu nesoucího gen pro mGCPII bylo smícháno s 50 µl kompetentních buněk *E. coli* DH5α a ponecháno stát na ledu po dobu 30 minut. Poté byl proveden tepelný šok přenesením vzorků do vodní lázně o teplotě 42 °C (1,5 min) a následným přenesením vzorků zpět na led (1 min). Následně bylo ke vzorkům přidáno 500 µl studeného LB media a poté byly vzorky inkubovány ve vodní lázni při 37 °C (1 hod).

Po inkubaci bylo 200 µl buněk natřeno na Petriho misku s LB agarem s ampicilinem (o koncentraci 100 µg/ml). Misky byly poté umístěny do termostatu (37 °C), kde byly inkubovány přes noc.

4.3.9 Midipreparace plasmidové DNA

Midipreparace plasmidové DNA byla provedena dle protokolu ke „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN) [91].

Kolonie z Petriho misky byla pomocí sterilní špičky na pipetu přenesena do 12 ml LB-media s ampicilinem (o koncentraci 100 µg/ml) a ponechána v rotačním inkubátoru (37 °C, 15 hod, 220 ot./min).

Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (3362×g, 11 min, 4°C), supernatant byl důkladně odstraněn a peleta obsahující bakteriální buňky byla rozsuspendována ve 250 µl P1-pufu s přídáním RNAsou A (o koncentraci 100 µg/ml). Vzniklá suspenze byla přenesena do 1,5ml mikrozkušavky, ke vzorku bylo přidáno 250 µl P2-pufu a směs byla promíchána převrácením zkumavky. Nakonec bylo přidáno 350 µl N3-pufu, ihned po přidání byl roztok promíchán převrácením zkumavky a poté centrifugován (16100×g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl opatrně odebrán a aplikován na QIAprep-kolonku, která byla centrifugována (16100×g, 1 min, 4 °C), promyta 500 µl PB-pufu, centrifugována (16100×g, 1 min, 4 °C), dále promyta 750 µl PE-pufu a dvakrát centrifugována (16100×g, 1 min, 4 °C). DNA byla z kolonky eluována 50 µl sterilní vody.

Správnost získané DNA byla ověřena restrikční analýzou, která byla provedena dle doporučení výrobce restrikčních endonukleas (New England BioLabs). Množství štěpené DNA se pohybovalo v rozmezí 0,5 – 2,0 µg a délka štěpení byla obvykle 1 až 2 hodiny.

4.3.10 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla určena měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Na měřicí plošku spektrofotometru byl nanesen 1 µl vzorku DNA a poté byla změřena absorbance roztoku při 260 nm a 280 nm.

4.3.11 Sekvenování plasmidové DNA

Pro sekvenování plasmidové DNA bylo do 200µl mikrozkušavky napipetováno požadované množství DNA (1 µg DNA/plasmid o velikosti 10 kb), přidáno 3,2 pmol daného sekvenačního primeru (viz níže) a doplněno destilovanou vodou do celkového objemu 14 µl.

Vlastní sekvenování DNA bylo provedeno RNDr. Štěpánkou Hrdou v Laboratoři sekvenace DNA (PřF UK) na sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pomocí kitu „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems).

Použité sekvenační primery:

RMin1 (forvardní):	5'-GCACGAACTGAAGACTTCTTTAAACTGGAACGGG-3'
RMin3 (reverzní):	5'-CATAGACACTGTGATAGAGAGGATAGCTGC-3'
RMin4 (reverzní):	5'-GATGATATGCCTGTAGAAAGGCCTTCCTGG-3'
T7 (forvardní):	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
BGH (reverzní):	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

4.3.12 Maxipreparace plasmidové DNA (s využitím PEG 8000)

Roztoky:

Roztok I: 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50 mM glukosa; pH 8,0

Roztok II: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Roztok III: 3 M CH₃COONa; 2 M CH₃COOH

TE-pufř: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

Kolonie z Petriho misky byla pomocí sterilní špičky na pipetu přenesena do 8 ml LB-media s ampicilinem (o koncentraci 100 µg/ml) a ponechána v rotačním inkubátoru (37 °C, 7 hod, 220 ot./min). Narostlá kultura pak byla převedena do 500 ml LB-Amp⁺ media (o koncentraci ampicilinu 100 µg/ml) a ponechána růst přes noc (37 °C, 14 hod, 220 ot./min).

Buněčná kultura byla centrifugována (3362×g, 30 min, 4 °C) a supernatant odlit. K peletě bylo přidáno 20 ml roztoku I a buňky byly dokonale rozsuspendovány vortexováním. K suspenzi byl přidán 1 ml lysozymu (25 mg/ml) a vzorek byl míchán 20 min při laboratorní teplotě. Pak bylo ke vzorku přidáno 40 ml roztoku II a po důkladném promíchání byl ponechán stát 10 min při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 30 ml roztoku III, směs byla dokonale promíchána a ponechána stát při laboratorní teplotě 10 minut. Vzorek byl centrifugován (3362×g, 10 min, 4 °C) a supernatant byl přefiltrován do čisté kyvety přes šestkrát složenou gázu. K supernatantu bylo přidáno 60 ml isopropanolu a byl ponechán stát 10 min při laboratorní teplotě. Následovala opět centrifugace (3362×g, 10 min, 25 °C) a supernatant byl důkladně odstraněn.

Peleta byla rozpuštěna ve 4,5 ml TE-pufřu a roztok byl přenesen do 15ml falkonky, kde k němu bylo přidáno 300 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) a 1,5 ml 10 M LiCl. Po promíchání byla falkonka umístěna na 40 min na led.

Poté byl vzorek centrifugován (3362×g, 10 min, 4 °C), supernatant přenesen do čisté falkonky, dále k němu bylo přidáno 6 ml isopropanolu a po 10 min stání při pokojové teplotě

byl vzorek opět centrifugován (3362×g, 10 min, 25 °C). Supernatant byl důkladně odstraněn, peleta rozpuštěna v 0,7 ml TE-pufu a převedena do 1,5ml mikrozkušavky. Ke vzorku bylo přidáno 10 µl RNAsy (10 mg/ml) a poté byl inkubován 1 hod při 37 °C.

Ke vzorku byl přidán stejný objem (tj. 0,7 ml) 13% PEG 8000 (w/v, v 1,6 M NaCl) a po důkladném promíchání byl centrifugován (13000×g, 8 min, 25 °C). Supernatant byl odstraněn, peleta rozpuštěna v 0,7 ml TE-pufu a následně byla provedena extrakce stejným objemem (0,7 ml) fenolu. Roztok byl centrifugován (13000×g, 5 min, 25 °C), poté byla horní fáze odebrána do čisté mikrozkušavky a provedena dvakrát extrakce fenol/chloroformem (1:1) a dvakrát chloroformem (vždy byla odebrána horní fáze do čisté mikrozkušavky, po extrakci fenol/chloroformem centrifugace 13000×g, 5 min, 25 °C, po extrakci chloroformem 13000×g, 1 min, 25 °C). Po poslední extrakci bylo ke vzorku přidáno 50 µl 3 M octanu sodného (tj. desetina objemu vzorku) a dále 1 ml 96% ethanolu pro UV-spektroskopii (dvojnásobek objemu vzorku). Po důkladném promíchání byl vzorek ponechán stát 10 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován (13000×g, 10 min, 4 °C). Ethanol byl odsát, peleta jemně promyta 350 µl 70% ethanolu pro UV-spektroskopii, ethanol byl znovu odsát a peleta ponechána 2 min schnout na vzduchu. Poté byla rozpuštěna ve 300 µl sterilní vody.

4.3.13 Purifikace plasmidové DNA (pro transfekci do savčích buněk)

Roztoky:

QBT-pufr: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v);
0,15% Triton X-100 (v/v)

QC-pufr: 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% isopropanol (v/v)

QF-pufr: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris·Cl; pH 8,5; 15% isopropanol (v/v)

Kolonka z kitu pro midipreparaci plasmidové DNA (QIAGEN) [92] byla ekvilibrována 4 ml QBT-pufu. Na kolonku byl poté nanesen vzorek DNA (200 µg) smíchaný s 5 ml QBT-pufu. Kolonka byla poté dvakrát promyta 10 ml promývacího QC-pufu a poté byla DNA z kolonky eluována 5 ml elučního QF-pufu.

DNA byla poté vysrážena z eluátu přidáním 3,5 ml isopropanolu (o pokojové teplotě). Po promíchání byl vzorek ihned centrifugován (3362×g, 30 min, 4 °C), supernatant opatrně odlit a peleta opatrně promyta 2 ml 70% ethanolu (o pokojové teplotě). Vzorek byl opět centrifugován (3362×g, 12 min, 4 °C) a supernatant opatrně odlit. Peleta byla poté 5 min sušena na vzduchu a následně rozpuštěna ve 100 µl sterilní vody.

4.3.14 Transfekce savčích buněk

Pro transfekci byly použity buňky HEK293 (buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk; neexprimující GCPII). Buňky byly nechány růst ve 24-jamkové destičce tak, aby byly v den transfekce konfluentní z 90 %.

Transfekce byla provedena použitím Lipofectaminu 2000 (Invitrogen). Pro každou jamku na 24-jamkové destičce bylo v první mikrozkuhavce zředěno 0,5 µg purifikované plasmidové DNA do 25 µl Optimem. Ve druhé mikrozkuhavce bylo zředěno 1,9 µl Lipofectaminu 2000 do 25 µl Optimem. Následně byl zředěný Lipofectamin 2000 smíchán se zředěnou DNA a vzniklý roztok byl inkubován 20 min při laboratorní teplotě. Poté byly komplexy lipid:DNA opatrně přidány k buňkám, které byly jemným pohybem destičkou promíchány. Buňky pak byly inkubovány 40 hod při 37 °C a 5% CO₂.

4.3.15 Sklizení, promytí a homogenizace savčích buněk

Savčí buňky byly 40 hodin po transfekci rozsuspendovány pipetou a vytvořená buněčná suspenze byla přenesena do 1,5ml mikrozkuhovek a centrifugována (500×g, 3 min, 4 °C). Supernatant byl opatrně odebrán, peleta promyta v 1×TBS, vortexována a opět centrifugována (500×g, 3 min, 4 °C). Supernatant byl opět opatrně odstraněn a peleta byla rozpuštěna v 50 µl reakčního pufru (20 mM MOPS, 20 mM NaCl, pH 7,4).

Buňky byly poté sonikovány na ledu (Soniprep 150 Sanyo, amplituda 10 µm, 2 × 5 s). Homogenát byl centrifugován (14000×g, 25 min, 4 °C) a supernatant opatrně přenesen do čisté mikrozkuhavky (supernatant je tzv. buněčný lyzát).

4.3.16 Stanovení koncentrace celkového proteinu v lyzátu savčích buněk

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Bradfordové [93], která spočívá v měření absorbance komplexu barviva Coomassie G-250 s proteiny při vlnové délce 595 nm. Pro kalibraci byla použita koncentrační řada standardu BSA v rozmezí 0,025 – 0,4 mg/ml.

Do 96 jamkové destičky Koh-i-noor bylo napipetováno 200 µl činidla Bradfordové (Bio-Rad), k němuž bylo přidáno určité množství lyzátu (přibližně 0,5 - 1 µl). Poté byl objem doplněn vodou na 220 µl a změřena absorbance při 595 nm na spektrofotometrické čtečce GENios (Tecan).

4.3.17 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukujících podmínek (SDS-PAGE)

Roztoky:

Zaostřovací gel (6%): 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'-metylen-bis(akrylamidu)); 50 μ l 10% (w/v) SDS; 5 μ l TEMED; 50 μ l 10% (w/v) peroxodisíranu amonného (APS); doplněno vodou do 5 ml

SeparáčnÍ gel (10%): 2,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8); 2,3 ml směsi akrylamidu a bisakrylamidu (42,8 g akrylamidu, 1,2 g N,N'-metylen-bis(akrylamidu)); 100 μ l 10% (w/v) SDS, 10 μ l TEMED; 100 μ l 10% (w/v) peroxodisíranu amonného (APS); doplněno vodou do 10 ml

Vzorkový pufr (6 \times): 3,5 ml 1 M Tris (pH 6,8); 3,0 ml glycerol; 1 g SDS; 600 μ l 2-merkapt ethanol; 1,2 mg bromfenolová modř; doplněno vodou do 10 ml

Elektrodový pufr (5 \times): 15,1 g Tris; 94 g glycin; 5 g SDS; 900 ml voda; pH 8,8 (neupravováno)

Proteiny byly rozděleny podle svých relativních molekulových hmotností pomocí diskontinuální elektroforézy v redukujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Po přípravě a ztuhnutí byly gely připevněny do přístroje pro vertikální SDS-PAGE a horní i dolní komora byla naplněna elektrodovým pufrem (po zředění 1:4 s vodou).

Před nanesením do gelu byly vzorky nejprve smíchány se vzorkovým pufrem (v poměru 5:1) a povařeny 3 min. Separace probíhala při konstantním napětí 150 V po dobu 1 hod. Proteiny v gelu byly poté detekovány buď pomocí barvení stříbrem či přenosem na nitrocelulosovou membránu a následnou imunodetekcí.

4.3.18 Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western Blot)

Roztoky:

Blotovací pufr: 192 mM glycin; 25 mM Tris-HCl; 10% (v/v) CH₃OH; 0,1% (w/v) SDS (pH neupravováno)

Po ukončení elektroforézy SDS-PAGE byl gel 5 min ekvilibrován spolu s nitrocelulosovou membránou ve 100 ml blotovacího pufru. Na anodu blotovacího přístroje

byly položeny tři filtrační papíry zvlhčené v blotovacím pufru, ekvilibrovaná membrána, gel a nakonec opět tři vlhké filtrační papíry. Vlastní přenos proteinů z gelu na membránu byl proveden použitím napětí 15 V po dobu 15 min.

Po ukončení přenosu byla membrána opatrně vyjmuta z aparatury a přenesena na 60 min do 5 ml Casein Blockeru pro blokování nespecifického vázání protilátky (při pokojové teplotě). Následně byla přidána myší primární protilátka GCP-04 proti lidské GCPII (ředění 1:5000 v Casein Blockeru) a následovala inkubace přes noc při pokojové teplotě.

Membrána pak byla promyta 4×5 min v PBS + 0,05% Tween-20 a po jejím přenesení do 5 ml Casein Blockeru byla přidána sekundární anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (ředění 1:25 000 v Casein Blockeru). Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě byla membrána opět promyta 4×5 min v PBS + 0,05% Tween-20 a 5 min inkubována v roztoku chemiluminiscenčního činidla „SuperSignal West Dura Chemiluminescence Substrates“ (Pierce). Po osušení membrány byla změřena luminiscence na přístroji LAS-3000 CCD Camera (Fujifilm, Japonsko).

4.3.19 Barvení polyakrylamidového gelu stříbrem

Roztoky:

1. fixace:	12% (v/v) CH ₃ COOH; 50% (v/v) CH ₃ OH; 0,02% (v/v) HCHO	minimálně 30 min
2. promytí:	50% (v/v) CH ₃ OH	3 × 15 min
3. exponace:	0,02% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
4. promytí:	destilovaná voda	3 × 20 s
5. impregnace:	0,2% (w/v) AgNO ₃ ; 0,02% (v/v) HCHO	20 min
6. promytí:	destilovaná voda	3 × 20 s
7. vyvolání:	566 mM Na ₂ CO ₃ , 16 μM Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O; 0,02% (v/v) HCHO	10 s až 5 min
8. promytí:	destilovaná voda	3 × 20 s
9. zastavení:	12% (v/v) CH ₃ COOH; 50% (v/v) CH ₃ OH	10 min
10. uchování:	50% (v/v) CH ₃ OH	

4.3.20 Měření aktivity myší GCPII (v lyzátu transfekovaných buněk HEK293) s použitím radionuklidu

Roztoky:

Reakční pufr: 50 mM Tris-HCl; 5 mM NaCl; pH 7,4

Roztok k zastavení reakce: 200 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Substrát: 50 nM [³H]NAAG značený tritiem na uhlíkatém skeletu glutamátu (C₃, C₄);
950 nM NAAG (neznačený)

Lyzát buněk HEK293 exprimujících myší GCPII (případně i s inhibítozem lidské GCPII – kyselinou (2-fosfonomethyl)pentandiovou, 2-PMPA) byl inkubován v reakčním pufru (celkový objem 180 µl) po dobu 5 min při 37 °C (množství celkového proteinu v reakci bylo přibližně 2,5 µg).

Následně bylo ke každému vzorku přidáno 20 µl substrátu a reakce byla inkubována 5 hod při 37 °C. Zastavena byla přidáním 200 µl 200 mM KH₂PO₄ (pH 7,4).

Separace odštěpeného glutamátu byla provedena ionexovou chromatografií na nosiči AG 1-X8 (Bio-Rad). Do skleněných Pasteurových pipet (Hirschmann Laborgeräte) byly nanášeny 2 ml nosiče rozsuspendovaného v destilované vodě (1:1). Poté byla kolonka promyta dvakrát destilovanou vodou. Na každou promytou kolonku bylo nanášeno 200 µl vzorku a navázaný glutamát byl eluován 2×1 ml 1 M HCOOH do scintilačních lahvíček. Po přidání 5 ml scintilačního roztoku Rotiszint[®]Eco-Plus (Roth) byly lahvičky důkladně vortexovány a scintilace změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer).

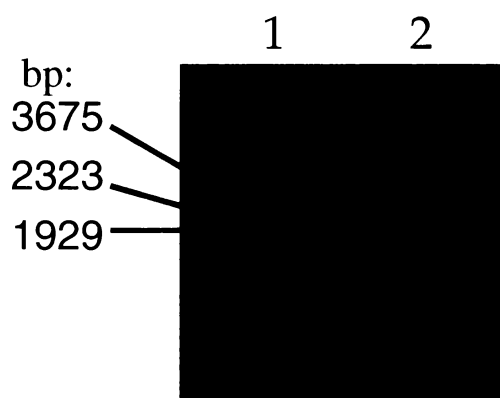
5. Výsledky

Cílem této práce bylo připravit rekombinantní myší GCPII (mGCPII) a ověřit její případnou aktivitu. Na počátku byla DNA kódující mGCPII, v níž byly přítomny dvě mutace, které bylo nutné odstranit. Tuto cDNA mGCPII (klonovanou v plasmidu pIRESneo, Clontech [94]) obdržela naše laboratoř od Dr. Warrena Hestona (Cleveland, USA). V dalším textu je tato myší GCPII se dvěma mutacemi značena „mGCPII***“ (počet hvězdiček znamená počet mutací).

5.1 Klonování genu pro myší GCPII do plasmidu pcDNA4

Jelikož cílená mutagenese genu pro mGCPII** klonovaného v plasmidu pIRES se nepodařila ani po několikeré změně reakčních podmínek (teplota a doba nasedání primerů, teplota a doba denaturace), bylo nutné cDNA mGCPII** klonovat do jiného plasmidu - pcDNA4/V5-HisA (Invitrogen) [95]. Plasmid pcDNA4 je použitelný pro expresi rekombinantních proteinů v savčích buňkách; ve své sekvenci obsahuje vedle cytomegalovirového promotoru a *ori* sekvence (počátek replikace plasmidu v *E. coli*) také geny pro zeocinovou a ampicilinovou rezistenci [95].

cDNA mGCPII** byla proto nejprve amplifikována pomocí PCR (4.3.1) užitím primerů specifických pro počátek a konec sekvence genu myší GCPII (FmusNA1i a RmusGCP752ok2; str. 24), kam byla zavedena restriční místa pro klonování do pcDNA4/V5-HisA. Templátem byl plasmid pIRES s mGCPII** od W. Hestona (Obr. 8).



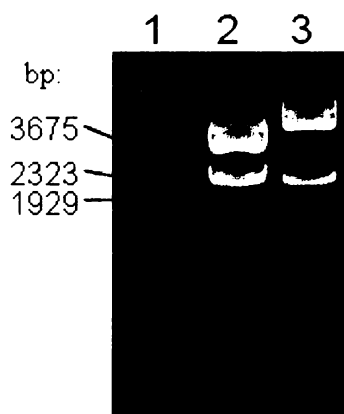
Obr. 8: Amplifikace cDNA mGCPII z plasmidu pIRES**

cDNA kódující mGCPII** byla amplifikována pomocí PCR a poté elektroforeticky rozdělena agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ -BstEII marker; dráha 2: cDNA amplifikovaná PCR (očekávaná velikost fragmentu byla 2276 bp).

Amplifikovaná cDNA byla poté štěpena restričními endonukleasami KpnI a XhoI (4.3.5). Ligace cDNA mGCPII** do plasmidu pcDNA4 rozštěpeného týmiž endonukleasami nebyla úspěšná, a to ani při použití různých poměrů koncentrací plasmidu pcDNA4 a cDNA mGCPII** (4.3.5); zřejmě byl příliš krátký přesah u restričních míst.

Proto byla cDNA mGCPII** adenylována užitím Taq DNA polymerasy a pomocí TOPO TA-klonování byla klonována do vektoru pCR[®]II-TOPO[®] (4.3.4). Po transformaci (4.3.8) a midipreparaci DNA (4.3.9) byl plasmid pCRII-TOPOmGCPII** štěpen restričními endonukleasami KpnI a XhoI pro ověření úspěšnosti TOPO TA-klonování (4.3.5). Restriční analýza odhalila, že skutečně došlo k ligaci cDNA mGCPII** do pCRII-TOPO, neboť na agarosovém gelu byl pozorován produkt štěpení o přibližné velikosti 2300 bp (očekávaná velikost fragmentu byla 2265 bp) (Obr. 9).

Po vyříznutí cDNA mGCPII** a její následné extrakci z gelu (4.3.3) byla tato cDNA mGCPII** ligována do vektoru pcDNA4 štěpeného endonukleasami KpnI a XhoI (4.3.5) a vzniklý plasmid pcDNA4mGCPII** byl použit jako templát pro mutagenezi (viz 5.2 Mutageneze G240A).



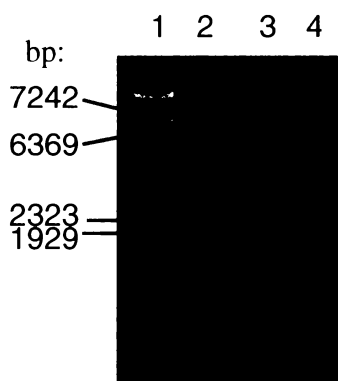
Obr. 9: Elektroforeogram výsledku restriční analýzy po ligování cDNA mGCPII do plasmidu pCR[®]II-TOPO[®]:**

Po štěpení vektoru pCR[®]II-TOPO[®] s insertovanou cDNA mGCPII** enzymy KpnI a XhoI byla rozštěpená DNA rozdělena agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ-BstEII marker; dráha 2: pCRII-TOPOmGCPII** (6 μl); dráha 3: marker (6 μl; velikost spodního proužku odpovídá 2265 bp, což byla očekávaná velikost fragmentu).

5.2 Mutageneze G240A

Prvním mutovaným místem byl triplet nukleotidů kódující aminokyselinu v pozici 240 v sekvenci mGCPII. V přirozené formě myši GCPII je touto aminokyselinou alanin, DNA, kterou jsme získali od W. Hestona, zde kóduje glycin.

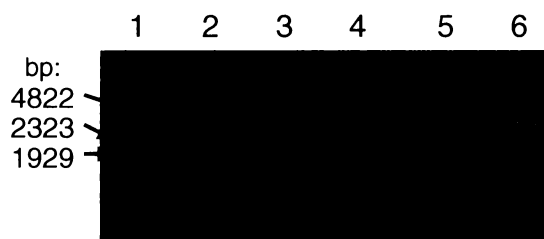
Pro cílenou mutagenézi (4.3.6) byly použity primery pro mutagenézi uvedené v Tab. 1 (str. 28, mutace G240A) a jako templát plasmid pcDNA4mGCPII** (viz 5.1 Klonování genu myši GCPII). Po provedení mutagenéze a štěpení enzymem DpnI (který rozštěpil původní metylovaný plasmid) bylo 5 µl směsi po mutagenézi elektroforeticky rozděleno agarosovou elektroforézou, jejíž výsledek potvrdil přítomnost amplifikovaného produktu (plasmid „pcDNA4mGCPII**“ nesoucí už jen mutaci E287N; očekávaná velikost produktu byla 7292 bp) (Obr. 10).



Obr. 10: Elektroforeogram vzorku po mutagenézi G240A a štěpení enzymem DpnI

Vzorek po mutagenézi G240A a štěpení DpnI (dráha 2) byl rozdělen agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ-BstEII marker; dráha 2: vzorek po mutagenézi G240A (5 µl); dráha 3: stejné množství templátové DNA jako v 5 µl reakce; dráha 4: desetinásobné množství templátové DNA než v 5 µl reakce.

Po transformaci buněk *E. coli* DH5α (4.3.8) plasmidem pcDNA4mGCPII* byla provedena midipreparace 4 klonů nesoucích tuto plasmidovou DNA (4.3.9) a následně restriční analýza enzymy KpnI a XhoI (4.3.5), po které byla rozštěpená DNA rozdělena agarosovou elektroforézou (Obr. 11). Všechny klony byly ověřeny jako správné (viz Obr. 11) a pro další práci byl vybrán plasmid pcDNA4mGCPII* v dráze 3 (Obr. 11).



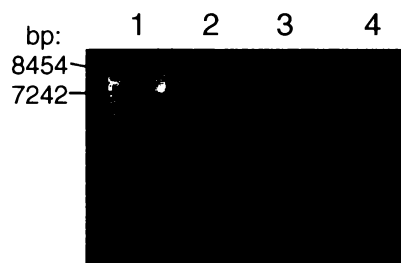
Obr. 11: Štěpení plasmidu pcDNA4mGCPII* enzymy KpnI a XhoI po midipreparaci DNA

Po rozštěpení plasmidu pcDNA4mGCPII* enzymy KpnI a XhoI byly produkty štěpení rozděleny agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ-BstEII marker; dráha 2: marker (5 µl; velikost spodního proužku odpovídá 2265 bp); dráhy 3 - 6: plasmid pcDNA4mGCPII* ze 4 různých klonů (5 µl/dráha).

5.3 Mutageneze E287N

Druhým mutovaným místem byl triplet nukleotidů kódující aminokyselinu v pozici 287 v sekvenci mGCPII. V přirozené formě myši GCPII je touto aminokyselinou glutamin, DNA získaná od W. Hestona zde kóduje kyselinu glutamovou.

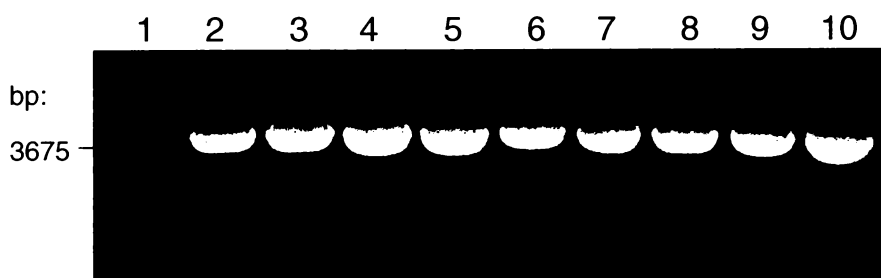
Cílená mutageneze (4.3.6) byla provedena s použitím primerů pro mutagenezi uvedených v Tab. 1 (str. 28, mutace E287N) a plasmidu pcDNA4mGCPII* jako templátu (viz 5.2 Mutageneze G240A). Po mutagenezi a štěpení produktu enzymem DpnI bylo 5 μ l směsi po mutagenezi rozděleno agarosovou elektroforézou (4.3.2). Z gelu je patrné, že došlo k amplifikaci plasmidu pcDNA4mGCPII*, čímž byla připravena přirozená forma cDNA myši GCPII klonovaná v plasmidu pcDNA4 („pcDNA4mGCPII“) (Obr. 12).



Obr. 12: Mutageneze E287N po štěpení enzymem DpnI

Vzorek po mutagenezi E287N (dráha 4) a štěpení DpnI byl rozdělen agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ -BstEII marker; dráha 2: stejné množství templátové DNA jako v 5 μ l reakce; dráha 3: desetinásobné množství templátové DNA jako v 5 μ l reakce; dráha 4: vzorek po mutagenezi E287N (5 μ l).

Po transformaci buněk *E. coli* DH5 α (4.3.8) byla provedena midipreparace plasmidové DNA z 9 různých klonů nesoucích pcDNA4mGCPII (4.3.9) a následná kontrolní agarosová elektroforéza (Obr. 13, str. 40). Všechny klony byly zároveň i sekvenovány (4.3.11). Sekvenování těchto klonů odhalilo, že pouze dva klony (dráha 2 a dráha 8 na Obr. 13, str. 40) byly správné, ostatní v sobě nesly novou mutaci či inserci primeru do sekvence genu pro mGCPII. Tyto dva klony byly použity pro další práci.



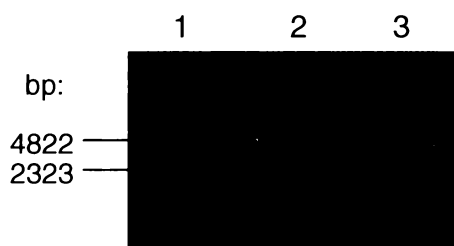
Obr. 13: Elektroforeogram pcDNA4mGCPII z devíti klonů po midipreparaci

Po midipreparaci pcDNA4mGCPII z 9 klonů byly tyto plasmidy rozděleny agarosovou elektroforézou. Dráha 1: λ -BstEII marker; dráha 2 – 10: pcDNA4mGCPII z devíti klonů (5 μ l/dráha).

5.4 Klonování cDNA mGCPII do plasmidu pTRE

Po získání přirozené formy cDNA mGCPII byla tato cDNA (ze „správných“ klonů č. 2 a 8, Obr. 13) klonována z plasmidu pcDNA4 do plasmidu pTRE-Tight (Clontech) obsahujícího vedle genu pro ampicilinovou rezistenci tzv. „Tet response element“ (TRE). Plasmid pTRE-Tight je určen pro Tet On/Tet Off expresní systém, který spočívá v regulaci exprese daného genu pomocí doxycyklinu, který interaguje s represorovým proteinem, což má za následek buď aktivaci či deaktivaci transkripce daného genu [96]. Tato možnost regulace exprese GCPII by mohla být v budoucnu využita pro sledování vývoje nádoru v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti GCPII v nádorových buňkách.

Nejprve byl plasmid pcDNA4mGCPII štěpen restričními endonukleasami KpnI a XbaI (4.3.5) a následně byl štěpený vzorek rozdělen agarosovou elektroforézou (4.3.2), která potvrdila úspěšnost štěpení, neboť v gelu byl přítomen fragment o velikosti okolo 2300 bp (očekávaná velikost fragmentu byla 2271 bp) (Obr. 14). Tento fragment byl extrahován z gelu (4.3.3) a následně ligován do vektoru pTRE štěpeného enzymy KpnI a XbaI (4.3.5).

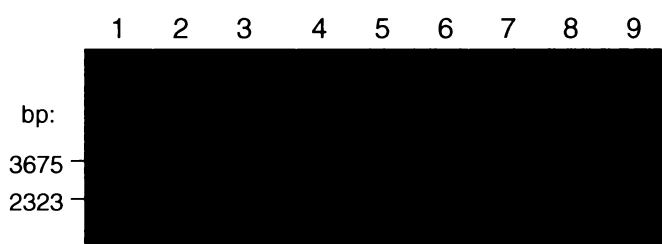


Obr. 14: Štěpení plasmidu pcDNA4mGCPII z klonů č. 2 a 8 enzymy KpnI a XbaI

Dráha 1: λ -BstEII marker; dráha 2: pcDNA4mGCPII-2 (25 μ l); dráha 3: pcDNA4mGCPII-8 (25 μ l).

Po transformaci (4.3.8) byla provedena midipreparace plasmidové DNA z osmi klonů (4.3.9) a získané plasmidy byly rozštěpeny enzymy KpnI a XbaI (4.3.5) a rozděleny

agarosovou elektroforézou (Obr. 15) (4.3.2). Z Obr. 15 je zřejmé, že pozitivních bylo 5 klonů (dráhy 2, 4, 7, 8 a 9), neboť obsahovaly insertovanou cDNA mGCPII. Pro maxipreparaci plasmidu pTREMGCPII (4.3.12) byl vybrán jediný klon (dráha 7).



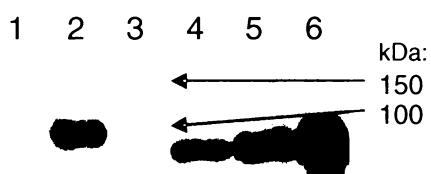
Obr. 15: Štěpení pTREMGCPII z osmi klonů endonukleasami KpnI a XbaI

Po štěpení endonukleasami byly jednotlivé vzorky rozděleny agarosovou elektroforézou. Pozitivní vzorky (obsahující mGCPII) jsou v drahách 2, 4, 7, 8 a 9. Dráha 1: λ -BstEII marker; dráha 2 - 9: pTREMGCPII z osmi klonů (5 μ l/dráha).

5.5 Transfekce a exprese mGCPII

Pro transfekci byl použit plasmid pcDNA4mGCPII, kterým byly nejprve transformovány buňky *E. coli* DH5 α (4.3.8) a poté byla provedena maxipreparace (4.3.12) a následná purifikace (4.3.13) této plasmidové DNA. Poté byly savčí buňky HEK293 transfekovány plasmidem pcDNA4mGCPII (4.3.14). Jako negativní kontrola byla provedena kotransfekce buněk HEK293 plasmidy pTREGFP a pEGFP.

Po dvou dnech byly buňky sklizeny, promyty a homogenizovány (4.3.15) a v lyzátu byla změřena koncentrace všech proteinů (zhruba 0,9 – 3,5 μ g/ μ l) (4.3.16). Poté byly vzorky lyzátů rozděleny pomocí SDS-PAGE (4.3.17) a následně byly proteiny elektropřenosem přebíjeny z gelu na nitrocelulosovou membránu, na které byla provedena imunodetekce mGCPII monoklonální myší protilátkou GCP-04 proti lidské GCPII (4.3.18) (Obr. 16).



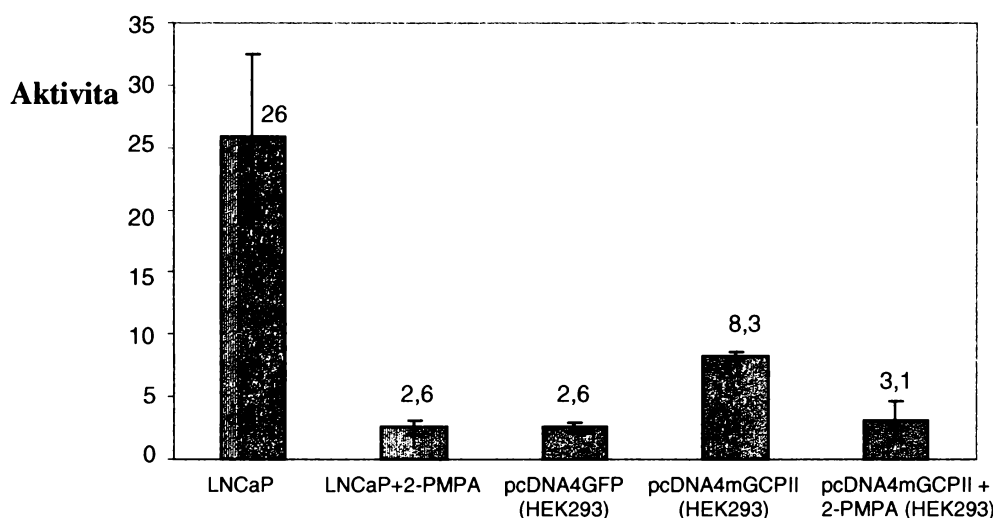
Obr. 16: Imunodetekce mGCPII v lyzátu buněk HEK293 protilátkou GCP-04

Dráha 1: HEK293 pTREGFP+pEGFP; dráha 2: HEK293 pcDNA4mGCPII; dráha 3: All blue marker (4 μ l); dráha 4: EXST (400 pg); dráha 5: EXST (2 ng); dráha 6: EXST (4 ng). Oba vzorky (č. 1 a 2) obsahovaly 10 μ g celkového proteinu. EXST je purifikovaná extracelulární část lidské rekombinantní GCPII.

Z obr. 16 (str. 41) je patrné, že protein mGCPII byl produkován buňkami HEK293 transfekovaných plasmidem pcDNA4mGCPII a měl správnou relativní pohyblivost. Z koncentrační řady EXST je možné odhadnout množství mGCPII ve vzorku (přibližně 1 ng mGCPII/10 µg celkového proteinu).

5.6 Měření aktivity hydrolýzy NAAG účinkem mGCPII

Aktivita mGCPII byla stanovena radiochemickou metodou (4.3.20) v lyzátu buněk HEK293 transfekovaných pcDNA4mGCPII (obsahujícím 2,64 µg celkového proteinu) a porovnána s aktivitou lyzátu buněk LNCaP přirozeně exprimujících lidskou GCPII. Testována byla i inhibice případné aktivity mGCPII užitím specifického inhibitoru lidské GCPII, kyseliny 2-(fosfonomethyl)pentandiové (2-PMPA, výsledná koncentrace 100 nM), která je fosfonátovým derivátem L-glutamátu [97] (Obr. 17). Z měření vyplývá, že lyzát buněk HEK293 transfekovaných mGCPII vykazuje hydrolytickou aktivitu vůči substrátu NAAG a produkovaná mGCPII je aktivní. Zároveň je možné tuto aktivitu inhibovat 2-PMPA.



Obr. 17: Měření aktivity mGCPII a její inhibice 2-PMPA

Relativní aktivita jednotlivých vzorků. Negativní kontrolou je vzorek pcDNA4GFP, neboť plasmid pcDNA4GFP kóduje zelený fluorescenční protein místo GCPII a vzorek tedy nemá proteolytickou aktivitu (resp. velmi nízkou). Inhibice byla provedena inhibitorem 2-PMPA (100 nM). Pro porovnání je uvedena i aktivita lyzátu buněk LNCaP (včetně její inhibice), které přirozeně exprimují lidskou GCPII.

6. Diskuze

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o GCPII. V závěru teoretické části bylo pojednáno o myším, prasečím a krysím orthologu lidské GCPII. Jelikož o těchto proteinech ještě není dostatek informací, hlavní roli v teoretické části hraje lidská GCPII.

Cílem praktické části bylo připravit rekombinantní myší GCPII a ověřit její aktivitu.

Na počátku této práce byl gen pro myší GCPII klonovaný do plasmidu pIRES, který naše laboratoř obdržela od Dr. Warrena Hestona (Cleveland, USA). Sekvenováním tohoto genu bylo zjištěno, že po jeho translaci do aminokyselinové sekvence by ve vzniklém proteinu byly přítomny dvě mutace oproti sekvenci myší GCPII uvedené v databázi proteinů GenPept, NCBI.

Provedení cílené mutagenese přímo na tomto plasmidu (pIRESmGCPII**) bylo vždy neúspěšné, při PCR nedošlo ani k amplifikaci DNA.

Po překlonování genu mGCPII** do plasmidu pcDNA4 sice došlo k amplifikaci DNA při PCR, ovšem při každém pokusu o mutagenesi došlo k inserci primeru do sekvence templátové DNA. Ačkoliv se první mutované místo podařilo po několika pokusech opravit, na druhém mutovaném místě docházelo k inserci primeru při každé mutagenesi, a proto bylo úspěšné provedení mutagenese prakticky nemožné. Při zvýšení teploty nasedání primeru (z 55 °C na 65 °C), které by mělo mít za následek větší specifitu primeru k templátové DNA a také odstranění případných sekundárních struktur v templátové DNA či primeru, došlo dokonce k dvojnásobné inserci primeru. Jediným řešením se zdálo být použití upravených primerů pro mutagenesi, které tak byly zkráceny na obou koncích. Při použití těchto modifikovaných primerů již proběhla mutagenese úspěšně a bez inserce primerů do sekvence templátové DNA. Jako možné vysvětlení těchto nebyvalých problémů s cílenou mutagenesí, která je jinak metodou velmi spolehlivou, se zdá být přítomnost podobné sekvence v okolí mutovaného místa k sekvenci specifické pro primer.

Po získání přirozené formy genu mGCPII byl tento gen klonován do plasmidu pTRE-Tight (Clontech). Příprava plasmidu pTREMGCPII již proběhla bez problému a v budoucnu bude tento plasmid použit pro testování Tet On/Tet Off expresního systému. S využitím tohoto systému je možné regulovat expresi určitého proteinu přítomností doxycyklinu v buněčném mediu. Sledování vývoje nádorů v závislosti na přítomnosti a nepřítomnosti

GCPII by mohlo napovědět, jakou roli hraje GCPII v nádorových buňkách a tkáních, neboť funkce GCPII v nádorech je stále neznámá.

Plasmidem pcDNA4mGCPII byly transfekovány buňky HEK293 s cílem exprimovat mGCPII. Podle výsledků imunochemické analýzy byl protein mGCPII těmito buňkami skutečně produkován a jeho velikost odpovídala předpokladům (viz Obr. 16, str. 41).

Aktivita produkovaného proteinu mGCPII byla stanovena radiochemickou metodou užitím radioaktivně značeného substrátu NAAG v buněčném lyzátu buněk HEK293 transfekovaných mGCPII. Výsledky experimentu prokázaly, že testovaný buněčný lyzát vykazuje hydrolytickou aktivitu vůči substrátu NAAG. Zároveň bylo možné tuto aktivitu inhibovat specifickým inhibitorem lidské GCPII, 2-PMPA.

Příprava přirozené formy genu myší GCPII a exprese tohoto proteinu jsou ovšem jen prvním (ovšem velmi podstatným) krokem pro další charakterizaci tohoto proteinu. Jako další krok se nabízí příprava cDNA kódující extracelulární část mGCPII, následná nadprodukce tohoto proteinu v eukaryotním systému a jeho purifikace. Čistý protein by mohl být charakterizován, zejména co se týče jeho enzymatických aktivit, a porovnán s jeho lidským protějškem. Finálním krokem by se mohl stát pokus o krystalizaci tohoto proteinu, vyřešení jeho struktury a porovnání s lidským orthologem.

Charakterizace myší GCPII je důležitá pro správnou volbu zvířecího modelu, na kterém by se v budoucnosti testovaly nové léčebné či diagnostické metody založené na GCPII. Zvolený model by se měl zejména enzymatickou aktivitou a tkáňovou distribucí příslušného orthologu lidské GCPII co nejvíce přibližovat lidskému protějšku.

7. Závěr

1. Gen pro mGCPII byl klonován do vektorů vhodných pro další práci.
2. Metodou cílené mutageneze byla připravena přirozená forma („wild-type“) genu pro mGCPII.
3. Savčí buňky HEK293 byly transfekovány plasmidem obsahujícím gen mGCPII a imunochemická detekce prokázala, že tyto buňky produkují protein mGCPII.
4. Změřením aktivity lyzátu buněk HEK293 transfekovaných mGCPII bylo ověřeno, že produkovaná mGCPII hydrolyzuje svůj přirozený substrát N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát.

8. Seznam citované literatury

1. Silver D.A., Pellicer I., Fair W.R., Heston W.D.W., Cordon-Cardo C.: **Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues.** *Clinical Cancer Research* 1997; 3:81-85
2. Šácha P., Zámečník J., Bařinka C., Hloučová K., Vícha A., Mlčochová P., Hilgert I., Eckschlager T., Konvalinka J.: **Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain.** *Neuroscience* 2007; 144:1361-1372
3. Carter R.E., Feldman R.A., Coyle J.T.: **Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase.** *Neurobiology* 1996; 93:749-753
4. Pinto J.T., Suffoletto B.P., Berzin T.M., Qiao C.H., Lin S., Tong W.P., May F., Mukherjee B., Heston W.D.: **Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells.** *Clinical Cancer Research* 1996; 2:1445-1451
5. Barrett, A.J: **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997).** *European Journal of Biochemistry* 1997; 250:1-6
6. Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., and Coyle, J. T.: **Hydrolysis of the Brain Dipeptide N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate: Identification and characterization of a novel N-acetylated α -linked acidic dipeptidase activity from rat brain.** *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262:14498-14506
7. Su S.L., Huang I.P., Fair W.R., Powell C.T., Heston W.D.W.: **Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression.** *Cancer Research* 1995; 55:1441-1443
8. Bacich D.J., Pinto J.T., Tong W.P., Heston W.D.W.: **Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase.** *Mammalian Genome* 2001; 12:117-123
9. 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., Haar R.A.V., Fair W.R., Heston W.D.W.: **Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1443:113-127

10. Rinker-Schaeffer C.W., Hawkins A.L., Su S.L., Israeli R.S., Griffin C.A., Isaacs J.T., Heston W.D.W.: **Localization and physical mapping of the prostate-specific membrane antigen (PSM) gene to human chromosome 11.** *Genomics* 1995; 30:105-108
11. Pangalos M.N., Neefs J.M., Somers M., Verhasselt P., van der Bekkers M.H.L., Fraiponts E., Ashton D., Gordon R.D.: **Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated alphas-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity.** *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:8470-8483
12. Israeli R.S., Powell C.T., Corr J.G., Fair W.R., Heston W.D.W.: **Expression of the prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Research* 1994; 54:1807-1811
13. Renneberg H., Friedetzky A., Konrad L., Kurek R., Weingärtner K., Wennemuth G., Tunn U.W., Aumüller G.: **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.** *Urological Research* 1999; 27:23-27
14. Dumas F., Gala J.L., Berteau P., Brasseur F., Eschwege P., Paradis V., Lacour B., Philippe M., Loric S.: **Molecular expression of PSMA mRNA and protein in primary renal tumors.** *International Journal of Cancer* 1999; 80:799-803
15. Cao K.Y., Mao X.P., Wang D.H., Xu L., Yuan G.Q., Dai S.Q., Zheng B.J., Qiu S.P.: **High expression of PSM-E correlated with tumor grade in prostate cancer: A new alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen.** *Prostate* 2007; 67:1791-1800
16. Schmittgen T.D., Teske S., Vessella R.L., True L.D., Zakrajsek B.A.: **Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients.** *International Journal of Cancer* 2003; 107:323-329
17. Grauer L.S., Lawler K.D., Marignac J.L., Kumar A., Goel A.S., Wolfert R.L.: **Identification, purification, and subcellular localization of prostate-specific membrane antigen PSM' protein in the LNCaP prostatic carcinoma cell line.** *Cancer Research* 1998; 58:4787-4789
18. O'Keefe D.S., Bacich D.J., Heston W.D.W.: **Prostate specific membrane antigen.** Publikováno v knize „*Prostate cancer: biology, genetics and the new therapeutics*“ (2001, editor Chung L.W.K.)
19. Slusher B.S., Tsai G., Yoo G., Coyle J.T.: **Immunocytochemical localization of the N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) hydrolyzing enzyme N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase).** *Journal of Comparative Neurology* 1992; 315:217-229

20. Berger U.V., Luthi-Carter R., Passani L.A., Elkabes S., Black I., Konradi C., Coyle J.T.: **Glutamate carboxypeptidase II is expressed by astrocytes in the adult rat nervous system.** *Journal of Comparative Neurology* 1999; 415:52-64
21. Tsai G., Coyle J.T.: **N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders.** *Progress in Neurobiology* 1995; 46:531-540
22. Tsai G.C., Stauch-Slusher B., Sim L., Hedreen J.C., Rothstein J.D., Kuncl R., Coyle J.T.: **Reductions in acidic amino acids and N-acetylaspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis CNS.** *Brain Research* 1991; 556:151-156
23. Koller K.J., Zaczek R., Coyle J.T.: **N-acetyl-aspartyl-glutamate: regional levels in rat brain and the effects of brain lesions as determined by a new HPLC method.** *Journal of Neurochemistry* 1984; 43:1136-1142
24. Slusher B.S., Robinson M.B., Tsai G., Simmons M.L., Richards S.S., Coyle J.T.: **Rat brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity. Purification and immunologic characterization.** *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:21297-21301
25. Serval V., Barbeito L., Pittaluga A., Cheramy A., Lavielle S. and Glowinski J.: **Competitive inhibition of N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase activity by N-acetyl-L-aspartyl-beta-linked L-glutamate.** *Journal of Neurochemistry* 1990; 55:39-46
26. Stauch B.L., Robinson M.B., Forloni G., Tsai G., Coyle J.T.: **The effects of N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase) inhibitors on [³H]NAAG catabolism in vivo.** *Neuroscience Letters* 1989; 100:295-300
27. Serval V., Galli T., Cheramy A., Glowinski J., Lavielle S.: **In vitro and in vivo inhibition of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate catabolism by N-acetylated L-glutamate analogs.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 260:1093-1100
28. Halsted C.H., Ling E.H., Luthi-Carter R., Villanueva J.A., Gardner J.M., Coyle J.T.: **Folypoly-γ-glutamate carboxypeptidase from pig jejunum. Molecular characterization and relation to glutamate carboxypeptidase II.** *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:20417-20424 (errata v: *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:30746)
29. Halsted C.H.: **Jejunal Brush-Border Folate Hydrolase. A Novel Enzyme.** *Western Journal of Medicine* 1991; 155:605-609

30. Luthi-Carter R., Barczak A.K., Speno H., Coyle J.T.: **Hydrolysis of the neuropeptide N-acetylaspartylglutamate (NAAG) by cloned human glutamate carboxypeptidase II.** *Brain Research* 1998; 795:341-348
31. Halsted C.H.: **The intestinal absorption of folates.** *American Journal of Clinical Nutrition* 1979; 32:846-855
32. Devlin A.M., Ling E.H., Peerson J.M., Fernando S., Clarke R., Smith A.D., Halsted C.H.: **Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia.** *Human Molecular Genetics* 2000; 22:2837-2844
33. Hillman R.S.: **Hematopoietic Agents: Growth Factors, Minerals, and Vitamins.** Publikováno v knize „The Pharmacological Basis of Therapeutics“, str.1277 - 1310 (1990, Pergamon, New York; editoři Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P.)
34. Kamen B.A., Smith A.K., Anderson R.G.: **The folate receptor works in tandem with a probenecid-sensitive carrier in MA104 cells in vitro.** *Journal of Clinical Investigation* 1991; 87:1442-1449
35. McBurney M.W., Whitmore G.F.: **Isolation and biochemical characterization of folate deficient mutants of Chinese hamster cells.** *Cell* 1974; 2:173-182
36. Shane B.: **Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism.** *Vitamins and Hormones* 1989; 45:263-335
37. Wagner C.: **Biochemical role of folate in cellular metabolism.** *Clinical Research and Regulatory Affairs* 2001; 18:161-180
38. Israeli R.S., Powell C.T., Fair W.R., Heston W.D.: **Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Research* 1993; 53:227-230
39. Rawlings N.D., Barrett A.J.: **Structure of membrane glutamate carboxypeptidase.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1339:247-252
40. Ghosh A., Heston W.D.: **Effect of carbohydrate moieties on the folate hydrolysis activity of the prostate specific membrane antigen.** *Prostate* 2003; 57:140-151
41. Holmes E.H., Greene T.G., Tino W.T., Boynton A.L., Aldape H.C., Misrock S.L., Murphy G.P.: **Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients.** *Prostate Supplement* 1996; 7:25-29

42. Davis M.I., Bennett M.J., Thomas L.M., Bjorkman P.J.: **Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase.** *PNAS* 2005; 102:5981-5986
43. Mesters J.R., Barinka C., Li W., Tsukamoto T., Majer P., Slusher B.S., Konvalinka J., Hilgenfeld R.: **Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer.** *EMBO Journal* 2006; 25:1375-1384
44. Schülke N., Varlamova O.A., Donovan G.P., Ma D., Gardner J.P., Morrissey D.M., Arrigale R.R., Zhan C., Chodera A.J., Surowitz K.G., Maddon P.J., Heston W.D., Olson W.C.: **The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy.** *PNAS* 2003; 100:12590-12595
45. Barinka C., Hlouchova K., Rovenska M., Majer P., Dauter M., Hin N., Ko Y.S., Tsukamoto T., Slusher B.S., Konvalinka J., Lubkowski J.: **Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs.** *Journal of Molecular Biology* 2008; 376:1438-1450
46. Bzdega T., Turi T., Wroblewska B., She D., Chung H.S., Kim H., Neale J.H.: **Molecular cloning of a peptidase against N-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library.** *Journal of Neurochemistry* 1997; 69:2270-2277
47. Barinka C., Sácha P., Sklenár J., Man P., Bezouska K., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity.** *Protein Science* 2004; 13:1627-1635
48. Speno H.S., Luthi-Carter R., Macias W.L., Valentine S.L., Joshi A.R., Coyle J.T.: **Site-directed mutagenesis of predicted active site residues in glutamate carboxypeptidase II.** *Molecular Pharmacology* 1999; 55:179-185
49. Voet D., Voet J.G.: **Biochemistry, Third Edition.** *John Wiley & Sons, Inc., New York, 2004.* ISBN: 0471392235
50. Christianson D. W., Lipscomb W. N.: **Carboxypeptidase A.** *Accounts of Chemical Research* 1989; 22:62-69
51. Vallee B.L., Auld D.S.: **Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes.** *PNAS* 1990; 87:220-224
52. Bzymek K.P., Holz R.C.: **The catalytic role of glutamate 151 in the leucine aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*.** *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:31018-31025

53. McCall K.A., Huang C., Fierke C.A.: **Function and mechanism of zinc metalloenzymes.** *Journal of Nutrition* 2000; 130(5S Suppl):1437S-1446S
54. Hernick M., Fierke C.A.: **Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 433:71-84
55. Holz R.C., Bzymek K.P., Swierczek S.I.: **Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2003; 7:197-206
56. Neale J.H., Olszewski R.T., Gehl L.M., Wroblewska B., Bzdega T.: **The neurotransmitter N-acetylaspartylglutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia.** *Trends in Pharmacological Sciences* 2005; 26:477-484
57. Tieman S.B.: **Cellular localization of NAAG.** *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2006; 576:289-301 (discussion 361-363)
58. Cassidy M., Neale J.H.: **Localization and transport of N-acetylaspartylglutamate in cells of whole murine brain in primary culture.** *Journal of Neurochemistry* 1993; 60:1631-1638
59. Gehl L.M., Saab O.H., Bzdega T., Wroblewska B., Neale J.H.: **Biosynthesis of NAAG by an enzyme-mediated process in rat central nervous system neurons and glia.** *Journal of Neurochemistry* 2004; 90:989-997
60. Wroblewska B., Wroblewski J.T., Pshenichkin S., Surin A., Sullivan S.E., Neale J.H.: **N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells.** *Journal of Neurochemistry* 1997; 69:174-181
61. Valivullah H.M., Lancaster J., Sweetnam P.M., Neale J.H.: **Interactions between N-acetylaspartylglutamate and AMPA, kainate, and NMDA binding sites.** *Journal of Neurochemistry* 1994; 63:1714-1719
62. Bruno V., Wroblewska B., Wroblewski J.T., Fiore L., Nicoletti F.: **Neuroprotective activity of N-acetylaspartylglutamate in cultured cortical cells.** *Neuroscience* 1998; 85:751-757
63. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R.: **Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.** *Journal of Neuroscience* 1987; 7:357-368
64. Meldrum B.S.: **Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology.** *Journal of Nutrition* 2000; 130(4S Suppl):1007S-1015S

65. Palmada M., Centelles J.J.: **Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain.** *Frontiers in Bioscience* 1998; 3:701-718
66. Choi D.W.: **Ionic dependence of glutamate neurotoxicity.** *Journal of Neuroscience* 1987; 7:369-379
67. Doble A.: **The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy.** *Pharmacology & Therapeutics* 1999; 81:163-221
68. Becker J.U., Wira C.R., Arnold J.L.: **Stroke, ischemic.** *eMedicine* 2006; webová adresa: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic558.htm>
69. Slusher B.S., Vornov J.J., Thomas A.G., Hum 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., Jackson P.F.: **Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury.** *Nature Medicine* 1999; 5:1396-1402
70. Zhao J., Ramadan E., Cappiello M., Wroblewska B., Bzdega T., Neale J.H.: **NAAG inhibits KCl-induced [³H]-GABA release via mGluR3, cAMP, PKA and L-type calcium conductance.** *European Journal of Neuroscience* 2001; 13:340-346
71. Thomas A.G., Liu W., Olkowski J.L., Tang Z., Lin Q., Lu X.C., Slusher B.S.: **Neuroprotection mediated by glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) inhibition requires TGF-beta.** *European Journal of Pharmacology* 2001; 430:33-40
72. Bruno V., Sureda F.X., Storto M., Casabona G., Caruso A., Knopfel T., Kuhn R., Nicoletti F.: **The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a glial-neuronal signaling.** *Journal of Neuroscience* 1997; 17:1891-1897
73. Bruno V., Wroblewska B., Wroblewski J.T., Fiore L., Nicoletti F.: **Neuroprotective activity of N-acetylaspartylglutamate in cultured cortical cells.** *Neuroscience* 1998; 85:751-757
74. Bacich D.J., Wozniak K.M., Lu X.C., O'Keefe D.S., Callizot N., Heston W.D., Slusher B.S.: **Mice lacking glutamate carboxypeptidase II are protected from peripheral neuropathy and ischemic brain injury.** *Journal of Neurochemistry* 2005; 95:314-323
75. Horoszewicz J.S., Kawinski E., Murphy G.P.: **Monoclonal-antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic-cancer patients.** *Anticancer Research* 1987, 7:927-936

76. Wright G.L., Haley C., Beckett M.L., Schellhammer P.F.: **Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues.** *Urologic Oncology* 1995; 1:18–28
77. Wright G.L. Jr., Grob B.M., Haley C., Grossman K., Newhall K., Petrylak D., Troyer J., Konchuba A., Schellhammer P.F., Moriarty R.: **Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy.** *Urology* 1996; 48:326-334
78. Liu H., Moy P., Kim S., Xia Y., Rajasekaran A., Navarro V., Knudsen B., Bander N.H.: **Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium.** *Cancer Research* 1997; 57:3629-3634
79. Chang S.S., O'Keefe D.S., Bacich D.J., Reuter V.E., Heston W.D., Gaudin P.B.: **Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature.** *Clinical Cancer Research* 1999; 5:2674-2681
80. Hinkle G.H., Burgers J.K., Neal C.E., Texter J.H., Kahn D., Williams R.D., Maguire R., Rogers B., Olsen J.O., Badalament R.A.: **Multicenter radioimmunoscintigraphic evaluation of patients with prostate carcinoma using indium-111 capromab pendetide.** *Cancer* 1998; 83:739-747
81. Food and Drug Administration: **Summary for Basis of Approval: ProstaScint.** Webová adresa: <http://www.fda.gov/cder/biologics/sba/capcyt102896sba.pdf>
82. Fitch W.M.: **Homology a personal view on some of the problems.** *Trends in Genetics* 2000; 16:227-231
83. Rovenská M., Hloučová K., Šácha P., Mlčochová P., Horák V., Zámečník J., Bařinka C., Konvalinka J.: **Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs.** *Prostate* 2008; 68:171-182
84. 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., Neale J.H.: **Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate.** *Journal of Neurochemistry* 2002; 83:20-29
85. Bzdega T., Crowe S.L., Ramadan E.R., Sciarretta K.H., Olszewski R.T., Ojeifo O.A., Rafalski V.A., Wroblewska B., Neale J.H.: **The cloning and characterization of a second brain enzyme with NAAG peptidase activity.** *Journal of Neurochemistry* 2004; 89:627-635
86. Luthi-Carter R., Berger U.V., Barczak A.K., Enna M., Coyle J.T.: **Isolation and expression of a rat brain cDNA encoding glutamate carboxypeptidase II.** *PNAS* 1998; 95:3215-3220

87. Promega: **Protocol for Pfu DNA Polymerase**. *Promega Technical Resources*. Webová adresa: <http://www.promega.com/tbs/9pim774/9pim774.pdf>
88. QIAGEN: **QIAquick® Spin Handbook**. *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols*. Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000252>
89. Invitrogen™: **TOPO TA Cloning® User Manual**. *Invitrogen Manuals & Documents*. Webová adresa: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf
90. Stratagene: **QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit**. *Stratagene Manuals*. Webová adresa: <http://www.stratagene.com/manuals/200519.pdf>
91. QIAGEN: **QIAprep® Miniprep Handbook**. *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols*. Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>
92. QIAGEN: **QIAGEN Plasmid Purification Handbook**. *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols*. Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000229>
93. Bradford M.M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-254
94. Clontech: **PIRES Vector**. *Clontech products*. Webová adresa: http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10480&tabno=2
95. Invitrogen™: **pcDNA™4/V5-His A, B, and C**. *Invitrogen Manuals & Documents*. Webová adresa: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna4v5his_man.pdf
96. Clontech: **Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual**. *Clontech products*. Webová adresa: http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10493
97. Jackson P.F., Cole D.C., Slusher B.S., Stetz S.L., Ross LE, Donzanti BA, Trainor DA.: **Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase**. *Journal of Medicinal Chemistry* 1996; 39:619-622

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence zapůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka