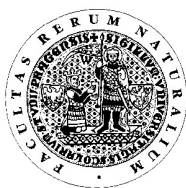


Diplomová práce

Klonování, exprese a biochemická charakterizace myší glutamátkarboxypeptidasy II

Tomáš Knedlík

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



Katedra biochemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Výzkumné centrum Gilead Sciences & IOCB
Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha 2010

Diploma thesis

Cloning, expression and biochemical characterization of mouse glutamate carboxypeptidase II

Tomáš Knedlík

Supervisor: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.



Department of Biochemistry
Faculty of Science
Charles University in Prague



Gilead Sciences and IOCB Research Center,
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
Academy of Sciences of the Czech Republic

Prague 2010

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

V Praze dne 28. 4. 2010

.....

Abstrakt

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) je membránová metalopeptidasa, jež je u člověka exprimována v mnoha tkáních, zejména pak v prostatě, centrální nervové soustavě a tenkém střevě. V centrální nervové soustavě GCPII hydrolyzuje nejrozšířenější peptidový neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát na N-acetyl-aspartát a volný glutamát. Volný glutamát je významný excitační neurotransmitter a jeho uvolněním do synaptické štěrby se GCPII podílí na glutamátové neurotoxicitě při patologických stavech. Inhibice této proteolytické aktivity byla prokázána na potkaních modelech jako neuroprotektivní. V lidském tenkém střevě GCPII odštěpuje koncové glutamátové zbytky z poly- γ -glutamylovaných folátů, čímž umožňuje jejich vstřebávání. Funkce GCPII v prostatě je stále neznámá, avšak díky velmi vysoké expresi v nádorech prostaty se GCPII využívá jako marker pro diagnózu nádorových onemocnění prostaty. GCPII by tak mohla být nejenom diagnostickým markerem, ale i perspektivním cílem pro terapii nádorových onemocnění i pro léčbu mozkových poruch způsobených glutamátovou excitotoxicitou.

Pro vývoj a testování nových léků a léčebných metod je nutné mít vhodný zvířecí model. Vhodným modelovým organismem je např. myš (*Mus musculus*), která je hojně užívána v mnoha vědeckých studiích. Přesto dosud nebyla provedena žádná studie týkající se porovnání myší a lidské GCPII co se týče jejich enzymové aktivity, inhibičního profilu a tkáňové distribuce. Případné rozdíly v expresi či aktivitě/inhibici mezi lidským a myším orthologem by mohly být velmi relevantní pro testování nových léčiv či nových léčebně-diagnostických metod založených na GCPII (jak protinádorových, tak neuroprotektivních).

Rekombinantní myší GCPII byla klonována, exprimována, purifikována afinitní chromatografií a následně charakterizována. V porovnání s rekombinantní lidskou GCPII vykazuje myší GCPII podobnou aktivitu, substrátovou specifitu i citlivost ke specifickému inhibitoru lidské GCPII. Protilátky vytvořené proti denaturované lidské GCPII rozpoznávaly i myší GCPII. Naopak protilátky vytvořené proti nativní lidské GCPII neinteragovaly s myší GCPII. U několika myších a lidských tkání byly pozorovány velké rozdíly v expresi GCPII svědčící o poněkud odlišné tkáňové distribuci GCPII v obou organismech. Dále se podařilo vytvořit stabilní savčí buněčnou linii inducibilně exprimující myší GCPII. Během krystalizačních pokusů byly připraveny mikrokristaly myší GCPII; podmínky budou dále optimalizovány pro získání dostatečně velkých krystalů a následné vyřešení trojrozměrné struktury myší GCPII rentgenovou krystalografií.

English Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) is a membrane metallopeptidase expressed in many human tissues, predominantly in prostate, brain and small intestine. In brain it cleaves the most abundant peptide neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamate into N-acetyl-L-aspartate and free L-glutamate. Thus, GCPII participates in glutamate excitotoxicity through the release of free glutamate into the synaptic cleft. Inhibition of this activity has been shown to be neuroprotective in rats. In the human jejunal brush border, GCPII cleaves off terminal glutamate moieties from poly- γ -glutamylated folates, which can be then transported across the intestinal mucosa. The function of GCPII in human prostate is unknown but it is overexpressed in prostate cancer. Therefore, GCPII is an important marker of prostate cancer and its progression. Moreover, it could become a perspective target for treatment of prostate cancer as well as neuronal disorders associated with glutamate excitotoxicity.

For the development and testing of novel drugs and therapeutics it is necessary to have an appropriate animal model. Mouse (*Mus musculus*) is such a model and it is widely used by many experimentators. However, no detailed comparison of mouse and human GCPII orthologs regarding their enzymatic activity, inhibition profile and expression has been provided yet. Possible variations in expression and activity profiles among the human and mouse orthologs are very relevant for the development of novel GCPII-based anticancer and neuroprotective drugs and therapeutical methods.

We cloned, expressed, purified and subsequently characterized recombinant mouse GCPII and compared it to its human ortholog. Activity, substrate specificity and inhibition of mouse GCPII are similar to human GCPII. We show that monoclonal antibodies raised against denatured human GCPII recognize mouse GCPII. On the contrary, antibodies raised against native human GCPII do not interact with mouse GCPII. Significant differences in GCPII expression in several mouse and human tissues were observed. We also established stable mammalian cell line for inducible expression of mouse GCPII. Finally, microcrystals of mouse GCPII were prepared during crystallization trials; crystallization conditions will be further optimized for obtaining sufficiently large monocrystals that could be used for mouse GCPII structure determination.

(In Czech)

Poděkování

Tato práce vznikla během posledních dvou let a za tuto dobu bylo do ní „vtaženo“ poměrně velké množství mých kolegů, kteří se na jejím vzniku určitým způsobem spolupodíleli. Těm všem bych chtěl na této půlstraně poděkovat.

Na prvním místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Janu Konvalinkovi, pod jehož přátelským vedením, s množstvím nápadů, rad a pomoci, byla radost pracovat.

Mé velké díky patří dále Pavlíkovi Šáchovi a Honzovi Tykvartovi, kteří mě naučili většinu metod použitých v této práci a kteří mi pomáhali s návrhem i vyhodnocením mnohdy zoufalých experimentů. Michal Navrátil byl skvělým konzultantem problémů enzymové aktivity a s Vaškem Navrátilem jsem strávil množství času nad úskalími klonování DNA. Franta Sedlák mi ukázal, že s protilátkami to není až tak jednoduché, jak jsem si do té doby myslel. Klárka Hlouchová, ač nyní zaneprázdněna mnohem krásnějšími „starostmi“, byla vždy ochotná mi pomoci, zejména co se hledání prastarých zmrzlých vzorků týče. Jana Starková a Karolína Šrámková se staraly nejenom o mé buňky, ale v ranních hodinách často také o mne.

Děkuji dále Klárce Grantz-Šaškové a Petru Pachlovi, kteří mi ukázali krásy (a útrapy) krystalizace proteinů. Mirka Rovenská si zaslouží mé poděkování za pomoc s výběrem mých projektů a prvotní biochemickou péčí. Stejně tak děkuji všem svým ostatním kolegům – je to jejich zásluha, že atmosféra u (pracovního) stolu byla vždy tak skvělá.

Poslední odstavec mých díky je vyhrazen pro mou rodinu, která mi vždy věřila a podporovala ve všech mých krocích. Stejně tak děkuji Veronice, která je mou oporou, motivací i radostí.

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1 Historie GCPII	11
2.2 GCPII v lidském genomu	11
2.3 GCPII na úrovni mRNA	12
2.3.1 PSM'	12
2.3.2 PSM-C, PSM-D a PSM-E.....	12
2.4 Struktura GCPII	13
2.5 Fyziologické funkce GCPII	14
2.5.1 Enzymové aktivity GCPII.....	14
2.5.1.1 Hydrolýza NAAG	15
2.5.1.2 Hydrolýza polyglutamylovaných folátů	15
2.5.1.3 Substrátová specifita GCPII.....	16
2.5.1.4 Inhibitory GCPII	16
2.5.2 Internalizace GCPII	18
2.6 GCPII jako terapeuticko-diagnostický cíl	18
2.6.1 GCPII a neuropatologie	18
2.6.1.1 Neurotransmitter NAAG.....	19
2.6.1.2 Glutamátová excitotoxicita	19
2.6.1.3 Cévní mozková příhoda a role GCPII.....	20
2.6.1.4 Traumatické poranění mozku	21
2.6.1.5 Neuropatická bolest a zánětlivá bolest.....	21
2.6.1.6 Neurodegenerativní choroby.....	22
2.6.2 GCPII jako diagnosticko-terapeutický cíl v nádorech	22
2.6.2.1 Exprese GCPII v normální a nádorové prostatě	22
2.6.2.2 Exprese GCPII v neovaskulatuře neprostatických nádorů	23
2.6.2.2.1 GCPII a vztah k angiogenesi	23
2.6.2.3 Diagnostické metody založené na GCPII	24
2.6.2.3.1 Protilátky proti GCPII konjugované s radionuklidy	24
2.6.2.3.2 Nízkomolekulární ligandy GCPII.....	25
2.6.2.4 Terapie	25
2.6.2.4.1 Protilátky proti GCPII konjugované s radionuklidy	25
2.6.2.4.2 Protilátky proti GCPII konjugované s toxiny	26
2.6.2.4.3 Jiné typy terapie využívající GCPII.....	26
2.7 Orthology lidské GCPII	27
2.7.1 Myší GCPII.....	28
3. Cíle práce	31
4. Materiál a metody	32
4.1 Chemikálie, média, enzymy a další materiál	32
4.2 Přístroje	34
4.3 Metody	36

4.3.1	Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	36
4.3.2	Horizontální agarosová elektroforéza	37
4.3.3	Restrikční štěpení, defosforylace a ligace DNA	37
4.3.4	Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> DH5a.....	38
4.3.5	Midipreparace plasmidové DNA	38
4.3.6	Sekvenování plasmidové DNA.....	38
4.3.7	Transfekce hmyzích buněk a selekce stabilní buněčné linie	39
4.3.8	Stanovení počtu živých buněk užitím trypanové modři	40
4.3.9	Expres rekombinantní myši GCPII	40
4.3.10	Purifikace rekombinantní myši GCPII afinitní chromatografií	41
4.3.11	Dialýza	42
4.3.12	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukujících podmínek (SDS-PAGE).....	42
4.3.13	Elektropřenos proteinů na nitroceluloseovou membránu (Western Blot).....	43
4.3.14	Barvení polyakrylamidového gelu.....	44
4.3.15	Koncentrování purifikované rekombinantní myši GCPII.....	44
4.3.16	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	45
4.3.17	Radiometrické měření peptidasové aktivity s použitím značeného substrátu ..	45
4.3.18	Testování substrátové specifity myši GCPII	46
4.3.19	Imunoprecipitace myši GCPII protilátkami.....	47
4.3.20	Transfekce savčích buněk a tvorba stabilní buněčné linie.....	47
4.3.21	Homogenizace savčích buněk (příprava buněčného lyzátu).....	48
4.3.22	Homogenizace tkání	48
4.3.23	Krystalizace myši GCPII	48
4.3.23.1	Krystalizace difusí par (visící kapka)	49
4.3.23.2	Krystalizace difusí par (sedící kapka) s využitím krystalizačního robotu ..	49
5.	Výsledky	50
5.1	Klonování extracelulární myši GCPII	50
5.2	Heterologní exprese rekombinantní extracelulární myši GCPII v hmyzích S2 buňkách.....	52
5.3	Purifikace rekombinantní myši GCPII afinitní chromatografií	53
5.4	Porovnání enzymové aktivity myši a lidské rekombinantní GCPII.....	55
5.4.1	Kinetické parametry pro hydrolyzu endogenního substrátu N-Ac-Asp-Glu	55
5.4.2	Inhibice proteolytické aktivity myši GCPII pomocí 2-PMPA.....	56
5.4.3	Substrátová specifita rekombinantní myši GCPII	57
5.5	Imunochemické studie myši a lidské GCPII	59
5.5.1	Imunochemické stanovení myši GCPII s použitím protilátek připravených proti denaturovanému lidskému enzymu	59
5.5.2	Imunoreaktivita myši GCPII vůči protilátkám připravených proti nativní lidské GCPII.....	60
5.5.3	Porovnání tkáňové distribuce GCPII v <i>Mus musculus</i> a <i>Homo sapiens</i>	61
5.6	Tvorba stabilní savčí buněčné linie exprimující myši GCPII.....	62
5.7	Krystalizace myši GCPII.....	64
6.	Diskuze	65
7.	Závěr.....	70

8. Seznam zkratek	71
9. Příloha	73
10. Seznam použité literatury	74

1. Úvod

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) je membránová metalopeptidasa, jež je u člověka exprimována v mnoha tkáních, zejména pak v prostatě, centrální nervové soustavě, tenkém střevě a ledvinách. GCPII má dvě známé fyziologické enzymové aktivity.

V lidském tenkém střevě GCPII odštěpuje koncové glutamátové zbytky z poly- γ -glutamylovaných folátů, čímž umožňuje jejich vstřebávání přes střevní mukosu. V centrální nervové soustavě GCPII hydrolyzuje nejrozšířenější peptidový neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát na N-acetyl-aspartát a volný glutamát. Volný glutamát je významný excitační neurotransmitter a jeho uvolněním do synaptické štěrby se GCPII podílí na glutamátové neurotoxicitě při patologických stavech. Inhibice této proteolytické aktivity byla prokázána na potkaních modelech jako neuroprotektivní.

Funkce GCPII v prostatě (a ostatních tkáních) je i přes intenzivní výzkum stále neznámá. Prostata je u člověka tkání s nejvyšší expresí GCPII a tato exprese se dále mnohonásobně zvyšuje v případě nádorového onemocnění prostaty. Z tohoto důvodu je GCPII využívána jako marker pro diagnózu onemocnění prostaty a jejího vývoje.

Z výše uvedeného je zřejmé, že GCPII by mohla být nejenom diagnostickým markerem, ale i perspektivním cílem pro terapii nádorových onemocnění. Stejně tak by bylo možné GCPII využít pro léčbu mozkových poruch způsobených glutamátovou excitotoxicitou.

Pro vývoj a testování nových léků a léčebných metod je nutné mít vhodný zvířecí model. Vhodným modelovým organismem je např. myš (*Mus musculus*), která je hojně užívána v mnoha vědeckých studiích. Přesto dosud nebyla provedena žádná studie týkající se porovnání myší a lidské GCPII co se týče jejich enzymové aktivity, inhibičního profilu a tkáňové distribuce. Případné rozdíly v expresi či aktivitě/inhibici mezi lidským a myším orthologem by mohly být velmi relevantní pro testování nových léčiv či nových léčebně-diagnostických metod založených na GCPII (jak protinádorových, tak neuroprotektivních).

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit a charakterizovat myší GCPII jako rekombinantní protein.

2. Teoretická část

2.1 Historie GCPII

GCPII byla zpočátku studována jako několik rozdílných proteinů, s různými aktivitami či funkcemi, což vedlo k několika různým pojmenováním. Tato jména v daných oblastech výzkumu dodnes přežívají a často jsou používanější než oficiální název enzymu.

V roce 1987 Horoszewicz *et al.* detekoval monoklonální protilátkou 7E11-C5.3 nový antigen na lidských prostatických buňkách. Specifita 7E11-C5.3 byla omezena téměř výhradně na lidskou epiteliální tkáň prostaty; nereagovala s žádnou testovanou lidskou buněčnou linií (s výjimkou imunogenní linie LNCaP) ani s žádným z testovaných neprostatických nádorů. Toto omezení exprese antigenu na prostatu vedlo k jeho pojmenování PSMA (z angl. prostate-specific membrane antigen) [1].

Ve stejném roce Robinson *et al.* identifikoval v krysím mozku novou peptidasu štěpící neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) a pojmenoval ji NAALA dipeptidasa (později upraveno na NAALADasa, z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase) [2].

Roku 1996 Carter *et al.* zjistila, že PSMA vykazuje stejnou hydrolytickou aktivitu a farmakologický profil jako NAALADasa a že se jedná o jediný enzym [3].

Opět téhož roku Pinto *et al.* pozoroval i foláthydrolasovou aktivitu PSMA [4].

O rok později byla všechna jména na doporučení Názvoslovné komise IUBMB sjednocena pod název glutamátkarboxypeptidasa II, který bude jednotně používán v této práci [5].

2.2 GCPII v lidském genomu

Gen pro GCPII se skládá z 19 exonů a 18 intronů a pokrývá přibližně 62 kbp genomové DNA [6]. Gen byl lokalizován na chromosomu 11, v lokusu p11–p12 [6, 7].

Na chromosomu 11 byly lokalizovány i geny pro dva homology GCPII. Gen pro GCPIII se nachází v oblasti q14.3–q21 a gen pro NAALADasu L (NAALADasa-, „like“ protein) v oblasti 11q12 [8].

2.3 GCPII na úrovni mRNA

GCPII je kódována mRNA o délce 2653 nt. V prostatě však byly popsány i alternativně sestřižené mRNA; jednotlivé varianty byly pojmenovány jako PSM', PSM-C, PSM-D a PSM-E.

2.3.1 PSM'

Su *et al.* identifikovala v normální prostatické tkáni vedle již popsané mRNA GCPII i její alternativně sestřiženou variantu, jež pojmenovala PSM' [9]. V případě mRNA PSM' (2387 nt) dochází k delecí 266 nukleotidů na 5' konci mRNA GCPII (nukleotidy 114 – 380). Tato delece zahrnuje kodon pro zahájení translace proteinu (AUG), stejně jako jeho intracelulární a transmembránovou část [9]. Translace mRNA PSM' tak využívá jiný iniciační kodon (Met-58), jejímž výsledkem je cytoplazmatický protein postrádající prvních 59 aminokyselin přítomných v sekvenci GCPII (sekvence PSM' začíná Ala-60, dochází tedy pravděpodobně k částečné N-koncové proteolýze) [10].

Zajímavostí je fakt, že mRNA odpovídající GCPII převažuje v maligní prostatě a buňkách LNCaP, zatímco v normální prostatě převažuje sestřižená varianta PSM'. Vzájemný poměr množství obou mRNA (GCPII:PSM') pak koreluje se stupněm vývoje nádoru (karcinom prostaty 6 – 8, benigní hypertrofie prostaty 1,6 – 0,75 a normální prostata 0,45 – 0,075) [9].

2.3.2 PSM-C, PSM-D a PSM-E

PSM-C (o délce 2520 nt) využívá stejné sestřihové donorové místo jako PSM' (nt 114), ale jiné akceptorové místo uvnitř intronu 1 v genomové sekvenci GCPII. Tím vzniká mRNA obsahující 133 nukleotidů navíc oproti PSM' [11].

PSM-D (2488 nt) využívá taktéž stejné donorové místo jako PSM', ale unikátní akceptorové místo uvnitř intronu 1 v genomové sekvenci GCPII [11].

PSM-E se od GCPII liší 97 nt úsekem inzertovaným do sekvence GCPII a zároveň nepřítomnosti 93 nt přítomných v sekvenci GCPII. Exprese mRNA PSM-E je v nádorech prostaty stejně jako v případě GCPII závislá na stupni malignity nádoru [12].

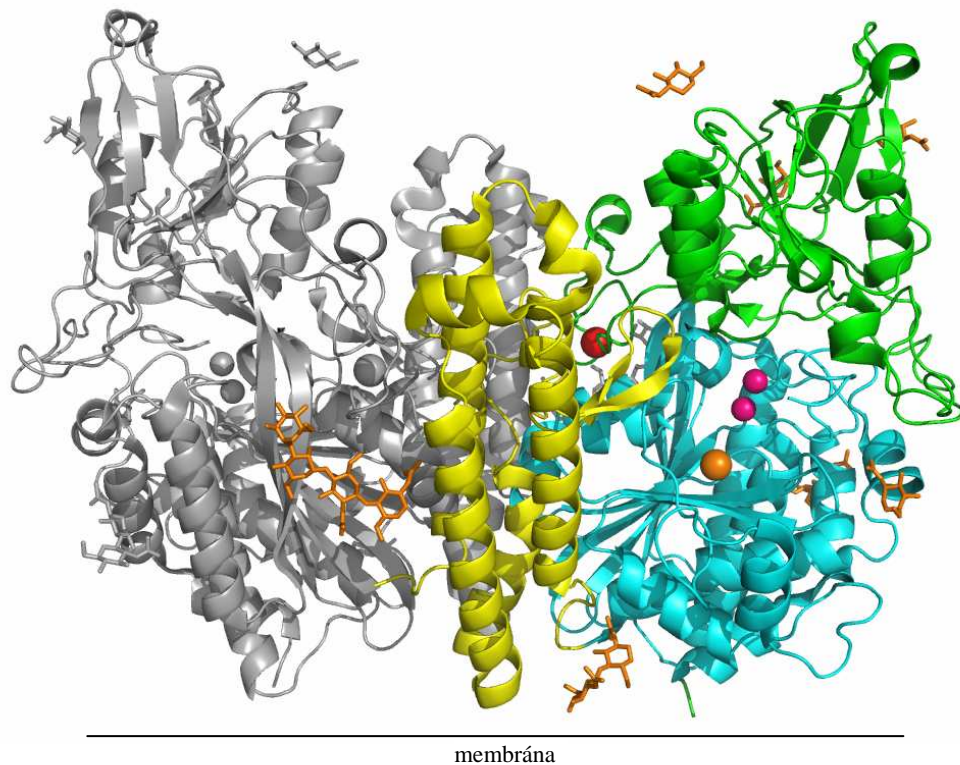
2.4 Struktura GCPII

GCPII je membránový glykoprotein II. typu o délce polypeptidového řetězce 750 aminokyselin a zdánlivé molekulové hmotnosti okolo 100 kDa [13]. GCPII vytváří symetrický nekovalentně asociovaný homodimer [14, 15], podle některých autorů je dimerizace GCPII nutná pro její enzymovou aktivitu [16].

GCPII má krátkou N-koncovou cytoplazmatickou část (predikovaný aminokyseliny 1 – 19), jedinou transmembránovou část (20 – 43) a rozsáhlou C-koncovou extracelulární část (44 – 750), jež je zodpovědná za enzymovou aktivitu GCPII [13, 17]. Extracelulární část GCPII se skládá ze tří domén – proteasové, apikální a C-koncové [15] a vykazuje 28% identitu (na aminokyselinové úrovni) i celkovou prostorovou podobnost s transferinovým receptorem (obr. 1, str. 14) [14, 15, 18]. Všechny tři domény se podílí na rozpoznávání substrátu [15].

Vedle dvou zinečnatých kationtů v aktivním místě, nezbytných pro enzymovou aktivitu, se v molekule GCPII nachází dva další ionty: chloridový anion podílející se na stabilizaci aminokyselinových zbytků v S1 vazebném místě [19] a vápenatý kation, který pravděpodobně stabilizuje strukturu dimeru GCPII [15].

GCPII je glykosylována na všech svých 10 potenciálních N-glykosylačních místech [20]. Glykosylace je zároveň nepostradatelná pro enzymovou aktivitu GCPII [17]. Žádný z oligosacharidových řetězců však není v přímém kontaktu se substrátem, proto vliv glykosylace na aktivitu enzymu spočívá pravděpodobně ve správném sbalení proteinu [15].



Obr. 1: Krystalová struktura extracelulární části lidské GCPII.

GCPII je homodimerní membránový glykoprotein (membrána je symbolicky naznačena). Jeden monomer je šedý, druhý je barevně rozlišený na jednotlivé domény – apikální doména zeleně, proteasová modře a C-koncová žlutě. Zinečnaté kationty v aktivním místě jsou znázorněny růžovými kuličkami, blízký chloridový anion oranžovou a vápenatý kation červenou. Oligosacharidové řetězce jsou vyznačeny oranžově. Struktura GCPII odpovídá enzymu bez substrátu či inhibitoru v aktivním místě (PDB kód: 2oot, [21]).

2.5 Fyziologické funkce GCPII

2.5.1 Enzymové aktivity GCPII

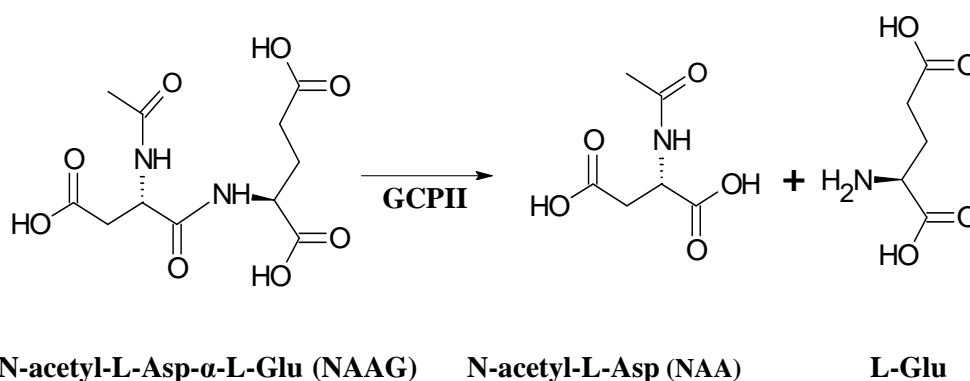
Metalopeptidasa GCPII (EC 3.4.17.21) patří do klanu MH a rodiny M28 v databázi metalopeptidas MEROPS. Peptidasy rodiny M28 se vyznačují přítomností ko-katalytických zinečnatých kationtů v aktivním místě [22]. GCPII vykazuje dvě enzymové aktivity – tzv. NAALADasovou aktivitou, spočívající v hydrolýze neurotransmiteru N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG), a foláthydrolasovou aktivitou, kdy dochází k odštěpování koncových glutamátů v poly- γ -glutamylovaných folátech [2, 4].

Purifikovaná rekombinantní GCPII má pro hydrolýzu NAAG optimum v rozmezí pH 7 – 8; $K_m = 1200$ nM a $k_{cat} = 1,1$ s⁻¹ [23]. Pro lyzát buněk PC-3 (z angl. prostate cancer

cells) transfekovaných lidskou GCPII byla publikována hodnota $K_m = 50$ nM pro NAAG [24]. Nutno podotknout, že získané hodnoty záleží na konkrétních reakčních podmínkách a uspořádání experimentu.

2.5.1.1 Hydrolýza NAAG

V mozku GCPII hydrolyzuje peptidový neurotransmitter NAAG, čímž se uvolňuje N-acetyl-L-aspartát a volný L-glutamát (obr. 2) [2, 25]. Produkce volného glutamátu a zejména inaktivace dipeptidu NAAG působí neurotoxicky (viz 2.6.1.1 a 2.6.1.2). Inhibice této aktivity GCPII byla prokázána u potkanů jako neuroprotektivní [26].



Obr. 2: Hydrolýza N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamátu.

GCPII hydrolyzuje v lidském mozku N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát, čímž se uvolňuje volný glutamát, jenž je silným excitačním neurotransmiterem.

2.5.1.2 Hydrolýza polyglutamylovaných folátů

Kromě hydrolýzy α -peptidové vazby v dipeptidu NAAG je GCPII schopna fungovat také jako γ -glutamátcarboxypeptidasa (foláthydrolasa), kdy štěpí poly- γ -glutamylované substráty, např. poly- γ -glutamylovaný folát či methotrexát [4, 27]. Touto aktivitou se GCPII stává v tenkém střevě důležitou součástí metabolismu kyseliny listové (folátu), neboť umožňuje vznik volného folátu z poly- γ -glutamylovaných folátů přijatých v potravě. Volný folát pak může být transportován do buňky, kde je využit pro buněčný metabolismus [28].

2.5.1.3 Substrátová specifita GCPII

GCPII vykazuje preferenci dipeptidů s kyselými zbytky, zejména pro dipeptidy s C-koncovým glutamátem a N-koncovým kyselým zbytkem (Ac-L-Asp-L-Glu, Ac-L-Glu-L-Glu a L-Glu-L-Glu), popř. N-koncovým malým nenabitým zbytkem (jako je glycin či alanin) [2, 17]. Důležitá je přítomnost volného γ -karboxylu glutamátu v P1' pozici (jeho amidace silně snižuje afinitu), neboť karboxyl silně interaguje s postranními zbytky aminokyselin ve vazebném místě (K699 a N257) [2, 15, 19]. Přítomnost tří kladně nabitých zbytků v S1 pozici (Arg463, Arg534 a Arg536) dále vysvětluje preferenci GCPII pro kyselé dipeptidy [19].

Poněkud překvapivě Bařinka *et al.* zjistil, že poměrně dobrými substráty jsou Ac-L-Asp-L-Met, Ac-L-Glu-L-Met a Ac-L-Gly-L-Met, které jsou ovšem štěpeny s nižší účinností než výše zmíněné dipeptidy [17].

Afinita GCPII k polyglutamylovaným folátům je přibližně stejná jako afinita k Ac-L-Asp-L-Glu [27]. Zároveň bylo ukázáno, že afinita je prakticky stejná pro foláty i aminobenzoylpolyglutamáty, což znamená, že pteridinová skupina ve folátu má zanedbatelný vliv na vazbu [27].

Pinto *et al.* dále ukázal, že α -připojený glutamát v methotrexátu je pro GCPII těžko odštěpitelný, což je v souladu s tím, že GCPII má velmi podobnou afinitu pro jednotlivé polyglutamylované deriváty folátu, avšak její afinita k monoglutamylovaným derivátům je tisíckrát nižší [4, 27].

2.5.1.4 Inhibitory GCPII

Již v prvotní studii Robinson *et al.* ukázal, že GCPII je inhibována polyvalentními ionty jako je fosfát či sulfát. Zároveň prokázal, že přítomnost chelatačních sloučenin dvojmocných kationtů (EDTA, EGTA, *o*-fenantrolin) vede ke ztrátě aktivity GCPII, což je zcela v souladu s faktem, že GCPII je metalopeptidasa obsahující zinečnaté kationty v aktivním centru [2].

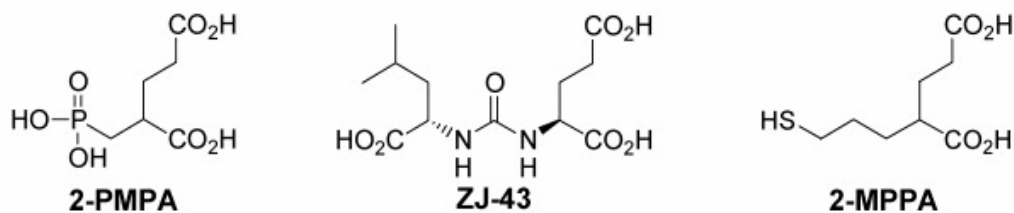
Další skupinou inhibitorů jsou peptidy obsahující C-koncový glutamát, např. kviskvalát (konformačně omezený analog glutamátu) či β -NAAG (N-acetyl-L-aspartyl- β -L-glutamát) [2, 29]. Ačkoliv tyto peptidové inhibitory nikdy nebyly použity pro

experimentální terapii, ukázaly, že C-koncový glutamát je nezbytný pro silnou vazbu inhibitoru ke GCPII, zatímco požadavky na P1 pozici inhibitoru již nejsou tak striktní [30].

Výsledkem dalšího vývoje byl první již vysoce účinný a specifický inhibitor GCPII, kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová (2-PMPA) [30], s hodnotou K_i dosahující 0,2 nM (obr. 3) [31]. Vysoká schopnost inhibice je dána pravděpodobně silnou chelatací zinečnatých kationtů v aktivním místě fosfonátovou skupinou 2-PMPA, stejně tak jako interakcí glutarátového zbytku inhibitoru s místem rozeznávajícím C-koncový glutamát NAAG [32]. Vysoká specifita 2-PMPA vůči GCPII, nízká molekulová hmotnost a vysoká rozpustnost a stabilita umožnily použít 2-PMPA v mnoha studiích se zvířecími modely zabývajících se fyziologickou rolí GCPII a potenciálním terapeutickým využitím inhibice aktivity GCPII [26, 33, 34].

Vysoká polarita fosfonátové skupiny 2-PMPA způsobuje špatnou orální dostupnost, proto byla nahrazena méně polární thiolovou skupinou. Tato substituce vedla k novému inhibitoru, kyselině 2-(3-merkaptopropyl)pentandiové (2-MPPA), která je již orálně dostupná (obr. 3) [35]. 2-MPPA byl zároveň první inhibitor, který byl studován také na člověku; žádné vedlejší účinky v centrální nervové soustavě (CNS) nebyly pozorovány [36].

Vedle fosfonátových a thiolových inhibitorů stojí za zmínku také inhibitory založené na močovíně, jako např. ZJ-43 (kyselina N-[[[(1S)-1-karboxy-3-methylbutyl]amino] karbonyl]-L-glutamová) (obr. 3) [37].



Obr. 3: Příklady inhibitorů GCPII.

Fosfonátový inhibitor 2-PMPA, vysoce účinný a specifický, používaný v mnoha studiích zkoumajících fyziologickou funkci GCPII. Thiolový inhibitor 2-MPPA byl první orálně dostupný inhibitor a zároveň první inhibitor testovaný na člověku. ZJ-43, inhibitor odvozený od močoviny, je nyní v preklinickém výzkumu. Obrázek převzat z [32]. Chemické názvy sloučenin jsou uvedeny v kapitole 2.5.1.4.

2.5.2 Internalizace GCPII

Jak bylo zmíněno, extracelulární část GCPII vykazuje podobnost s transferinovým receptorem (TfR) nejen na aminokyselinové úrovni, ale i v doménové struktuře. GCPII je stejně jako TfR schopna internalizace, za kterou je zodpovědných prvních pět aminokyselin GCPII (tj. MWNLL) [38, 39]. Tento unikátní internalizační motiv (MXXXL) pravděpodobně interaguje s adaptorovým proteinem AP-2 uvnitř buňky [39]. GCPII je internalizována z membrány konstitutivně, avšak rychlost internalizace je zvýšena vazbou protilátky [38]. Zároveň Anilkumar *et al.* ukázal, že cytoplazmatická část GCPII interaguje s filaminem A, fosfoproteinem propojujícím aktin [40]. Tato interakce GCPII s filaminem A snižuje rychlost internalizace GCPII, čímž reguluje endocytosu a vnitrobuněčný transport GCPII [40].

Výše uvedené vlastnosti naznačují, že GCPII by mohla mít i jinou, neenzymatickou, funkci, např. sloužit jako receptor pro dosud neznámý ligand. Takový interakční partner (ať už proteinové či jiné povahy) však zatím nebyl nalezen.

2.6 GCPII jako terapeuticko-diagnostický cíl

2.6.1 GCPII a neuropatologie

GCPII je v lidské CNS exprimována na povrchu astrocytů, nikoliv však na jiném typu buněk [41]. Hydrolýzou neuropeptidu NAAG (N-acetyl-L-Asp- α -L-Glu) přispívá ke zvyšování koncentrace volného glutamátu, což může vést až k neurotoxicitě (viz 2.6.1.2). Význam této aktivity v mozku není proto příliš jasný; jednou z hypotéz je účast GCPII v regulaci synaptické plasticity.

Právě v této oblasti byla většina testů týkající se funkce, inhibice a potenciálního využití GCPII prováděna na potkaních či myších modelech. Z tohoto důvodu je důležité vědět, zda tyto zvířecí homology GCPII plní stejnou funkci jako jejich lidský protějšek, stejně jako fakt, zda jsou po enzymatické stránce dostatečně podobné lidské GCPII.

2.6.1.1 Neurotransmitter NAAG

N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) je nejhojněji se vyskytující peptidový neurotransmitter v savčí centrální i periferní nervové soustavě, kde dosahuje mikro- až milimolárních koncentrací [42].

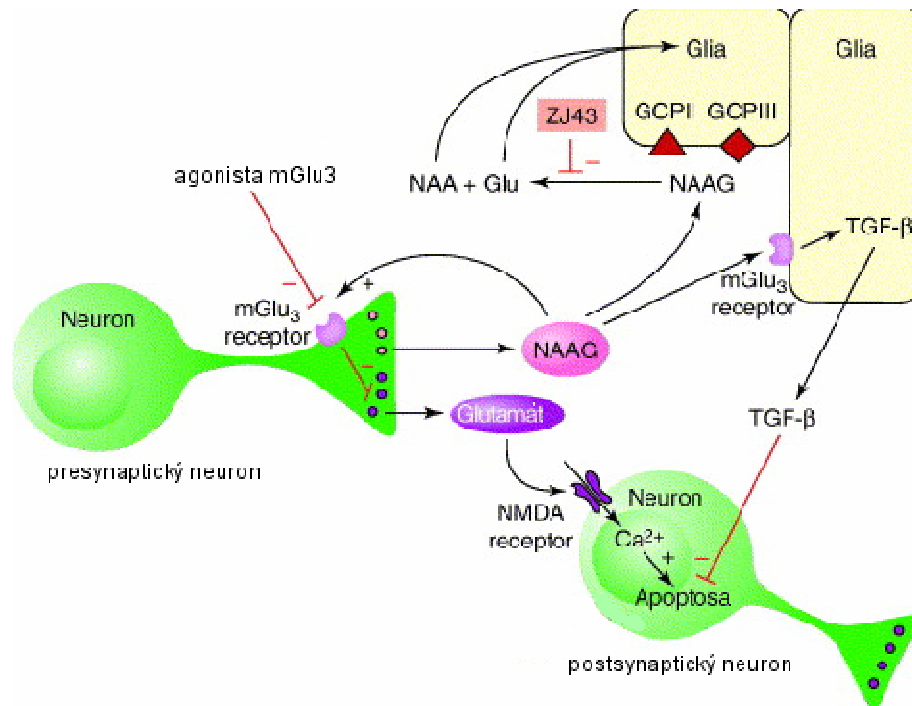
NAAG funguje jako ko-neurotransmitter s malými aminovými neurotransmitery, včetně glutamátu, acetylcholinu, serotoninu a GABA (kyselina γ -aminobutanová) [43]. Po svém uvolnění NAAG aktivuje metabotropní glutamátové receptory (mGlu receptory) třídy II, zejména pak receptory mGlu3 [44, 45]. Zároveň je slabým aktivátorem N-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA receptory) [46]. NAAG je po svém uvolnění do synaptické štěrby inaktivován účinkem GCPII (popř. GCPIII) za vzniku N-acetyl-L-aspartátu a volného L-glutamátu [2, 47].

Aktivací presynaptických mGlu3 receptorů působí NAAG neuroprotektivně, neboť inhibuje uvolnění klasických primárních neurotransmiterů jako je glutamát či GABA. Vedle toho způsobuje uvolnění neuroprotektivních transformujících růstových faktorů β (TGF- β) [33, 48, 49].

2.6.1.2 Glutamátová excitotoxicita

Glutamát je nejrozšířenější excitační neurotransmitter v savčí CNS, jenž svůj účinek přenáší skrze několik typů receptorů [50]. Zvýšená množství glutamátu jsou spojena s množstvím mozkových poruch, jako je cévní mozková příhoda, neuropatické bolesti, amyotrofická laterální sklerosa či schizofrenie [shrnutí v 51].

Excitotoxicita je proces nastávající při zvýšené excitaci receptorů (např. patologicky vysokými koncentracemi glutamátu) vedoucí až ke smrti buňky. Vysoká koncentrace extracelulárního glutamátu způsobuje nadměrnou aktivaci NMDA receptorů, což vede ke zvýšení koncentrace intracelulárních vápenatých iontů, jejichž fyziologická koncentrace je velmi nízká ($\sim 10^{-7}$ M). Nárůst koncentrace Ca^{2+} aktivuje buněčné endonukleasy, fosfolipasy, proteasy apod. Aktivace těchto enzymů vede spolu s dalšími procesy až k buněčné smrti (obr. 4, str. 20) [shrnutí v 51, 52, 53, 54].



Obr. 4: Model inhibice GCPII a její vliv na excitotoxicitu při ischemii.

Po svém uvolnění glutamát aktivuje NMDA receptory na postsynaptických neuronech, při nadměrné excitaci může tento proces vést k neurotoxické. Patologicky vysoká množství glutamátu působí excitotoxicky skrze aktivaci NMDA receptorů. NAAG (N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát) je po svém uvolnění inaktivován účinkem GCPII a GCPIII. Inhibice této reakce (zde inhibítozem ZJ43) zvyšuje koncentraci NAAG a působí neuroprotektivně. NAAG inhibuje uvolnění dalšího excitotoxického glutamátu aktivací presynaptických mGlu3 receptorů (proces je blokovan antagonisty mGlu2/3 receptorů); zároveň stimuluje uvolnění neuroprotektivního transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) aktivací gliálních mGlu3 receptorů. Převzato z [51].

2.6.1.3 Cévní mozková příhoda a role GCPII

Při cévní mozkové příhodě dochází k poškození mozkové tkáně díky přerušení krevního zásobení (ischemii). Ischemie má za následek nedostatek glukosy a kyslíku, což vede k zástavě syntézy ATP a následnému narušení iontové rovnováhy v buňce. Následná depolarizace vede k uvolnění glutamátu a následné excitotoxicitě (viz 2.6.1.2) [55].

V souvislosti s GCPII byla provedena řada studií, které ukázaly, že inhibice GCPII je neuroprotektivní a výrazně snižuje excitotoxické poškození mozku při modelech ischemie u potkanů či myši, tzv. okluzi *arteria cerebri media* (MCAO; z angl. middle cerebral artery occlusion) [26, 56, 57]. Slusher *et al.* ukázala, že selektivní inhibice GCPII *in vivo* pomocí 2-PMPA snižuje ischemické poranění mozku po MCAO u potkanů [26].

Neuroprotektivního účinku inhibicí GCPII se dosahuje jednak aktivací presynaptických mGlu3 receptorů (vede ke inhibici uvolnění dalšího glutamátu), jednak aktivací gliálních mGlu3, což vede k uvolnění neuroprotektivních trofických faktorů, jako je transformující růstový faktor- β (TGF- β) [33, 48, 58].

Myši s inaktivovaným genem pro GCPII byly méně náchylné k ischemickému poškození mozku či periferním neuropatickým bolestem při různých modelech poranění (zahrnující MCAO či poranění sedacího nervu) ve srovnání se svými normálními protějšky [59]. Je zajímavé, že v této studii homozygotní myši dorostly bez problémů do dospělosti a nelišily se od normálních myší [47], zatímco jiné dvě studie poukázaly na fakt, že delece genu pro GCPII byla letální již v raném embryonálním stádiu naznačujíc nepostradatelnost GCPII pro ontogenezi [60, 61].

Inhibice GCPII se tedy jeví jako velmi nadějný způsob terapie. Mezi další pozitiva patří fakt, že u inhibitorů GCPII se neprojevují vedlejší účinky, na rozdíl od léčby pomocí blokátorů mGlu receptorů [26]. Zároveň 2-PMPA nemá vliv na normální koncentraci extracelulárního glutamátu, snížení nastává jen při excitotoxicky vysokých koncentracích glutamátu [26].

2.6.1.4 Traumatické poranění mozku

Traumatické poranění mozku nastává při poškození mozku vnější silou (např. úderem) a patří mezi vysoce rozšířené příčiny smrti. Excitotoxicita, způsobená zvýšením koncentrace glutamátu po primárním poranění, je jedním z procesů, které negativně působí na okolní mozkovou tkáň [shrnuto v 62]. Podání inhibitoru ZJ-43 při modelovém poranění mozku u potkanů zvýšilo koncentraci NAAG, což vedlo k nižší koncentraci glutamátu a následné redukci excitotoxického poškození mozku [63].

2.6.1.5 Neuropatická bolest a zánětlivá bolest

Inhibitory GCPII také byly schopny snížit vnímání neuropatické a zánětlivé bolesti u potkanů [64, 65, 66]. Analgetické účinky inhibice GCPII byly v těchto *in vivo* studiích zcela blokovány spolupodáním antagonisty glutamátových receptorů třídy II. To silně podporuje hypotézu, že inhibitory GCPII způsobují analgesii zvýšením koncentrace NAAG, který aktivuje mGlu receptory třídy II, což vede k analgesii [64].

2.6.1.6 Neurodegenerativní choroby

(1) Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní choroba způsobena degenerací motorických neuronů; tato degenerace by mohla být způsobena glutamátovou excitotoxicitou, avšak přesná příčina vzniku ALS není známa. Jako model pro ALS se používají transgenní myši exprimující mutantní formu superoxiddismutasy 1 (SOD1), která je exprimovaná u pacientů s ALS [shrnutí v 67]. Při dlouhodobém orálním podávání inhibitoru 2-MPPA transgenním myším byl výrazně opožděn nástup neurologických symptomů ALS a degenerace motorických neuronů. Stejně tak inhibitor 2-PMPA snížil míru umírání neuronů při *in vitro* testu s buněčnými kulturami transfekovanými SOD1, avšak tento efekt nebyl blokován antagonisty mGlu receptoru třídy II [68].

(2) Při vzniku schizofrenie hraje pravděpodobně hlavní roli dysfunkce dopaminové neurotransmise, avšak je možné, že i glutamátová neurotransmise hraje důležitou úlohu ve vývoji této choroby [69]. Podávání inhibitoru ZJ-43 potkanům výrazně snížilo jejich negativní motorické chování (padání během chůze, pohyby hlavy apod.) popsané u modelu schizofrenie u potkanů [70].

(3) U jiných neurodegenerativních chorob jako jsou Parkinsonova, Huntingtonova či Alzheimerova nemoc byla navržena hypotéza, že vznik chorob určitým způsobem souvisí s dysregulací glutamátové neurotransmise [shrnutí v 62]. Inhibitory GCPII by tak mohly být terapeuticky využitelné i v případě těchto chorob, avšak příčné *in vitro* a *in vivo* studie musí být teprve provedeny.

2.6.2 GCPII jako diagnosticko-terapeutický cíl v nádorech

2.6.2.1 Exprese GCPII v normální a nádorové prostatě

I přesto, že lidská prostata patří mezi tkáně s nejvyšší expresí GCPII [71], je fyziologická funkce GCPII v této tkáni stále neznámá.

Studie prováděné na všech typech lidských prostatických tkání konzistentně prokázaly vysokou expresi GCPII a její další vzrůst v případě prostatických nádorů; exprese GCPII rostla od benigních tkání k adenokarcinomům [72, 73, 74, 75]. Exprese GCPII je obzvláště vysoká v případě špatně diferencovaných, metastatických a agresivních nádorů prostaty [73]. GCPII je v prostatě exprimována pouze epitheliálními buňkami, nikoliv buňkami basálními či stromatickými [75].

Další zajímavou skutečností je změna poměru exprese na úrovni mRNA mezi normální GCPII a její zkrácenou cytoplazmatickou formou PSM' (viz 2.3.1) [9].

Expresi GCPII je v prostatě zvýšena nejenom přechodem od normální tkáni k tkáni nádorové, ale také snížením hladiny androgenů (ať už medikamentózně či chirurgicky) [76]. To je podstatný rozdíl (a výhoda) oproti prostatickému markeru PSA (prostate-specific antigen), jehož exprese je naopak snížena při snížení hladiny androgenů (při tzv. antiandrogenní léčbě).

2.6.2.2 Expresi GCPII v neovaskulatuře neprostatických nádorů

Expresi GCPII na endotheliu neovaskulatury v maligních tkáních poprvé popsal Silver *et al.*, kdy protilátka 7E11-C5.3 pozitivně reagovala s neovaskulaturou karcinomu ledvin, tlustého střeva a močového měchýře [72]. Expresi GCPII v neovaskulatuře nádorů pak potvrdila Liu *et al.*, která s použitím tehdy nových protilátek proti extracelulární části GCPII imunohistochemicky detekovala pozitivitu ve všech 23 testovaných nádorových neovaskulaturách neprostatických karcinomů (např. ledvin, plic či metastatického adenokarcinomu jater) [77].

GCPII je exprimována specificky pouze na endotheliu neovaskulatury v pevných neprostatických nádorech, avšak není exprimována buňkami těchto nádorů, stejně jako není exprimována na endotheliu normálních cév [78]. Velmi překvapivě je GCPII jen velmi málo exprimována neovaskulaturou adenokarcinomů prostaty (pozitivní byly jen 2 z 12 testovaných vzorků [78], ostatní skupiny nepozorovaly dokonce žádnou pozitivitu [72, 77].

Chang *et al.* na základě těchto výsledků navrhnul hypotézu, že exprese GCPII endotheliálními buňkami může být způsobena stimulací angiogenními faktory sekretovanými nádorovými buňkami. V souladu s touto hypotézou je fakt, že neoplasie cév (např. angiosarkomy) neexprimují GCPII; tím, že sama vaskulatura je neoplastická, tak neprodukuje angiogenní faktory [78].

2.6.2.2.1 GCPII a vztah k angiogenezi

Angiogeneze (tvorba nových cév) je několika krokový proces regulovaný pro- a anti-angiogenními faktory. Pro růst a tvorbu metastáz potřebují nádory přísun kyslíku a živin; pro svůj růst nad 1 – 2 mm jsou nádory závislé na angiogenezi [79].

Díky zmíněné specifické expresi GCPII v endotheliích neovaskulatur bylo studováno, zda-li GCPII nemá vliv na tvorbu nádorové neovaskulatury. U myší s inaktivovaným genem pro GCPII bylo ukázáno, že schopnost angiogeneze je silně snížena. Předpokládá se, že GCPII reguluje angiogenesi prostřednictvím ovlivňování signalizace mezi lamininy a integriny a také změnou aktivity kinasy aktivované p21 (PAK-1). V případě inhibice či delece genu GCPII dochází ke snížení invazivity endotheliálních buněk prostřednictvím integrinů, což vede k poruše tvorby nových cév [80].

GCPII tak představuje zajímavý cíl pro nové typy antineovaskulární terapie – jednak pro diagnostiku pevných nádorů protilátkami konjugovanými s radionuklidy či přímo pro terapeutický zásah (viz 2.6.2.4.1).

2.6.2.3 Diagnostické metody založené na GCPII

GCPII, jakožto membránový protein vysoce exprimovaný nádorovými tkáněmi prostaty, je ideálním prostředkem pro zjišťování přítomnosti nádoru, jeho velikosti, lokalizace a účinku léčby. V případě GCPII se využívají dva přístupy – jednak protilátky proti GCPII konjugované s radionuklidy a jednak nízkomolekulární ligandy GCPII.

2.6.2.3.1 Protilátky proti GCPII konjugované s radionuklidy

Nejstarším imunokonjugátem známým jako capromab pendetid či CYT-356 je protilátka 7E11-C5.3 značená radionuklidem ¹¹¹In. V roce 1997 byl schválen k použití americkou FDA (Úřad pro schvalování léčiv a potravin; z angl. Food and Drug Administration) pod komerčním jménem ProstaScint [81]. Nevýhodou CYT-356 je skutečnost, že protilátka 7E11-C5.3 rozpoznává epitop v intracelulární části GCPII [82, 83]. To má za následek, že v živých buňkách není epitop přístupný protilátce – vizualizují se tedy pouze mrtvé či umírající buňky [73, 82, 83].

Druhá generace protilátek proti GCPII již rozpoznává extracelulární část GCPII a je tak schopna vázat se na živé buňky, což s sebou přináší větší citlivost při zobrazování, zejména kostních metastáz [77, 84]. Monoklonální protilátka J591 (opět značená ¹¹¹In), testovaná na tkáňových kulturách, řezech i zvířecích modelech, byla „deimunizována“ nahrazením myších proteinových sekvencí lidskými. Tato humanizovaná verze J591 může být podávána pacientům po dlouhou dobu bez vzniku imunitní odpovědi [85, 86, 87].

S využitím ^{111}In -J591 byla testována i schopnost této protilátky rozpoznávat GCPII na endotheliu neovaskulatur pevných nádorů. Protilátka detekovala nádory různých tkání u 74 % pacientů, což naznačilo možnost anti-neovaskulárního použití konjugátů J591 [88].

2.6.2.3.2 Nízkomolekulární ligandy GCPII

Nevýhodou radio-imunokonjugátů je delší čas, který potřebují k difuzi z cév do míst nádorů (až dny). Tělo může být navíc vystaveno nadbytečné radiaci způsobené dlouhou cirkulací protilátek, popř. se zvyšuje jejich nespecifická vazba na Fc-receptory v játrech [89]. Tyto problémy odpadají u nízkomolekulárních ligandů.

Foss *et al.* připravili dvě nízkomolekulární látky ($M_r \sim 300$), jednu ve formě pro pozitronovou emisní tomografii (PET) s nuklidem ^{11}C , druhou pro jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT) a γ -scintigrafii s nuklidem ^{125}I . Obě látky se *in vivo* vázaly na extracelulární část GCPII, měly nízké pozadí a dokázaly v myších detekovat místa výskytu GCPII (zejména ledviny a močový měchýř) [90].

Dalším přístupem jsou nízkomolekulární fluorescenční látky specifické pro GCPII (s emisním maximem v blízké infračervené oblasti při 790 nm) [91].

2.6.2.4 Terapie

Protinádorové strategie využívající GCPII jsou založeny (alespoň část z nich) na podobném principu jako diagnostické – protilátce proti GCPII konjugované s radionuklidem, cytotoxinem či jiným aktivním agens. Jiný přístup spočívá v aktivaci imunitního systému pacienta.

2.6.2.4.1 Protilátky proti GCPII konjugované s radionuklidy

Nádory prostaty jsou vhodným cílem pro radioimunoterapii (RIT), neboť jsou poměrně dosti citlivé na záření radionuklidů. Metastázy prostatických nádorů jsou malé, což umožňuje jednodušší přístup protilátek, navíc se často jedná o metastázy kostní dřeně a mízních uzlin, tedy tkáň, jež přijímají velká množství cirkulujících protilátek [92].

Protilátka J591 rozpoznávající extracelulární část GCPII je ideálním prostředkem pro dopravu radionuklidů. Pro radioimunoterapii byly připraveny dva imunokonjugáty: ^{90}Y -J591 a ^{177}Lu -J591. ^{90}Y je čistý β -zářič, zatímco ^{177}Lu emituje jak β , tak i γ záření. Díky

tomu může být ^{177}Lu zobrazeno přímo vnějšími gama-kamerami, v případě ^{90}Y se musí navíc použít ^{111}In -J591 [92]. V klinických testech vykazoval ^{177}Lu -J591 lepší a přesnější odpovědi, na druhou stranu má ^{90}Y kratší poločas rozpadu (2,7 dne, vs. 6,7 dne). Oba imunokonjugáty vykazaly anti-nádorovou aktivitu, popř. alespoň zastavily další růst nádoru. Limitující toxicitou byla myelotoxicita, dávky však nedosáhly takových hodnot, aby ohrozily jiné orgány (např. játra). Větší toxicitu vykazoval konjugát značený ^{90}Y [93, 94].

2.7.2.4.2 Protilátky proti GCPII konjugované s toxiny

Imunoterapie pomocí protilátky J591 s připojeným A-řetězcem ricinu prokázala cytotoxický účinek na buněčných liniích LNCaP. Buněčné linie neexprimující GCPII byly 62-277krát méně citlivé k cytotoxinům než linie exprimující GCPII [95]. Dalším příkladem je konjugát J591-maytansinoid-1. Po navázání protilátky je celý komplex internalizován do nádorové buňky, kde antimikrotubulární antibiotikum maytansinoid-1 (DM-1) brání polymerizaci tubulinu, což vede k poruše buněčného dělení a následné smrti buňky [96]. Na podobném principu funguje konjugát protilátky s auristatinem, jenž je účinným mitotickým jedem. Ke zvýšení stability v séru je toxin připojen k protilátce vazbou, jež je hydrolyzována až intracelulárně katepsinem B [97].

2.6.2.4.3 Jiné typy terapie využívající GCPII

(1) Alternativou k protilátkám mohou být aptamery, syntetické oligonukleotidy vázající GCPII na nádorových buňkách [98]. Při konjugaci toxinu geloninu s aptamerem pro GCPII byly pozorovány výborné cytotoxické účinky konjugátu na buňky exprimující GCPII. Studie xenografických nádorů léčených tímto aptamerem však nebyla provedena [99].

(2) Zajímavým přístupem je terapie pomocí T-lymfocytů s arteficiálními T-buněčnými receptory rozeznávajícími GCPII. Tyto receptory obsahují část imunoglobulinu rozpoznávajícího GCPII (ve formě jednořetězcové protilátky), čímž umožňují vazbu T-lymfocytů na GCPII nezávisle na hlavním histokompatibilním komplexu (MHC). Gong *et al.* ukázal, že takto modifikované T-lymfocyty uvolňovaly cytokiny při setkání s GCPII a byly schopné ničit nádorové buňky exprimující GCPII [100].

(3) Jiný přístup využívající buňky spočívá v použití pacientových dendritických buněk jako prostředku pro prezentaci antigenu, tj. peptidů GCPII, autologním T-lymfocytům. To vede k vyvolání buněčné imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám bez vedlejších účinků. U čtvrtiny testovaných pacientů došlo k 50% snížení v hodnotách sérového PSA, prostatického markeru používaného při evaluaci nádorů prostaty [101].

2.7 Orthology lidské GCPII

Orthologie je typem homologie (tj. příbuznosti dvou libovolných znaků), kdy se jedná o příbuznost dvou znaků vzniklou oddělením dvou biologických druhů ze společného prapředka [102]. Je tedy zřejmé, že orthology často plní stejnou funkci u dvou rozdílných organismů, neboť oddělením druhů si každý znak (většinou) ponechává svou původní funkci.

GCPII se zdá být široce rozšířeným enzymem, vyskytujícím se u mnoha organismů. Mezi nejlépe prozkoumané orthology patří GCPII myši (*Mus musculus*), potkana (*Rattus norvegicus*) a prasete (*Sus scrofa*). Stejně tak byly tyto orthology (a organismy) použity k mnoha experimentům zabývajících se fyziologickou funkcí GCPII a možností terapeutického využití GCPII.

U všech tří orthologů lidské GCPII se předpokládá víceméně podobná topologie a struktura jako u lidské GCPII. Myší, potkaní i prasečí GCPII mají vysokou podobnost aminokyselinové sekvence s lidskou GCPII (okolo 90 %; identitu okolo 86 %), zejména pak v případě aminokyselin v oblasti aktivního místa. U všech čtyř homologů je pak konzervováno celkem 7 potenciálních N-glykosylačních míst [103, 104, 105].

Biochemická charakterizace těchto zvířecích orthologů je potřebná pro zvolení správného zvířecího modelu, který je nutný pro vývoj a testování nových látek a obecně všech léčebných a diagnostických metod založených na GCPII. Stejně tak je zvířecí model důležitý i pro pochopení fyziologické funkce GCPII. Je více než jasné, že u daného modelového organismu musí ortholog odpovídat lidské GCPII, zejména v enzymové aktivitě, možnostech její inhibice a distribuci v tkáních. Není-li shoda dostatečná, je pravděpodobné, že výsledky získané na nesprávném modelu nepůjde vztáhnout na člověka.

2.7.1 Myší GCPII

Myší GCPII je 752 aminokyselin dlouhá membránová metalopeptidasa, jež vykazuje 91% podobnost s lidskou GCPII na aminokyselinové úrovni (obr. 5, str. 30). Ve své sekvenci obsahuje 10 potenciálních N-glykosylačních míst a zdánlivá molekulová hmotnost okolo 100 kDa naznačuje, že přinejmenším některá z těchto míst jsou skutečně glykosylována [104]. I když cytoplazmatická část GCPII nese mezi již zmíněnými orthology jen velmi malý stupeň konzervovanosti, zachovává si myší GCPII internalizační motiv MXXXL [104]. Myší GCPII taktéž vykazuje jak NAALADAsovou, tak i foláthydrolasovou aktivitu, které lze inhibovat specifickými inhibitory lidské GCPII [104].

Bacich *et al.* zjistil, že distribuce exprese mRNA myší GCPII je poněkud odlišná od lidské GCPII. Nejvyšší exprese byla pozorována v ledvinách a mozku, méně pak ve varlatech, vaječnicích a slinné žláze. Velmi překvapivě však nebyla mRNA GCPII pozorována v myší prostatě, což je u člověka tkáň s nejvyšší expresí GCPII [104]. Navíc, Shafizadeh *et al.* ukázal, že foláty jsou u potkanů štěpeny γ -glutamylhydrolasou, nikoliv GCPII. Je možné, že podobná situace existuje i u myši, které si jsou s potkany velmi příbuzné [106]. Určitou představu o expresi mRNA GCPII můžeme získat porovnáním známých informací o expresi získaných sekvenováním knihoven cDNA obou genů („expressed sequence tags“, EST) (tab. 1, str. 29).

Tab. 1: Přehled EST (expressed sequence tag) v myších a lidských tkáních.

Název tkáně	<i>Mus musculus</i>			<i>Homo sapiens</i>		
	TPM	GCPII EST	celkově EST	TPM	GCPII EST	celkově EST
brzlík	0	0	121688	0	0	81182
děloha	0	0	6937	21	5	233964
embryonální tkáň	0	0	678081	0	0	215834
hypofýza	0	0	17552	0	0	16729
játra	18	2	110518	14	3	208419
kost	0	0	33649	13	1	71799
kostní dřevina	0	0	139703	0	0	49119
krev	58	1	17231	0	0	124115
kůže	0	0	118733	0	0	211658
ledviny	153	19	124083	42	9	212558
mízní uzlina	0	0	15221	0	0	91914
mléčná žláza	0	0	306396	6	1	154501
močový měchýř	0	0	15163	0	0	30128
mozek	18	9	474385	66	73	1104749
nadledviny	0	0	2364	0	0	33344
oko	15	3	187911	0	0	211506
plíce	0	0	99660	0	0	338185
pojivová tkáň	0	0	19947	13	2	149585
prostata	0	0	30011	188	36	190663
slezina	21	2	95036	129	7	54049
slinivka břišní	0	0	106615	0	0	215277
slinná žláza	0	0	19481	49	1	20271
srdce	0	0	53771	0	0	90302
střevo	0	0	85878	4	1	235719
sval	0	0	27501	18	2	108172
štítná žláza	0	0	8890	0	0	47953
tuková tkáň	0	0	1575	0	0	13157
ucho	0	0	38355	0	0	16341
vaječník	0	0	54868	9	1	102639
varle	8	1	118217	0	0	331401
žaludek	0	0	30565	0	0	97179

EST (expressed sequence tag) – tedy části exprimovaných mRNA – v jednotlivých tkáních u myši a člověka. „Celkově EST“ určuje celkový počet EST nalezený v dané tkáni, „GCPII EST“ pak počet EST pocházejících z genu GCPII. „TPM“ označuje počet GCPII EST v miliónu celkových EST (transcripts per million).

	(1)	1	10	20	30	40	50	60																																																					
hGCPII	(1)	MWNL	LHET	DSAV	TARR	PRWL	CAGAL	VLVLAG	-GF	FL	L	GFL	FGW	FIK	SS	SNEAT	-NIT	PKHNM																																											
mGCPII	(1)	MWNA	LQDR	DSAE	EVLR	GRQR	WLRV	GT	LVLA	LALT	GT	FL	I	GFL	FGW	FIK	P	SNEAT	GNV	SHSGMK																																									
	(61)	61	70	80	90	100	110	120																																																					
hGCPII	(59)	KAF	LDEL	ELKA	ENIK	KFLY	NFTQ	I	PHLAG	TEQ	NF	QLAK	QI	QS	QWKE	FGLD	S	VELA	HYD	VLLS																																									
mGCPII	(61)	KEFL	H	ELKA	ENIK	KFLY	NFT	RT	PHLAG	TQ	NF	E	LAK	QI	HD	QWKE	FGLD	L	VELS	HYD	VLLS																																								
	(121)	121	130	140	150	160	170	180																																																					
hGCPII	(119)	Y	PNK	T	HPN	Y	I	S	I	I	N	E	D	G	N	E	I	F	N	T	S	L	F	E	P	P	P	P	G	Y	E	N	V	S	D	I	V	P	P	F	S	A	F	S	P	Q	G	M	P	E	G	D	L	V	V	V	N				
mGCPII	(121)	Y	PNK	T	HPN	Y	I	S	I	I	N	E	D	G	N	E	I	F	K	T	S	L	S	E	Q	P	P	P	G	Y	E	N	I	S	D	V	V	P	P	Y	S	A	F	S	P	Q	G	T	P	E	G	D	L	V	V	V	N				
	(181)	181	190	200	210	220	230	240																																																					
hGCPII	(179)	Y	A	R	T	E	D	F	F	K	L	E	R	D	M	K	I	N	C	S	G	K	I	V	I	A	R	Y	G	K	V	F	R	G	N	K	V	K	N	A	Q	L	A	G	A	K	V	I	L	Y	S	D	P	A	D	Y	F	A	B	G	
mGCPII	(181)	Y	A	R	T	E	D	F	F	K	L	E	R	E	M	K	I	S	C	S	G	K	I	V	I	A	R	Y	G	K	V	F	R	G	N	M	V	K	N	A	Q	L	A	G	A	K	M	I	L	Y	S	D	P	A	D	Y	F	V	P	A	
	(241)	241	250	260	270	280	290	300																																																					
hGCPII	(239)	V	K	S	P	D	G	W	N	L	P	G	G	V	Q	R	G	N	I	L	N	L	N	G	A	G	D	P	L	T	P	G	Y	P	A	N	E	Y	A	Y	R	R	G	I	A	E	A	V	G	L	P	S	I	P	V	H	P	I	G		
mGCPII	(241)	V	K	S	P	D	G	W	N	L	P	G	G	V	Q	R	G	N	V	L	N	L	N	G	A	G	D	P	L	T	P	G	Y	P	A	N	E	H	A	Y	R	H	E	L	T	N	A	V	G	L	P	S	I	P	V	H	P	I	G		
	(301)	301	310	320	330	340	350	360																																																					
hGCPII	(299)	Y	Y	D	A	Q	K	L	L	E	K	M	G	S	A	P	P	D	S	S	W	R	G	S	L	K	V	P	Y	N	V	G	P	G	F	T	G	N	F	S	T	Q	K	V	K	M	H	I	H	S	T	N	E	V	T	R	I	Y	N	V	
mGCPII	(301)	Y	D	D	A	Q	K	L	L	E	H	M	G	S	A	P	P	D	S	S	W	K	G	G	L	K	V	P	Y	N	V	G	P	G	F	A	G	N	F	S	T	Q	K	V	K	M	H	I	H	S	Y	T	K	V	T	R	I	Y	N	V	
	(361)	361	370	380	390	400	410	420																																																					
hGCPII	(359)	I	G	T	L	R	G	A	V	E	P	D	R	Y	V	I	L	G	G	H	R	D	S	W	V	F	G	G	I	D	P	Q	S	G	A	A	V	V	H	E	I	V	R	S	F	G	T	L	K	K	E	G	W	R	P	R	R	T	I	L	F
mGCPII	(361)	I	G	T	L	K	G	A	L	E	P	D	R	Y	V	I	L	G	G	H	R	D	A	W	V	F	G	G	I	D	P	Q	S	G	A	A	V	V	H	E	I	V	R	S	F	G	T	L	K	K	K	G	R	P	R	R	T	I	L	F	
	(421)	421	430	440	450	460	470	480																																																					
hGCPII	(419)	A	S	W	D	A	E	E	F	G	L	L	G	S	T	E	W	A	E	E	N	S	R	L	L	Q	E	R	G	V	A	I	N	A	D	S	S	I	E	G	N	Y	T	L	R	V	D	C	T	P	L	M	Y	S	L	V	I	N	L	T	
mGCPII	(421)	A	S	W	D	A	E	E	F	G	L	L	G	S	T	E	W	A	E	E	H	S	R	L	L	Q	E	R	G	V	A	I	N	A	D	S	S	I	E	G	N	Y	T	L	R	V	D	C	T	P	L	M	Y	S	L	V	Y	N	L	T	
	(481)	481	490	500	510	520	530	540																																																					
hGCPII	(479)	K	E	L	K	S	P	D	E	G	F	E	C	K	S	L	Y	E	S	W	T	K	S	P	S	P	E	F	S	G	M	P	R	I	S	K	L	G	S	C	N	D	F	E	V	F	F	Q	R	L	G	I	A	S	G	R	A	R	Y	T	
mGCPII	(481)	K	E	L	Q	S	P	D	E	G	F	E	C	K	S	L	Y	D	S	W	K	E	K	S	P	S	P	E	F	I	C	M	P	R	I	S	K	L	G	S	C	N	D	F	E	V	F	F	Q	R	L	C	I	A	S	G	R	A	R	Y	T
	(541)	541	550	560	570	580	590	600																																																					
hGCPII	(539)	K	N	W	E	T	N	K	F	S	G	Y	P	L	H	S	V	Y	E	T	Y	E	L	V	E	K	F	Y	D	P	M	F	K	Y	H	L	T	V	A	Q	V	R	G	G	M	V	F	E	L	A	N	S	I	V	L	P	F	D	C	R	
mGCPII	(541)	K	N	W	K	T	N	K	V	S	S	Y	P	L	H	S	V	Y	E	T	Y	E	L	V	V	K	F	Y	D	P	T	F	K	Y	H	L	T	V	A	Q	V	R	G	A	M	V	F	E	L	A	N	S	I	V	L	P	F	D	C	Q	
	(601)	601	610	620	630	640	650	660																																																					
hGCPII	(599)	D	Y	A	V	V	L	R	K	Y	A	D	K	I	Y	S	I	S	M	K	H	P	Q	E	M	K	T	Y	S	V	S	F	D	S	L	F	S	A	V	K	N	F	T	E	I	A	S	K	F	S	E	R	L	Q	D	F	D	K	S	N	P
mGCPII	(601)	S	Y	A	V	A	L	K	K	Y	A	D	T	I	Y	N	I	S	M	K	H	P	Q	E	M	K	A	Y	M	I	S	F	D	S	L	F	S	A	V	N	N	F	T	D	V	A	S	K	F	N	Q	R	L	Q	E	L	D	K	S	N	P
	(661)	661	670	680	690	700	710	720																																																					
hGCPII	(659)	I	V	L	R	M	M	N	D	Q	L	M	F	L	E	R	A	F	I	D	P	L	G	L	P	D	R	P	F	Y	R	H	V	I	Y	A	P	S	S	H	N	K	Y	A	G	E	S	F	P	G	I	Y	D	A	L	F	D	I	E	S	K
mGCPII	(661)	I	L	L	R	I	M	N	D	Q	L	M	Y	L	E	R	A	F	I	D	P	L	G	L	P	G	R	P	F	Y	R	H	I	I	Y	A	P	S	S	H	N	K	Y	A	G	E	S	F	P	G	I	Y	D	A	L	F	D	I	S	S	K
	(721)	721	730	740	752																																																								
hGCPII	(719)	V	D	P	S	K	A	W	G	E	V	K	R	Q	I	Y	V	A	A	F	T	V	Q	A	A	A	E	T	L	S	E	V	A																												
mGCPII	(721)	V	N	A	S	K	A	W	N	E	V	K	R	Q	I	S	I	A	T	F	T	V	Q	A	A	A	E	T	L	R	E	V	A																												

Obr. 5: Srovnání aminokyselinové sekvence lidské (hGCPII) a myši GCPII (mGCPII).

Porovnání primární sekvence lidské a myši GCPII. Identické aminokyseliny jsou podbarveny žlutě, podobné zeleně a rozdílné bíle. Nejmenší podobnost obou proteinů je v cytoplazmatické části (aminokyseliny 1-19) a transmembránové (20-43).

3. Cíle práce

Tato práce si vytyčila následující cíle:

1. připravit vektor vhodný pro heterologní expresi myší GCPII v hmyzích buňkách
2. exprimovat a následně purifikovat rekombinantní extracelulární myší GCPII
3. srovnat enzymovou aktivitu, substrátovou specifitu a inhibiční profil myší a lidské GCPII
4. porovnat tkáňovou distribuci myší a lidské GCPII na proteinové úrovni
5. testovat citlivost protilátek (vytvořených proti lidské GCPII) vůči myší GCPII
6. vytvořit stabilní savčí buněčnou linii inducibilně exprimující myší GCPII
7. krystalovat myší GCPII a vytvořit její trojrozměrnou strukturu pomocí rentgenové krystalografie

4. Materiál a metody

4.1 Chemikálie, média, enzymy a další materiál

Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA)

krystalizační destička Intelli Plate 96-Flat

Bio-Rad (Hercules, USA)

5×Bio-Rad Protein Assay Kit; nosič AG 1-X8

Biotium (Hayward, USA)

GelRed

Biotika (Praha, ČR)

ampicilin

Clontech (Mountain View, USA)

plasmid pTRE-Tight; puromycin; vektor pPur

Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)

kyselina 3-(N-morfolino)propansulfonová (MOPS)

Finnzymes (Espoo, Finsko)

Phusion DNA Polymerasa

Fluka (Buchs, Švýcarsko)

tetramethylethyldiamin; N,N'-methylenbisakrylamid

GE Healthcare (Little Chalfont, UK)

Protein G Sepharosa 4 Fast Flow

Gibco (Carlsbad, USA)

SF900II médium; 10% fetální hovězí sérum (FBS); 100× definovaný lipidový koncentrát;

50× kvasničný autolyzát; opti-MEM médium; L-glutamin; IMDM médium

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

pentaerythritolpropoxylát PO/OH 5/4

Hirschmann Geräte (Eberstadt, SRN)

Pasteurovy pipety

Invitrogen (Carlsbad, USA)

TOPO-TA Cloning Kit; TOP10 kompetentní buňky; *Drosophila* S2 Schneiderovy buňky;

plasmidy pMT/BiP/V5-HisA a pcDNA4/V5-HisA; vektor pCoBlast; blasticidin-S;

hygromycin-B; agarosa; Calcium Phosphate Transfection Kit

Koh-i-noor Hardtmuth (České Budějovice, ČR)

96-jamková průhledná mikrodestička s plochým dnem

Lach-Ner (Neratovice, ČR)

kyselina chlorovodíková; octan sodný; uhličitan sodný; hydroxid sodný; thiosíran sodný; chlorid sodný; dusičnan stříbrný; chlorid vápenatý

Millipore (Billerica, USA)

0,22 µm filtrační nitrocelulosová membrána

New England BioLabs (Ipswich, USA)

restrikční endonukleasy; T4 DNA-ligasa

Nextal Biotechnologies (Montreal, Canada)

krystalizační destička

Nunc (New York, USA)

96-jamková bílá mikrodestička se špičatým dnem

Penta (Praha, ČR)

methanol; kyselina octová; aceton; formaldehyd; isopropanol; ethylenglykol; ethanol; kyselina mravenčí; glycerol

Perkin-Elmer (Wellesley, USA)

³H-NAAG (50 Ci/mmol)

Pierce (Rockford, USA)

D-biotin; NeutrAvidin konjugovaný křenovou peroxidasou (1 mg/ml); SuperSignal West Dura Chemoluminescence substrate; kozí anti-myší-IgG protilátka konjugovaná křenovou peroxidasou (0,8 mg/ml); plastové kolonky pro afinitní purifikaci

Promega (Madison, USA)

Pfu DNA Polymerasa

Qiagen (Valencia, USA)

QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAquick Gel Extraction Kit; 50 bp DNA marker; 500 bp DNA marker X-Gal; JCSG+ Suite

ROCHE s.r.o. (Praha, ČR)

Streptavidin Mutein Matrix

ROTH (Karlshure, SRN)

Rotiszint Eco Coctail

Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne, Francie)

Vivaspin 6 centricon

Serva (Heidelberg, SRN)

Coomassie Brilliant Blue G-250; bromfenolová modř; Triton X100; hovězí sérový albumin

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

PEG 3350; LB Broth; LB Agar; 2-merkaptoethanol; glycerol; EDTA; glycin; Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan); akrylamid; dodecylsulfát sodný; RNAsa A; kyselina boritá; sacharosa; trypanová modř; Tween-20

Top-Bio (Praha, ČR)

PPP Master Mix; deoxyribonukleotidy

4.2 Přístroje

- pH-metr: 9450 pH meter, Unicam (USA)
- přístroj pro PCR: T-Gradient Thermocycler, Biometra (SRN)
- spektrofotometr: NanoDrop 1000, Thermo Scientific (USA)
- spektrofotometrické čtečky: GENios, Tecan (Švýcarsko)
Infinite M200, 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 BUB.Braun (SRN)
- rotační inkubátor: Sanyo-Gallenkamp Orbital Incubator (UK)
- agarosová elektroforéza: zdroj: MP-500P, Major Science (Taiwan)
aparatura: B1A Owl Separation Systems, Inc. (USA)
- vertikální polyakrylamidová elektroforéza: Sigma (USA)
- blotovací přístroj: zdroj: PowerPac HC, Bio-Rad (USA)
aparatura: Trans-Blot SD, 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)
světelný mikroskop Nikon SMZ-660 (Japonsko)
CrysCam Digital Microscope, Art Robbins Instruments (USA)
- fotoaparát: SP-5000UZ, Olympus (Japonsko)
- CCD kamera: LAS-3000 CCD Camera, Fujifilm (Japonsko)
- laminární box: BSB4A Laminar Flow Box, Gelaire (Austrálie)
- scintilační kapalinový počítač: Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Waltham (USA)
- sonikátor: Soniprep 150, Sanyo (Japonsko)
- krystalizační robot: Gryphon, Art Robbins Instruments (USA)

4.3 Metody

4.3.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Podmínky pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR) byly voleny podle pokynů výrobce DNA polymerasy (Finnzymes) a jsou uvedeny v tab. 2 a 3, sekvence použitých primerů poté v tab. 5 (str. 74).

Tab. 2: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci extracelulární části myši GCPII

Komponenta PCR	Množství
templátová DNA (pcDNA4_mGCPII)	10 ng
primer Fmus44OK (20 μ M)	1 μ l
primer Rmus752OK2 (20 μ M)	1 μ l
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	1 μ l
Phusion™ HF pufr (5 \times)	10 μ l
Phusion® HF DNA Polymerasa (2 U/ μ l)	0,5 μ l
HPLC-H ₂ O	do 50 μ l

Tab. 3: Podmínky průběhu PCR

Počet cyklů	Teplota [°C]	Délka trvání cyklu
1	98	30 s
30	98	10 s
	62	45 s
	72	50 s
1	72	8 min

Produkty PCR byly následně elektroforeticky rozděleny na horizontální agarosové elektroforéze (viz 4.3.2).

4.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza

Roztoky:

Tris-acetátový pufr: 40 mM Tris-HCl; 20 mM CH₃COOH; 1 mM EDTA; pH 8,0

Vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa; 0,1% (w/v) bromfenolová modř;
0,02% NaN₃

DNA byla analyzována pomocí horizontální gelové elektroforézy s použitím 1% (w/v) agarosy rozpuštěné v Tris-acetátovém pufru a obsahující fluorescenční barvivo GelRed (v ředění 1:100 000)

Pro odhad délky fragmentů DNA byl použit jako standard 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 s filtrem pro ethidium bromid (Olympus).

Pro další použití DNA, která byla rozdělena pomocí agarosové elektroforézy, byl vzorek DNA vyříznut z agarosového gelu a DNA byla extrahována z gelu pomocí „QIAquick Gel Extraction Kit“ dle pokynů výrobce (Qiagen).

4.3.3 Restriční štěpení, defosforylace a ligace DNA

Restriční štěpení DNA odpovídajícími restričními endonukleasami bylo provedeno v reakčním objemu 50 μ l podle návodu výrobce restričních enzymů (New England BioLabs). Množství DNA, doba štěpení a reakční teplota byly závislé na účelu štěpení (obvykle 100 ng - 4 μ g DNA; 1 - 8 hod).

Defosforylace DNA byla provedena v celkovém objemu 20 μ l užitím 2 μ l (= 10 U) „antarctic phosphatase“ (New England BioLabs). Reakce byla inkubována 20 min při 37 °C a následně zastavena zahřátím na 65 °C po dobu 5 min.

Fragmenty DNA štěpené týmiž restričními endonukleasami byly spolu ligovány v objemu 10 μ l, při 16 °C, po dobu 10 hod. Množství T4 DNA-ligasy (New England BioLabs) v reakci bylo 1 μ l (= 400 U). Poměr množství vektor:fragment byl asi 1:3.

4.3.4 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* DH5 α

10 μ l ligační reakce (či 1 μ l plasmidové DNA) bylo smícháno s 50 μ l kompetentních buněk *E. coli* DH5 α a inkubováno na ledu 30 minut. Poté byl proveden tepelný šok: 90 s při 42 °C a následně 60 s na ledu. Ke vzorkům bylo přidáno 500 μ l studeného LB média (Sigma) a poté byly inkubovány 1 hod při 37 °C.

Po inkubaci bylo 200 μ l buněk natřeno na Petriho misku s LB agarem (Sigma) s ampicilinem (o koncentraci 100 μ g/ml, Biotika). Misky byly poté inkubovány v termostatu při 37 °C přes noc.

4.3.5 Midipreparace plasmidové DNA

12 ml LB-média (Sigma) s ampicilinem (o koncentraci 100 μ g/ml, Biotika) bylo inokulováno 1 kolonií transformovaných buněk *E. coli* a inkubováno při 37 °C a 220 ot./min po dobu 15 hod. Bakteriální kultura byla poté centrifugována (3362 \times g, 10 min, 4 °C) a supernatant odstraněn. Izolace plasmidové DNA z pelety obsahující bakteriální buňky byla provedena pomocí kitu „QIAprep Spin Miniprep Kit“ dle pokynů výrobce (Qiagen).

4.3.6 Sekvenování plasmidové DNA

Koncentrace a čistota DNA byla určena měřením absorpance při 230, 260 a 280 nm na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Pro sekvenování plasmidové DNA bylo do 200 μ l mikrozkušavky napipetováno požadované množství DNA (100 ng DNA/1000 bp plasmidu), přidáno 3,2 pmol daného primeru a doplněno destilovanou vodou do celkového objemu 14 μ l. Sekvence použitých primerů (primery MT, BGH, Rmin3 a Zoo2) je uvedena v tab. 5 (str. 74).

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).

4.3.7 Transfekce hmyzích buněk a selekce stabilní buněčné linie

Pro transfekci byly použity Schneiderovy S2 hmyzí buňky (Invitrogen) stabilně transfekované plasmidem pMT/BiP/BirAKDEL (zajišťujícím biotinylací proteinů v endoplasmatickém retikulu) a plasmidem pCoHygro (pro rezistenci na hygromycin-B) [107]. Buňky byly kultivovány na 35mm misce v bezsérovém médiu SF900II (Gibco) obohaceném o 10% fetální hovězí sérum (Gibco) při teplotě 25 °C dokud nedosáhly koncentrace 2 – 4×10⁶ buněk/ml. Transfekce buněk byla provedena pomocí kitu „Calcium Phosphate Transfection Kit“ dle pokynů výrobce (Invitrogen).

<u>Roztok A:</u> 2 M CaCl ₂	36 μl
DNA (pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752))	9 μg
pCoBlast	0,5 μg
sterilní voda pro tkáňové kultury	do finálního objemu 300 μl

Roztok B: 300 μl 2× „HEPES-buffered Saline“ (HBS)

2× HBS: 50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HPO₄; 280 mM NaCl; pH 7,14

Selekční vektor pCoBlast, kotransfekovaný s cílovým vektorem, zajišťuje rezistenci buněk na blasticidin-S a umožňuje selekci stabilní linie exprimující myší GCPII.

Roztok A byl po kapkách přidáván k roztoku B za jeho současného míchání na vortexu a výsledný roztok byl inkubován 40 min při 25 °C. Roztok byl promíchán a po kapkách přidán k buňkám, které byly poté inkubovány 16 – 24 hod při 25 °C. Následně byla buněčná suspenze centrifugována (500×g, 3 min, 20 °C) a médium odebráno. Buňky byly resuspendovány ve 3 ml čerstvého kompletního média (SF900II, 10% FBS) a inkubovány dalších 24 hod při 25 °C. Poté bylo médium odebráno a přidáno čerstvé kompletní médium obsahující selekční antibiotika hygromycin-B a blasticidin-S (o koncentraci 300 μg/ml, resp. 5 μg/ml). Toto selekční médium bylo měněno po 4 – 5 dnech, dokud nezačaly růst buňky rezistentní na hygromycin-B i blasticidin-S (asi po 3 týdnech, kdy došlo k selekci klonů obsahujících zároveň vektor pCoBlast i pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752)).

4.3.8 Stanovení počtu živých buněk užitím trypanové modři

Roztoky:

Trypanová modř: 0,4% trypanová modř (Sigma) v PBS; pH 7,4

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4

Stanovení je založeno na faktu, že mrtvé buňky se barví trypanovou modří, zatímco živé buňky zůstávají neobarveny, neboť dokáží transportovat barvivo ven z buňky. 20 μ l buněčné suspenze bylo smícháno s 880 μ l PBS. Po přidavku 100 μ l trypanové modři byl roztok promíchán a ponechán stát 5 – 10 min při pokojové teplotě. Po promíchání bylo 11 μ l roztoku napipetováno pod sklíčko hemacytometru (Sigma). Za použití mikroskopu se 100 \times zvětšením (Nikon) byly sečteny živé buňky v 1mm čtverci v hemacytometru a poté byla spočtena koncentrace buněk v původní buněčné kultuře (provedeno v pentaplikátech):

$$\text{Počet buněk (v 1 ml)} = \text{počet buněk ve čtverci} \times \text{zředovací faktor (tj. 50)} \times 10^4$$

4.3.9 Expres rekombinantní myši GCPII

Stabilně transfekované Schneiderovy S2 buňky rezistentní na hygromycin-B a blasticidin-S (o koncentraci minimálně 1×10^7 buněk/ml) byly převedeny do média SF900II a pak přemístěny do sterilní skleněné 250ml nádoby pro expresi (Bellco) a naředěny 100 ml média SF900II (bez antibiotik) na koncentraci přibližně 1×10^6 buněk/ml. Do média byl přidán 1 ml 100 \times koncentrovaného chemicky definovaného lipidového koncentrátu (Gibco) a 2 ml 50 \times koncentrovaného kvasničného autolyzátu (Gibco). Buněčná kultura byla inkubována při 25 °C a míchání 100 ot./min. Při dosažení koncentrace 1×10^7 buněk/ml (po 2 – 4 dnech) byla buněčná suspenze přemístěna do větší (3000ml) nádoby, do které bylo přidáno dalších 400 ml média SF900II spolu se 4 ml 100 \times koncentrovaného chemicky definovaného lipidového koncentrátu (Gibco) a 8 ml 50 \times koncentrovaného kvasničného autolyzátu (Gibco).

Po dosažení koncentrace 8×10^6 buněk/ml byla produkce rekombinantního proteinu indukována přidavkem 100 mM CuSO₄ (do výsledné koncentrace 1 mM). První a třetí den po indukci bylo přidáno 5 ml 20% D(+)-glukosy a 2,5 ml 200 mM L-glutaminu. Po indukci byla kontrolována koncentrace buněk, poměr počtu živých/mrtvých buněk a produkce rekombinantního proteinu. Buňky byly sklizeny v době, kdy se produkce proteinu již dále nezvyšovala. Buněčná kultura byla poté centrifugována (500 \times g, 30 min,

25 °C); dekantované médium obsahující rekombinantní protein bylo dále centrifugováno (3360×g, 30 min, 4 °C) a následně uskladněno v -80 °C do dalšího použití.

4.3.10 Purifikace rekombinantní myší GCPII afinitní chromatografií

Purifikace rekombinantní GCPII a jejího homologu pomocí afinitní chromatografie využívající interakce biotin-streptavidin byla podrobně popsána Janem Tykvartem [107]. Ve stručnosti, rekombinantní myší GCPII byla hmyzími buňkami produkována s N-koncově umístěnou purifikační značkou (tzv. avi-tagem), která je uvnitř buněk biotinylována prostřednictvím biotin:protein-ligasy (BirA-ligasa). Pomocí afinitní chromatografie za užití streptavidinové matrice (Streptavidin Mutein Matrix; Roche) lze specificky purifikovat biotinylované proteiny; proteiny jsou poté z matrice eluovány 2 mM biotinem. Nespornou výhodou této afinitní purifikace je kromě rychlosti a jednoduchosti také fakt, že všechny její kroky lze provádět bez komplikovaného vybavení při 4 °C.

Roztoky:

Ekvilibrační pufr: 300 mM Tris-HCl, 450 mM NaCl; pH 7,2

Promývací pufr: 100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,2

Eluční pufr: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; 2 mM D-biotin; pH 7,2

Regenerační pufr: 100 mM glycin-HCl; pH 2,8

Uchovávací pufr: 20 mM MOPS; pH 7,0; 0,2% (w/v) NaN₃

Nosič: Streptavidin Mutein Matrix (Roche)

Zmražené médium z kultury S2 buněk produkujících myší GCPII (viz 4.3.9) obsahující rekombinantní myší GCPII bylo rozmrazeno ve 4 °C. Poté bylo médium centrifugováno (3360×g, 60 min, 4 °C) a získaný supernatant byl filtrován přes 0,22µm nitrocelulosový filtr (Millipore). Nosič byl mezitím ekvilibrován promytím 10násobkem objemu nosiče (CV) promývacího roztoku. Filtrované médium bylo poté smícháno s ekvilibračním pufrem a k roztoku byl přidán ekvilibrovaný nosič (1/500 objemu média). Roztok byl s nosičem inkubován při 4 °C po dobu min. 12 hod (za míchání). Kolonka pro afinitní chromatografii (Pierce) byla ekvilibrována promytím 10 ml promývacího roztoku a poté byl na ni aplikován inkubovaný roztok. Nosič byl separován filtrací na fritě kolonky

(filtrát z první části purifikace označen FT¹, z druhé části pak FT²) a poté byl promyt celkem 12 CV promývacího roztoku, v krocích po 2 CV (W1), 5 CV (W2) a 5 CV (W3). Biotinylované proteiny byly z nosiče eluovány elučním pufrem v krocích po 1 CV (E1), 2 CV (E2), 2 CV (E3) a 5 CV (E4), přičemž během prvního kroku byl nosič inkubován s elučním pufrem po dobu 1 hod. Před regenerací bylo odebráno 10 µl nosiče pro analýzu případných zachycených proteinů (R). Frakce proteklá při filtraci (FT¹) byla znovu nanášena na kolonku při druhém kole purifikace.

Nosič byl nakonec regenerován: promyt 5 CV promývacího pufru, 6 CV elučního pufru a 5 CV regeneračního pufru. Následně byl opětovně ekvilibrován a použit pro druhé kolo purifikace s frakcí proteklou kolonkou. Po ukončení purifikace byl nosič po své regeneraci převeden do uchovávacího roztoku a uskladněn ve 4 °C pro další použití.

Jednotlivé frakce byly poté analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) a následným obarvením gelu, resp. detekcí myší GCPII specifickými protilátkami či proteiny po přenesení proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western blot či Far-Western blot, viz 4.3.13).

4.3.11 Dialýza

Eluční frakce obsahující myší GCPII byly dialyzovány 3×12 hod proti tisícínásobnému objemovému přebytku pufru 20 mM MOPS, 20 mM NaCl, pH 7,4. Dialýza probíhala za míchání při 4 °C.

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

Roztoky:

Zaostřovací gel (6%): 250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 5,5% (w/w) akrylamid, 0,15% (w/w) N,N'-methylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,005% (v/v) tetramethylethylendiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný

Separční gel (10%): 313 mM Tris-HCl (pH 8,8); 9,25% (w/w) akrylamid, 0,25% (w/w) N,N'-methylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,001% (v/v) tetramethylethylendiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný

Vzorkový pufr (6×): 350 mM Tris-HCl (pH 6,8); 30% (v/v) glycerol; 10% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 6% (v/v) 2-merkaptoethanol; 0,012% (w/v) bromfenolová modř

Elektrodový pufr (5×): 125 mM Tris-HCl; 1,25 M glycin; 0,5% (w/w) dodecylsulfát sodný (SDS); pH 8,8

Proteiny byly rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí pomocí diskontinuální elektroforézy v redukujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Po přípravě a ztuhnutí byly gely připevněny do přístroje pro vertikální SDS-PAGE (Sigma) a horní i dolní komora byla naplněna elektrodoým pufrem.

Před nanesením do gelu byly vzorky smíchány se vzorkovým pufrem a varem denaturovány (4 min). Separace probíhala při konstantním napětí 150 V po dobu přibližně 1 hod. Proteiny v gelu byly poté detekovány buď pomocí barvení stříbrem či přenosem na nitrocelulosovou membránu a následnou imunodetekcí.

4.3.13 Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western Blot)

Roztoky:

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

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4

Po ukončení elektroforézy byl gel 1 min ekvilibrován spolu s nitrocelulosovou membránou v transferovém pufru. Vlastní přenos proteinů z gelu na membránu byl proveden použitím konstantního napětí 15 V po dobu 15 min.

Membrána byla poté opláchnuta PBS + 0,05% Tween-20 a inkubována v 5 ml Casein Blockeru (Pierce) pro blokování nespecifické vazby protilátky (1 hod, 4 °C). Následně byla membrána inkubována s myší primární protilátkou GCP-04 proti lidské GCPII (200 ng/ml v Casein Blockeru, 16 hod, 4 °C). V případě detekce biotinylovaných proteinů byla membrána 1 hod inkubována s NeutrAvidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou (Pierce; 400 ng/ml v Casein Blockeru, 4 °C).

Membrána byla poté promyta 3×5 min PBS + 0,05% Tween-20 a po jejím přenesení do 5 ml Casein Blockeru byla přidána sekundární kozí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (Pierce; 32 ng/ml v Casein Blockeru, 1 hod, 25 °C). Po inkubaci byla membrána opět promyta 3×5 min 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).

4.3.14 Barvení polyakrylamidového gelu

Pro zviditelnění elektroforeticky rozdělených proteinů bylo použito barvení gelů stříbrem. Intenzita barvení byla přizpůsobena účelu použití.

Roztoky:

1. fixace:	12% (v/v) CH ₃ COOH; 50% (v/v) CH ₃ OH; 0,02% (v/v) HCHO	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	

4.3.15 Koncentrování purifikované rekombinantní myší GCPII

Koncentrace purifikované myší GCPII byla pro další použití zvýšena pomocí 6 ml centrifugačního zařízení (10 kDa MWCO; Vivaspin 6 centricon, Sartorius).

Centrifugací (3360×g, 4 °C) byl objem roztoku snížen na požadovanou hodnotu a koncentrace proteinu byla ověřena stanovením dle Bradfordové (viz 4.3.16).

4.3.16 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Bradfordové [108] pomocí kitu „5×Bio-Rad protein Assay Kit“ (Bio-Rad). Pro kalibraci byla použita buď koncentrační řada standardů BSA nebo rekombinantní extracelulární hGCPII se známou koncentrací (určenou aminokyselinovou analýzou); každý vzorek byl měřen v duplikátech.

Do 96 jamkové průhledné mikrodestičky (Koh-i-noor) bylo napipetováno 200 μ l činidla Bradfordové (Bio-Rad), k němuž bylo přidáno určité množství roztoku proteinu (0,5 - 20 μ l). Poté byl objem doplněn vodou na 220 μ l a změřena absorbance roztoku při 595 nm na spektrofotometrické čtečce GENios (Tecan).

4.3.17 Radiometrické měření peptidasové aktivity s použitím značeného substrátu

Roztoky:

Reakční pufr: 20 mM MOPS; 20 mM NaCl; pH 7,4

Roztok k zastavení reakce: 200 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 2 mM 2-merkptoethanol

Substrát: [^3H]-N-Ac-Asp-Glu (o různých koncentracích)

Nosič: AG 1-X8 Resin (ve formiátovém cyklu, Bio-Rad)

V mikrozkuhavce byl v celkovém objemu 90 μ l smíchán reakční pufr, vzorek enzymu a roztok inhibitoru (jen pro měření inhibovaných reakcí) a vzniklý roztok byl preinkubován 5 min při 37 $^\circ\text{C}$. Reakce byla iniciována přidáním 10 μ l substrátu a ponechána probíhat 20 min při 37 $^\circ\text{C}$. Poté byla reakce zastavena přidáním 100 μ l 200 mM KH_2PO_4 , pH 7,4. Všechny vzorky byly změřeny v duplikátech.

Separace odštěpeného radioaktivního glutamátu byla provedena ionexovou chromatografií na nosiči AG 1-X8 (Bio-Rad). Skleněné Pasteurovy pipety (Hirschmann Laborgeräte) byly naplněny 2 ml nosiče rozsuspendovaného v destilované vodě (1:1). Poté byla kolonka promyta dvakrát destilovanou vodou. Do promyté kolonky bylo nanášeno 195 μ l vzorku a navázaný glutamát byl následně eluován 2 \times 1 ml 1 M HCOOH . Po přidání 6 ml scintilačního roztoku Rotiszint[®]Eco-Plus (Roth) byly vzorky důkladně protřepány s použitím vortexu a scintilace změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer).

4.3.18 Testování substrátové specifity myší GCPII

Roztoky:

Reakční pufr: 20 mM MOPS; 20 mM NaCl; pH 7,4

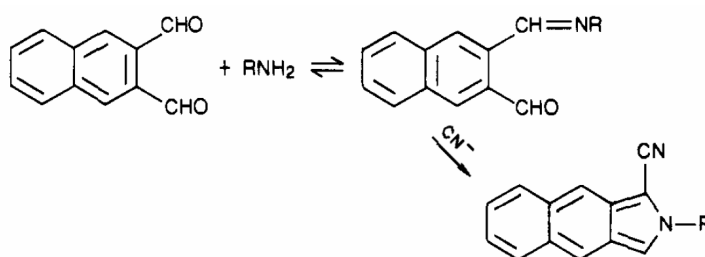
Substrát: 1 mM dipeptidy N-Ac-X-Glu, resp. N-Ac-Asp-X

Roztok KCN: 8 mM KCN; 0,2 M borát sodný; pH 10

Roztok NDA: 0,8 mM naftalen-2,3-dikarbaldehyd (NDA); 0,2 M borát sodný; pH 10

Na 96 jamkové bílé mikroděstičce se špičatým dnem („V-shaped“; Nunc) byl v každé jamce smíchán roztok proteinu (do výsledné koncentrace 8 ng/μl) s reakčním pufrům ve výsledném objemu 90 μl. Reakce byly započaty přidáním 10 μl substrátu (o výsledné koncentraci 100 μM) a inkubovány 1 hod při 37 °C. Každý vzorek byl měřen v triplikátech.

Reakce byly zastaveny přidáním 50 μl roztoku KCN a 50 μl roztoku NDA a poté byly inkubovány 15 min při 25 °C (viz obr. 6). Kvantifikace odštěpených aminokyselin byla provedena změřením fluorescence při $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 420/480$ nm na spektrofotometrické čtečce Infinite M200 (Tecan).



Obr. 6: Derivatizace odštěpených aminokyselin naftalen-2,3-dikarbaldehydem (NDA).

Při hydrolyze dipeptidů N-Ac-X-Y se uvolňuje N-acetylovaná N-koncová aminokyselina a C-koncová aminokyselina s volnou primární aminoskupinou. Ta reaguje v přítomnosti kyanidu s naftalen-2,3-dikarbaldehydem (NDA) za vzniku vysoce fluorescenčního aduktu, který je poté stanoven fluorometricky. Obrázek byl převzat z [109].

4.3.19 Imunoprecipitace myší GCPII protilátkami

Roztoky:

Vzorkový pufr (1×): 90 mM Tris-HCl (pH 6,8); 5% (v/v) glycerol; 1,7% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 6% (v/v) 2-merkaptoethanol; 0,002% (w/v) bromfenolová modř

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4

K 500 µl vzorku obsahující myší GCPII bylo přidáno 25 µl ekvilibrované Protein G Sepharosy 4 Fast Flow (GE Healthcare) a vzorek byl za míchání inkubován 1 hod při 4 °C (tato preinkubace slouží k odstranění proteinů nespecificky vázajících se na Protein G Sepharosu). Suspenze byla centrifugována (3362×g, 15 min, 4 °C) a k supernatantu bylo přidáno 6 µg protilátky (GCP-05, J591, J415). Vzorek byl inkubován za míchání 16 hod při 4 °C; poté bylo přidáno 30 µl čerstvě ekvilibrované Protein G Sepharosy a vzorky byly inkubovány 2 hod při 4 °C. Suspenze byla opětovně centrifugována (2000×g, 5 min, 4 °C), supernatant byl odebrán (frakce FT) a nosič promyt 3×500 µl studeného PBS (frakce W1 – W3). Nakonec byl nosič suspendován ve 100 µl vzorkového pufru a 10 min zahříván k varu (frakce E).

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy (SDS-PAGE), popř. imunochemickou detekcí protilátkami (viz 4.3.13)

4.3.20 Transfekce savčích buněk a tvorba stabilní buněčné linie

Pro transfekci byla použita buněčná linie připravená v naší laboratoři Pavlem Šáchou, Janou Starkovou a Karolínou Šrámkovou (nepublikované výsledky), která je odvozena od U373MG. Buňky byly kultivovány na 35mm misce v IMDM médiu (Gibco); při transfekci dosáhly 60% konfluence. V mikrozkuhavce bylo do bezsérového média Opti-MEM (Gibco) naředěno 2,3 µg DNA do celkového objemu 115 µl (2,19 µg plasmidu pTRE-Tight_mGCPII a 0,12 µg plasmidu pPur zajišťujícího rezistenci vůči puromycinu). K roztoku bylo přidáno 6,9 µl transfekčního činidla FuGENE HD (Roche) a směs byla inkubována 20 min při 20 °C. Následně byl transfekční roztok po kapkách přidán k buňkám, miska byla jemně promíchána a buňky byly inkubovány 24 hod při 37 °C a 5% CO₂. Po 24 hod byly buňky přemístěny na čtyři 100mm misky, aby se dosáhlo optimálního zředění pro růst jednotlivých kolonií. Buňkám bylo přidáno čerstvé IMDM médium

obsahující selekční antibiotikum puromycin o koncentraci 0,5 µg/ml. Selekcce probíhala 10 – 15 dnů, po této době začaly růst kolonie buněk rezistentní na puromycin. Selekční médium bylo měněno každé 4 dny. Jednotlivé kolonie byly izolovány pomocí klonovacích válečků a roztoku Trypsin/EDTA. Kolonie byly poté přemístěny do IMDM média se selekčním antibiotikem a ponechány růst.

4.3.21 Homogenizace savčích buněk (příprava buněčného lyzátu)

Roztoky:

RIPA pufr: 100 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (v/v) NP-40

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4

Buňkám rostoucím na 24-jamkové destičce bylo odebráno médium a poté byly dvakrát promyty PBS. Buňky byly následně rozsuspendovány v 50 µl RIPA pufru a inkubovány 1 hod při 4 °C. Vytvořená buněčná suspenze byla centrifugována (16100×g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odebrán a uskladněn v -20 °C pro další použití.

4.3.22 Homogenizace tkání

Jednotlivé vzorky tkání byly zmrazeny v kapalném dusíku a následně homogenizovány v 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5 s inhibitory proteas (Complete Mini, EDTA-free, Roche). Vzorky byly poté sonikovány na ledu 3×10 s (sonikátor Soniprep 150, Sanyo, při amplitudě 10 µm) a poté byl přidán Triton X-100 do finální koncentrace 1%. Po 30 min inkubace na ledu byly vzorky centrifugovány 16100×g, 10 min, 4 °C a supernatant byl uchován pro další použití v -80 °C.

4.3.23 Krystalizace myší GCPII

Pro krystalizaci myší GCPII byly zvoleny dva přístupy – jeden manuální a druhý využívající pro smíchání kapek krystalizačního robotu:

4.3.23.1 Krystalizace difusí par (visící kapka)

Roztoky:

Precipitační roztok: 33% (v/v) pentaerythritolpropoxylát PO/OH 5/4; 1% (w/v) PEG 3350; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0

Krystalizace myší extracelulární GCPII byla testována v podmínkách, jaké byly použity pro lidskou extracelulární GCPII [21]. Byly zvoleny tři různé uspořádání – krystalizace se substrátem (N-Ac-Asp-Glu), krystalizace se specifickým inhibitorem (2-PMPA) a krystalizace bez dalších sloučenin. Zásobní roztok N-Ac-Asp-Glu (10 mM), resp. 2-PMPA (10 mM) byl smíchán s precipitačním roztokem do výsledné koncentrace 1 mM.

Na víčko krystalizační misky (Nextal Biotechnologies) bylo napipetováno 0,8 µl extracelulární myší GCPII (o koncentraci 10 mg/ml). Kapka byla pak smíchána s 0,8 či 0,4 µl precipitačního roztoku (včetně/bez aditiv). Rezervoár byl naplněn 1 ml precipitačního roztoku (bez aditiv) a víčko bylo zašroubováno do krystalizační misky. Miska byla uložena v 19 °C a kapky byly pravidelně pozorovány použitím mikroskopu SMZ-660 (Nikon).

4.3.23.2 Krystalizace difusí par (sedící kapka) s využitím krystalizačního robotu

Pro otestování většího počtu krystalizačních podmínek a zároveň pro snížení množství spotřebovaného proteinu byla provedena krystalizace pomocí krystalizačního robotu Gryphon (Art Robbins Instruments). Pro krystalizaci byla použita extracelulární myší GCPII (15 mg/ml) a sada 96 precipitačních roztoků JCSG+ Suite (Qiagen). Krystalizace byla provedena bez dalších aditiv, tj. bez substrátu či inhibitoru.

Nejprve byly do rezervoárů na krystalizační destičce „Intelli Plate 96-Flat“ (Art Robbins Instruments) roboticky napipetovány příslušné precipitační roztoky (vždy 50 µl). Poté byl roboticky smíchán roztok proteinu s daným precipitačním roztokem v celkovém objemu 450 nl (vždy dvě kapky v poměru objemů roztoku proteinu a precipitantu 2:1 a 1:2). Destička byla po přelepení průhlednou fólií uložena do 19 °C. Kapky byly pravidelně pozorovány a dokumentovány užitím kamery CrysCam Digital Microscope (Art Robbins Instruments).

Práce s krystalizačním robotem byla provedena pod vedením Petra Pachla.

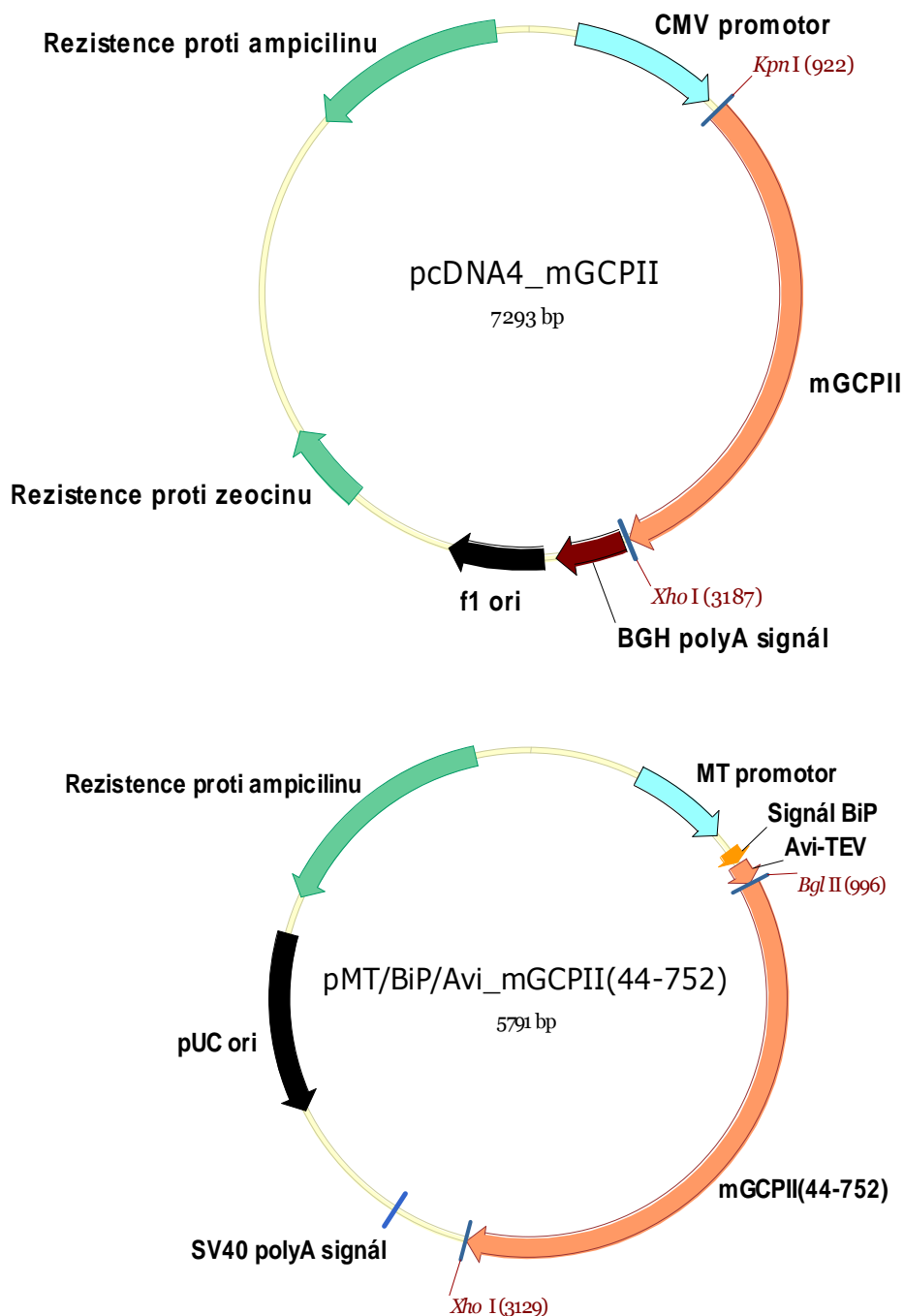
5. Výsledky

5.1 Klonování extracelulární myší GCPII

Cílem bylo připravit expresní vektor pro hmyzí buňky obsahující extracelulární část myší GCPII (aminokyseliny 44 – 752) s N-koncovou purifikační značkou, tzv. Avi-tag, umožňující afinitní chromatografii.

Plasmid pcDNA4_mGCPII (s celou sekvencí myší GCPII, aminokyseliny 1 – 752) byl připraven v naší laboratoři [110]. V krátkosti, DNA mGCPII obdržená od Dr. Warrena Hestona (Cleveland, USA) obsahovala mutace vedoucí ke 2 změnám v aminokyselinové sekvenci proteinu oproti sekvenci mGCPII v databázi proteinů GenPept, NCBI. Tyto mutace byly odstraněny cílenou mutagenezí (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Opravená DNA mGCPII byla následně klonovaná do expresních vektorů pro savčí buňky – pcDNA4/V5-HisA (Invitrogen) a pTRE-Tight (Clontech). Plasmid pcDNA4_mGCPII byl použit pro přípravu DNA kódující extracelulární část mGCPII, která byla následně fúzována s purifikační značkou (viz obr. 7, str. 51).

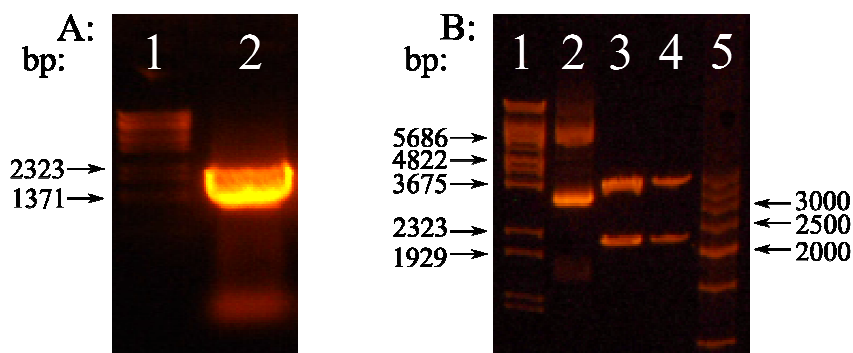
DNA kódující extracelulární část mGCPII byla amplifikována pomocí PCR (viz 4.3.1) s použitím primerů Fmus44OK a Rmus752OK2 a plasmidu pcDNA4_mGCPII jako templátu (obr. 8, str. 52, panel A). Do sekvence byla zároveň primery vnesena restrikční místa *BglII* a *XhoI*. Amplifikovaná DNA byla poté štěpena restrikčními endonukleasami *BglII* a *XhoI* a následně ligována do plasmidu pMT/BiP/Avi_hGCPII(44-750) štěpeného týmiž endonukleasami, jenž byl připraven v naší laboratoři Janem Tykvartem a Pavlem Šáchou (plasmid byl vytvořen modifikací plasmidu pMT/BiP/V5-HisA (Invitrogen)) [107]. Výsledný plasmid pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752) umožňuje inducibilní expresi sekretované extracelulární mGCPII v hmyzích buňkách a její následnou purifikaci afinitní chromatografií (viz obr. 8, str. 52, panel B).



Obr. 7: Expresní plasmidy pcDNA4_mGCPII a pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752).

Plasmid pcDNA4_mGCPII (nahore) byl použit jako výchozí vektor pro amplifikaci extracelulární části mGCPII. Vektor pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752) (dole) sloužící pro heterologní expresi sekretovaných proteinů v hmyzích S2 buňkách obsahuje ve své sekvenci gen pro β -laktamasu zajišťující ampicilinovou rezistenci, počátek replikace v *E. coli* (pUC ori), signál SV40 polyA pro ukončení transkripce a následnou polyadenylaci mRNA, metalothioneinový (MT) promotor pro indukibilní expresi, sekreční signál BiP pro expresi sekretovaných proteinů a sekvenci Avi-TEV s purifikační značkou a štepícím místem pro TEV proteasu. Extracelulární část mGCPII je označena mGCPII(44-752).

Správnost vytvořeného plasmidu byla ověřena restriční analýzou – štěpením enzymy *BglIII* a *XhoI* pro ověření přítomnosti ligované DNA (obr. 8, panel B), *MscI* a *BglIII* pro kontrolu přítomnosti Avi-tagu a *NheI* pro odlišení myší a lidské GCPII (data neuvedena). Definitivní správnost sekvence byla ověřena sekvenováním (viz 4.3.6).



Obr. 8: Klonování extracelulární části DNA myší GCPII.

Jednotlivé fragmenty DNA byly rozděleny agarosovou elektroforézou a následně vizualizovány fluorescenčním barvivem GelRed (viz 4.3.2).

Panel A: Amplifikace extracelulární části DNA myší GCPII. Dráha 1: λ -DNA marker; dráha 2: PCR reakce (očekávaná velikost 2145 bp).

Panel B: Restriční analýza připraveného plasmidu pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752). Dráha 1: λ -DNA marker; dráha 2: pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752) (očekáváno 5791 bp); dráha 3: pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752) / *BglIII*, *XhoI* (očekáváno 2133 bp a 3658 bp); dráha 4: pMT/BiP/Avi_hGCPII(44-750) / *BglIII*, *XhoI* (očekáváno 2133 bp a 3658 bp); dráha 5: 500 bp DNA marker (Qiagen).

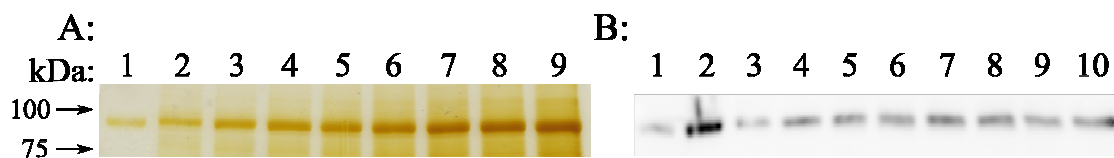
5.2 Heterologní exprese rekombinantní extracelulární myší GCPII v hmyzích S2 buňkách

Schneiderovy S2 hmyzí buňky byly transfekovány plasmidem pMT/BiP/BirAKDEL kódující biotin:protein-ligasu *BirA* (plasmid byl vytvořen v naší laboratoři) [107]. Sekvence proteinu *BirA* je ve fúzi se signálním peptidem BiP na svém N-konci (směřující protein do endoplasmatického retikula (ER)) a tetraaminokyselinovou sekvencí KDEL na svém C-konci (sekvence vedoucí k zadržení proteinů v ER). Protein *BirA* katalyzuje následnou biotinylation exprimovaných proteinů procházejících ER.

Stabilní transfektanty (resistentní na hygromycin-B) exprimující *BirA* byly poté transfekovány plasmidem pMT/BiP/Avi_mGCPII(44-752) kódujícím extracelulární myší

GCPII (viz 4.3.7). Po selekci stabilních transfektantů (resistentních na hygromycin-B i blasticidin-S) byly buňky přeneseny do nádoby pro expresi a kultivovány v bezsérovém médiu SF900II bez antibiotik (viz 4.3.9).

Produkce rekombinantní myší GCPII byla analyzována pomocí SDS-PAGE (obr. 9).



Obr. 9: Expese rekombinantní myší GCPII hmyzími buňkami.

Po indukci exprese byly odebrány vzorky média obsahující sekretovanou rekombinantní myší GCPII. Produkce byla analyzována jednak na stříbrem barveném polyakrylamidovém gelu (panel A), jednak imunodetekcí biotinylovaných proteinů NeutrAvidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou (panel B).

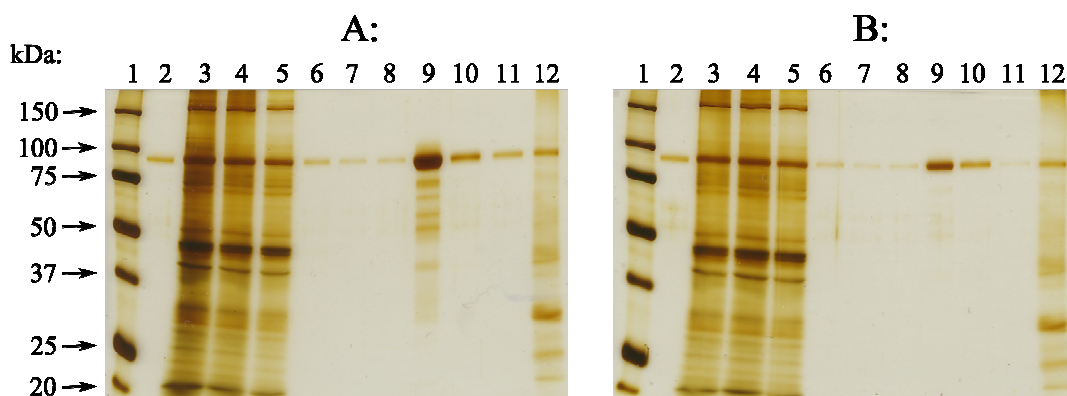
Panel A: Jednotlivé vzorky odpovídají dnům po indukci exprese mGCPII. Dráha 1: standard extracelulární hGCPII (50 ng); dráha 2: 2 dny po indukci (I+2); dráha 3: I+3; dráha 4: I+5; dráha 5: I+6; dráha 6: I+7; dráha 7: I+8; dráha 8: I+9; dráha 9: I+12. Objem nanesených vzorků byl 10 μ l.

Panel B: Dráha 1: standard extracelulární hGCPII (0,5 ng); dráha 2: standard extracelulární hGCPII (2,5 ng); dráha 3: 2 dny po indukci (I+2); dráha 4: I+3; dráha 5: I+5; dráha 6: I+6; dráha 7: I+7; dráha 8: I+8; dráha 9: I+9; dráha 10: I+12. Objem vzorků odpovídá 0,1 μ l média.

5.3 Purifikace rekombinantní myší GCPII afinitní chromatografií

Rekombinantní extracelulární myší GCPII byla purifikována afinitní chromatografií z média S2 buněk stabilně transfekovaných příslušným plasmidem. Médium obsahující extracelulární myší GCPII bylo centrifugováno, filtrováno a smícháno s ekvilibračním pufrům. Ke vzniklému roztoku byl přidán nosič Streptavidin Mutein Matrix a inkubováno přes noc (experiment 1). Nosič byl poté separován, promyt a proteiny eluovány (viz 4.3.10). Frakce FT¹ byla použita pro druhé kolo purifikace (experiment 2).

Průběh purifikace a složení jednotlivých frakcí bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE (obr. 10, str. 54), popř. detekcí biotinylované mGCPII pomocí NeutrAvidinu konjugovaného s křenovou peroxidasou (viz 4.3.13) (výsledky neuvedeny). Výtěžek purifikace byl určen stanovením proteinů dle Bradfordové v elučních frakcích E1, E2 a E3 (tab. 4, str. 54). Většina získaného proteinu byla obsažena ve frakcích E2, které byly následně smíchány, dialyzovány a dále použity.



Obr. 10: Purifikace extracelulární myší GCPII afinitní chromatografií.

Panel A se vztahuje k první části purifikace (experiment 1), panel B ke druhé části purifikace (experiment 2). Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 11% polyakrylamidovém gelu, který byl následně obarven stříbrem.

Panel A: Dráha 1: marker zdánlivých molekulových hmotností; dráha 2: standard extracelulární hGCPII (25 ng); dráha 3: médium po filtraci (10 μ l); dráha 4: frakce FT¹ (10 μ l); dráha 5: frakce W1 (10 μ l); dráha 6: frakce W2 (10 μ l); dráha 7: frakce W3 (10 μ l); dráha 8: frakce E1 (10 μ l); dráha 9: frakce E2 (1 μ l = 600 ng celkových proteinů); dráha 10: frakce E3 (10 μ l); dráha 11: frakce E4 (10 μ l); dráha 12: frakce R (10 μ l).

Panel B: Dráha 1: marker zdánlivých molekulových hmotností; dráha 2: standard extracelulární hGCPII (25 ng); dráha 3: frakce FT¹ (10 μ l); dráha 4: frakce FT² (10 μ l); dráha 5: frakce W1 (10 μ l); dráha 6: frakce W2 (10 μ l); dráha 7: frakce W3 (10 μ l); dráha 8: frakce E1 (10 μ l); dráha 9: frakce E2 (1 μ l = 130 ng celkových proteinů); dráha 10: frakce E3 (10 μ l); dráha 11: frakce E4 (10 μ l); dráha 12: frakce R (10 μ l).

Celkové množství čistého proteinu získané po dvou kolech purifikace bylo přibližně 3 mg (viz tab. 4). Čistota proteinu byla určena na 90 – 95 %. Část purifikované myší GCPII byla poté koncentrována na hodnotu 15 mg/ml a tato koncentrovaná frakce byla použita ke krystalizačním pokusům (viz 5.7).

Celkové množství biotinylované mGCPII v 1000 ml média bylo densitometricky stanoveno na 20 mg (data neuvedena); výtěžek purifikace tak byl přibližně 15 %.

Tab. 4: Porovnání množství myší GCPII v jednotlivých frakcích purifikace.

Frakce	Množství purifikovaného enzymu [mg]	
	Experiment 1	Experiment 2
E1	0,01	0,05
E2	2,4	0,5
E3	0,08	0,1

Množství proteinu bylo v jednotlivých frakcích stanoveno metodou dle Bradfordové (viz 4.3.16). V první části purifikace (experiment 1) je výtěžek zhruba pětikrát větší než v části druhé (experiment 2).

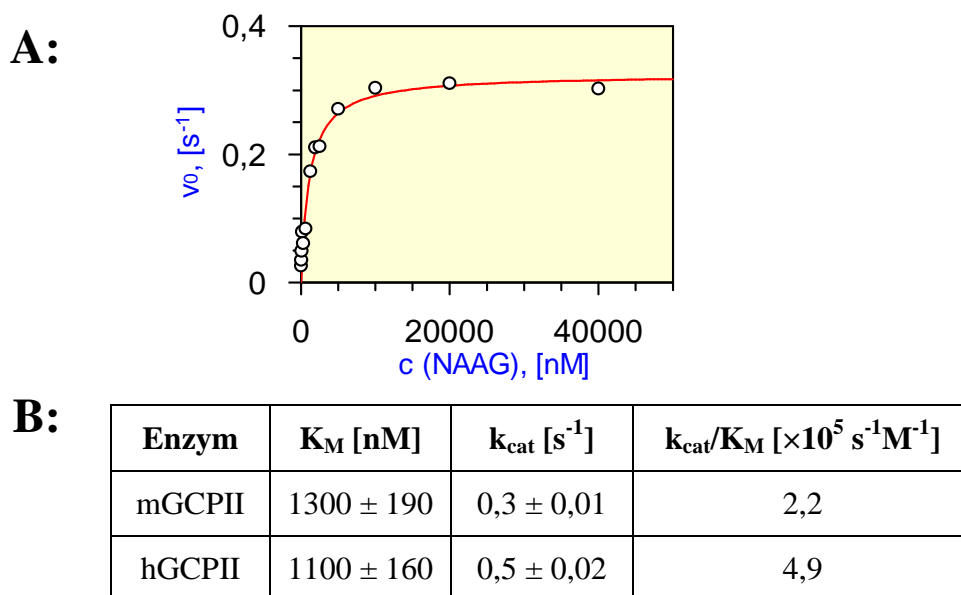
5.4 Porovnání enzymové aktivity myší a lidské rekombinantní GCPII

5.4.1 Kinetické parametry pro hydrolýzu endogenního substrátu N-Ac-Asp-Glu

Pro stanovení proteolytické aktivity byly použity rekombinantní extracelulární mGCPII a hGCPII (viz 4.3.17). Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno v programu GraFit 5.0.4 (Erithacus Software Limited).

Analýzou grafu dle Michaelise a Mentenové byly získány pro hydrolýzu NAAG extracelulární mGCPII hodnoty $K_M = 1300 \pm 190$ nM a $k_{cat} = 0,3 \pm 0,01$ s⁻¹ (obr. 11, panel A, B).

Paralelně byly prováděno měření kinetiky i pro lidskou GCPII, porovnání obou enzymů je uvedeno v obr. 11 (panel B). Je zřejmé, že oba enzymy vykazují podobné enzymové vlastnosti pro hydrolýzu NAAG; lidská rekombinantní GCPII má dvojnásobnou katalytickou účinnost ve srovnání s myší rekombinantní GCPII.



Obr. 11: Srovnání proteolytické aktivity myší a lidské extracelulární GCPII.

Panel A: Graf dle Michaelise-Mentenové pro hydrolýzu N-Ac-Asp-Glu extracelulární myší GCPII, který byl použit pro získání kinetických parametrů.

Panel B: Tabulka s porovnáním kinetických parametrů hydrolýzy dipeptidu N-Ac-Asp-Glu myší a lidskou extracelulární GCPII.

5.4.2 Inhibice proteolytické aktivity myší GCPII pomocí 2-PMPA

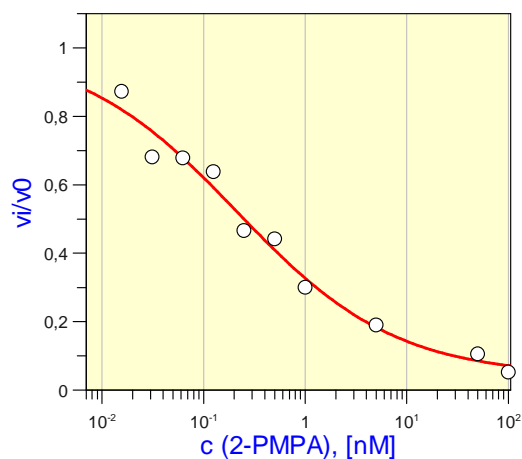
Inhibitor 2-PMPA je vysoce specifický a účinný inhibitor lidské GCPII a patří mezi nejpoužívanější inhibitory ve studiích zabývajících se GCPII. Proto bylo důležité zjistit, zda je myší GCPII podobně citlivá k tomuto inhibitoru jako její lidský homolog. Pro charakterizaci inhibice pomocí 2-PMPA byly radioenzymovou metodou za použití 100nM N-Ac-Asp-Glu jako substrátu určeny hodnoty IC_{50} pro rekombinantní extracelulární myší i lidskou GCPII (viz 4.3.17).

Hodnoty IC_{50} pro myší GCPII ($IC_{50} = 110 \pm 70$ pM) a lidskou GCPII ($IC_{50} = 250 \pm 30$ pM) byly obdrženy analýzou získaných dat v programu GraFit 5.0.4 (Erithacus Software Limited) (viz obr. 12).

A:

Enzym	IC_{50} [pM]
mGCPII	110 ± 70
hGCPII	250 ± 30

B:



Obr. 12: Porovnání inhibice hydrolýzy N-Ac-Asp-Glu extracelulární mGCPII a hGCPII inhibitorem 2-PMPA.

Panel A: Tabulka s porovnáním hodnot IC_{50} inhibitoru 2-PMPA pro myší a lidskou extracelulární GCPII.

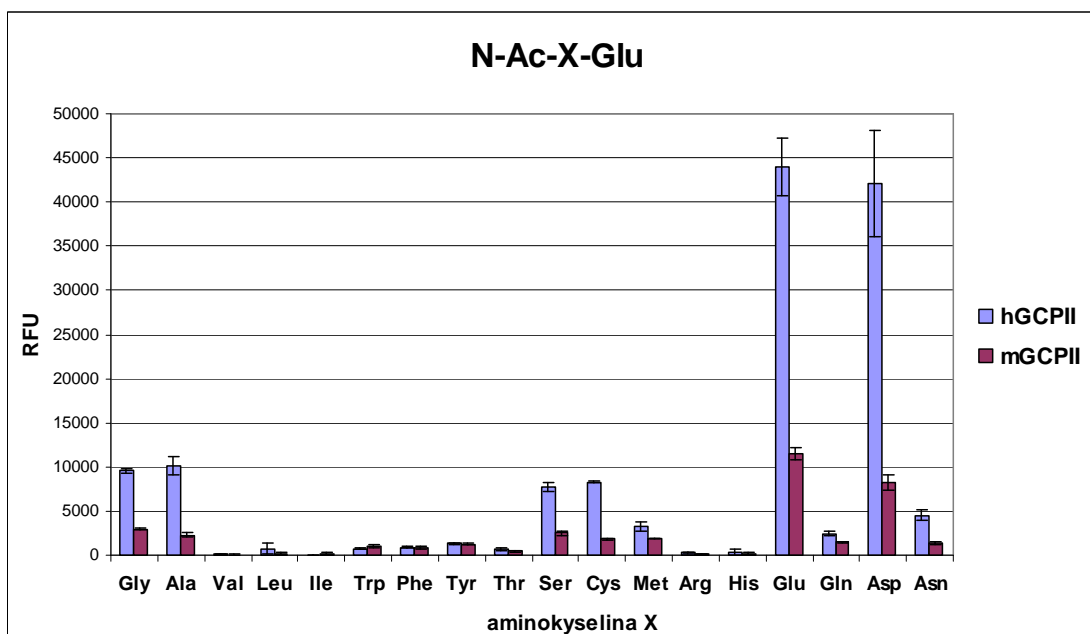
Panel B: Graf pro stanovení IC_{50} myší extracelulární GCPII pro 2-PMPA (měřeno pro 100nM N-Ac-Asp-Glu) bylo provedeno použitím koncentrační řady inhibitoru v rozmezí od 15 pM do 100 nM.

Při porovnání hodnot IC_{50} pro 2-PMPA u lidské a myší extracelulární GCPII je patrné, že jsou k tomuto inhibitoru podobně citlivé. Myší GCPII je tak v tomto ohledu dobrým farmakologickým modelem lidského homologu.

5.4.3 Substrátová specifita rekombinantní myší GCPII

Substrátová specifita myší extracelulární GCPII byla testována s použitím dvou substrátových knihoven odvozených od endogenního substrátu N-Ac-Asp-Glu. Knihovna dipeptidů obecného vzorce N-Ac-X-Glu umožňuje testovat preferenci enzymu na P1 pozici substrátu, zatímco knihovna N-Ac-Asp-X potom na pozici P1' (kde X je libovolná proteinogenní aminokyselina vyjma prolinu a lysinu). Pro porovnání bylo použito stejné množství lidské extracelulární GCPII (viz 4.3.18).

Lidská GCPII štěpila N-Ac-Glu-Glu a N-Ac-Asp-Glu mnohonásobně lépe než jakýkoliv jiný dipeptid v obou knihovnách, což je ve shodě s dříve publikovanými výsledky (viz obr. 13) [17, 23]. Nejlépe štěpenými substráty v případě myší GCPII byly taktéž N-Ac-Glu-Glu a N-Ac-Asp-Glu, které byly štěpeny mnohem lépe než jiné dipeptidy (v knihovně N-Ac-X-Glu). Ve srovnání s lidskou GCPII však byla míra jejich štěpení přibližně čtyřikrát menší (viz obr. 13).



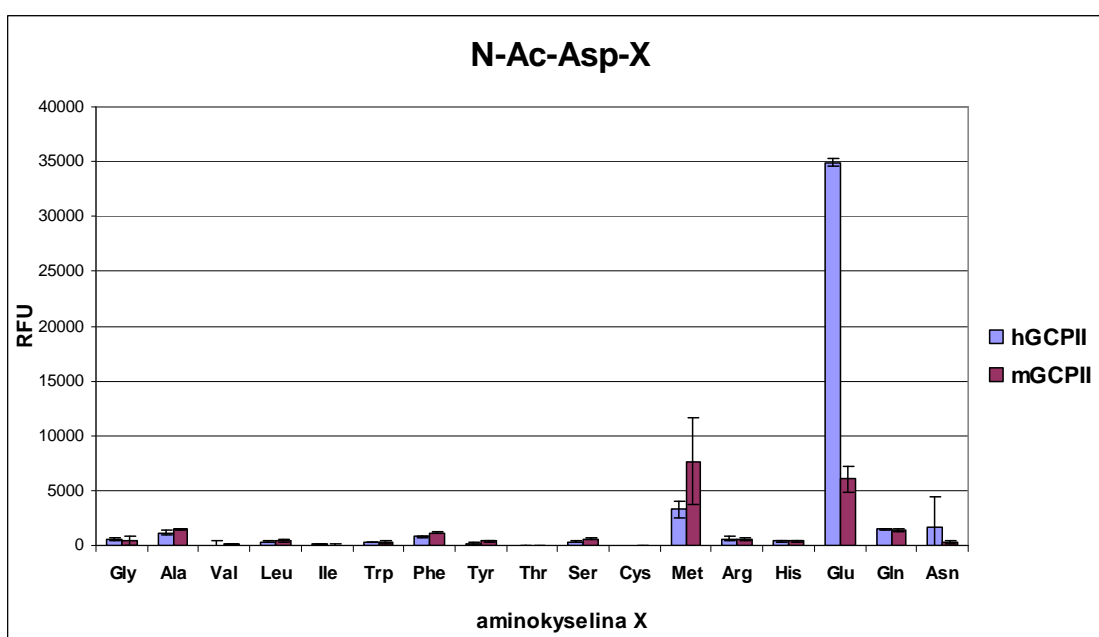
Obr. 13: Hydrolýza dipeptidů obecného vzorce N-Ac-X-Glu extracelulární myší a lidskou GCPII.

Dipeptidy obecného vzorce N-Ac-X-Glu byly hydrolyzovány stejným množstvím myší a lidské GCPII, uvolněné C-koncové aminokyseliny byly po derivatizaci stanoveny fluorimetricky. Nejlépe byly oběma enzymy štěpeny substráty N-Ac-Asp-Glu a N-Ac-Glu-Glu, tedy dipeptidy s kyselými zbytky.

V případě knihovny N-Ac-X-Glu štěpila myší GCPII stejné substráty jako lidská GCPII, pouze s menší účinností (jde o N-Ac-Gly-Glu, N-Ac-Ala-Glu, N-Ac-Ser-Glu, N-

Ac-Cys-Glu, N-Ac-Met-Glu, N-Ac-Gln-Glu a N-Ac-Asn-Glu). Poměr těchto rozštěpených dipeptidů lidskou a myší GCPII je přibližně stejný jako poměr pro N-Ac-Glu-Glu a N-Ac-Asp-Glu (viz obr. 13, str. 57). To naznačuje, že oba enzymy mají velmi podobnou specifitu pro substráty vzorce N-Ac-X-Glu, avšak myší GCPII má nižší katalytickou účinnost.

V případě knihovny N-Ac-Asp-X štěpila lidská GCPII vedle dipeptidu N-Ac-Asp-Glu i N-Ac-Asp-Met, což bylo publikováno již dříve [17]. Myší GCPII tento dipeptid štěpila také, avšak poněkud překvapivě dvakrát lépe než lidská GCPII. Ještě překvapivějším výsledkem je, že N-Ac-Asp-Met byl myší GCPII štěpen přibližně stejně dobře (či lépe) jako endogenní substrát N-Ac-Asp-Glu (viz obr. 14).



Obr. 14: Hydrolýza dipeptidů obecného vzorce N-Ac-Asp-X extracelulární myší a lidskou GCPII.

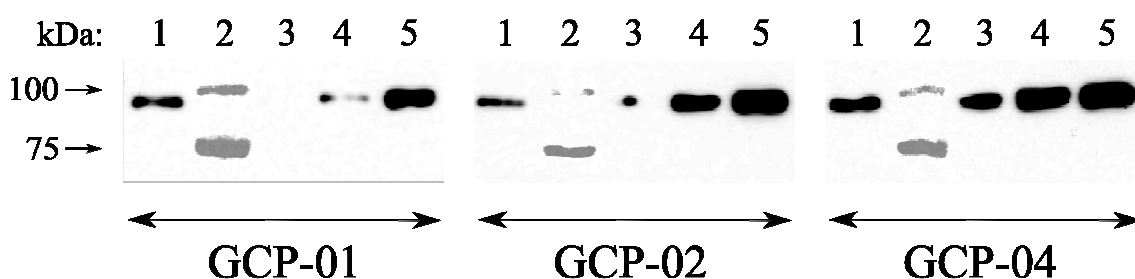
Dipeptidy obecného vzorce N-Ac-Asp-X byly hydrolyzovány stejným množstvím myší a lidské GCPII; uvolněné C-koncové aminokyseliny byly po derivatizaci stanoveny fluorimetricky. Nejlépe štěpenými substráty byly N-Ac-Asp-Glu a N-Ac-Asp-Met. Dipeptid N-Ac-Asp-Asp nebyl testován, neboť nebyl k dispozici.

Porovnání substrátové specifity obou enzymů odhalilo, že myší GCPII má velmi podobnou substrátovou specifitu jako lidská GCPII, avšak její katalytická účinnost je menší (přibližně čtyřikrát). Jedinou odchylkou je dipeptid N-Ac-Asp-Met, který byl velmi dobře štěpen myší GCPII.

5.5 Imunochemické studie myší a lidské GCPII

5.5.1 Imunochemické stanovení myší GCPII s použitím protilátek připravených proti denaturovanému lidskému enzymu

Monoklonální protilátky proti denaturované lidské GCPII – GCP-01, GCP-02 a GCP-04 (vytvořené v laboratoři prof. Hořejšího, ÚMG AV ČR, Praha) jsou v naší laboratoři používány pro detekci lidské GCPII. U všech tří protilátek byla testována jejich případná reaktivita i proti denaturované rekombinantní extracelulární myší GCPII. Po elektroforetickém rozdělení standardů lidské a myší GCPII o známých koncentracích byla GCPII imunochemicky detekována jednotlivými protilátkami (viz obr. 15).



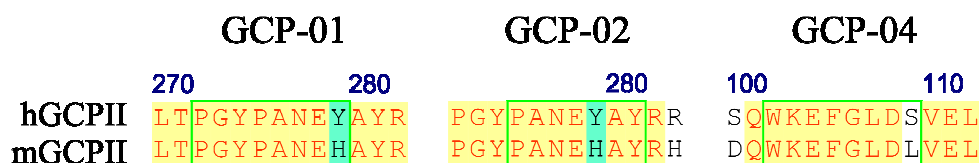
Obr. 15: Imunochemická detekce extracelulární myší GCPII monoklonálními protilátkami GCP-01, GCP-02 a GCP-04.

Dráha 1: extracelulární hGCPII (4 ng); dráha 2: marker zdánlivých molekulových hmotností; dráha 3: extracelulární mGCPII (4 ng); dráha 4: extracelulární mGCPII (8 ng); dráha 5: extracelulární mGCPII (16 ng).

Z obr. 15 je zřejmé, že všechny tři protilátky rozpoznávají oba proteiny s podobnou citlivostí. Densitometrickou analýzou koncentračních řad extracelulární mGCPII a hGCPII byly získány poměry citlivostí jednotlivých protilátek vůči oběma proteinům: GCP-01 je zhruba třikrát citlivější k lidské GCPII, GCP-02 a GCP-04 mají prakticky stejnou citlivost k oběma proteinům.

Jelikož epitopy všech tří protilátek jsou známy (nepublikované výsledky Františka Sedláka v naší laboratoři), je možné je porovnat u lidské a myší GCPII (viz obr. 16, str. 60). Všechny tři epitopy se liší v záměně jedné aminokyseliny, vliv záměny však nemusí být stejný – u epitopu pro GCP-04 bylo zjištěno, že poslední aminokyselina (serin

v případě lidské GCPII) hraje již spíše vedlejší roli oproti předchozím sedmi aminokyselinám (nepublikované výsledky Františka Sedláka v naší laboratoři).



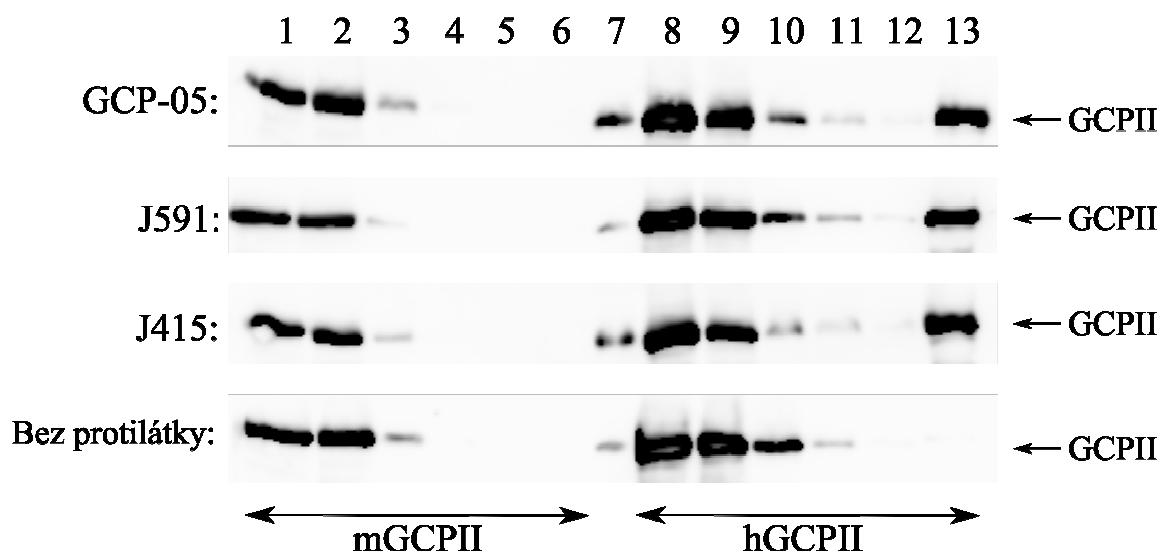
Obr. 16: Srovnání epitopů protilátek GCP-01, GCP-02 a GCP-04 u lidské a myší GCPII.

Porovnání epitopů všech tří protilátek u lidské GCPII (horní sekvence) a myší GCPII (spodní sekvence). Epitop protilátky je vyznačen zeleným obdélníkem, identické aminokyseliny jsou podbarveny žlutě, podobné zeleně a rozdílné bíle. Epitopy protilátek experimentálně stanovil František Sedlák v naší laboratoři (nepublikované výsledky).

5.5.2 Imunoreaktivita myší GCPII vůči protilátkám připravených proti nativní lidské GCPII

Protilátky GCP-05 (vytvořená v laboratoři prof. Hořejšího), J591 a J415 (dar Dr. Bandera, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY) byly testovány, zda-li rozpoznávají nativní myší GCPII. Tyto protilátky byly vytvořeny proti nativnímu proteinu lidské GCPII a rozpoznávají epitopy v jeho extracelulární části.

Myší GCPII byla imunoprecipitována z média S2 buněk obsahujícího extracelulární myší GCPII (viz 4.3.19). Jako pozitivní kontrola byla použita imunoprecipitace extracelulární lidské GCPII (taktéž z média S2 buněk), jako negativní kontrola byl pokus proveden bez přidání protilátky, pouze inkubací média S2 buněk (obahujícího myší či lidskou GCPII) s nosičem Protein G Sepharosou. Po rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE byla myší a lidská GCPII detekována specifickou protilátkou GCP-04 (viz obr. 17, str. 61).



Obr. 17: Imunoprecipitace extracelulární myší a lidské GCPII monoklonálními protilátkami GCP-05, J591 a 415.

Extracelulární mGCPII byla imunoprecipitována protilátkami proti nativní hGCPII. Jako pozitivní kontrola byla zvolena imunoprecipitace extracelulární hGCPII, jako negativní kontrola pak imunoprecipitace bez přidané protilátky. Proteiny přenesené na membránu byly detekovány protilátkou GCP-04 (viz 4.3.13).

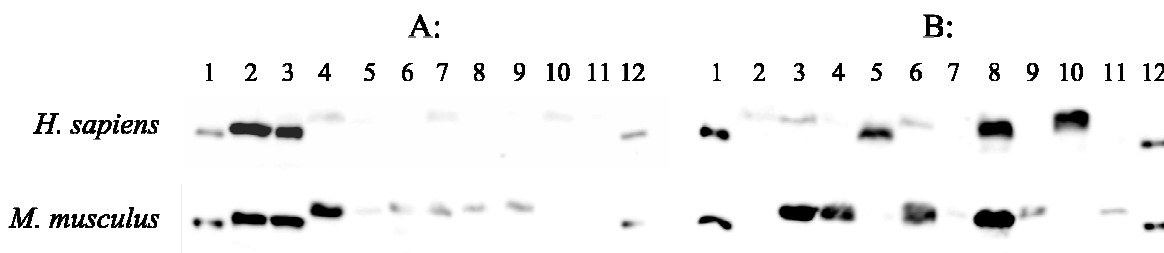
Dráhy 1,8: vzorek média S2 buněk obsahující mGCPII/hGCPII použitý k inkubaci (20 μ l); dráhy 2,9: frakce FT (20 μ l); dráhy 3,10: frakce W1 (20 μ l); dráhy 4,11: frakce W2 (20 μ l); dráhy 5,12: frakce W3 (20 μ l); dráhy 6,13: frakce E (4 μ l); dráha 7: standard extracelulární hGCPII (3 ng). Pro detailní popis jednotlivých frakcí viz 4.3.19.

Z výsledků je zřejmé, že žádná z testovaných protilátek GCP-05, J591 a J415 nerozpoznává extracelulární myší GCPII. Pro protilátku GCP-05 bylo stejného (tj. negativního) výsledku dosaženo i imunofluorescencí s použitím buněk HEK293 stabilně transfekovaných myší GCPII (data neuvedena).

5.5.3 Porovnání tkáňové distribuce GCPII v *Mus musculus* a *Homo sapiens*

Pro testování tkáňové distribuce byla použita sada 20 lidských a myších tkání. Tkáně byly homogenizovány (viz 4.3.22) a následně byly proteiny elektroforeticky rozděleny (viz 4.3.12). Po přenosu proteinů na membránu byla GCPII imunochemicky detekována použitím monoklonální protilátky GCP-04 (viz 4.3.13). Protilátka GCP-04 rozpoznává

myší i lidskou GCPII přibližně se stejnou citlivostí (viz 5.5.1). Pro možnost porovnání bylo do každé dráhy naneseno vždy stejné množství celkových proteinů (100 µg) (viz obr. 18).



Obr. 18: Porovnání tkáňové distribuce GCPII v *Mus musculus* a *Homo sapiens*.

Jednotlivé myší a lidské tkáně byly homogenizovány a po elektroforetickém rozdělení proteinů a jejich přenesení na membránu byla GCPII imunochemicky detekována použitím protilátky GCP-04. Do každé dráhy bylo naneseno 100 µg celkových proteinů.

Panel A: Dráha 1: standard extracelulární hGCPII (0,5 ng); dráha 2: mozek; dráha 3: mozeček; dráha 4: slezina; dráha 5: plíce; dráha 6: srdce; dráha 7: játra; dráha 8: slinivka břišní; dráha 9: žaludek; dráha 10: jejunum; dráha 11: tlusté střevo; dráha 12: standard extracelulární hGCPII (0,5 ng).

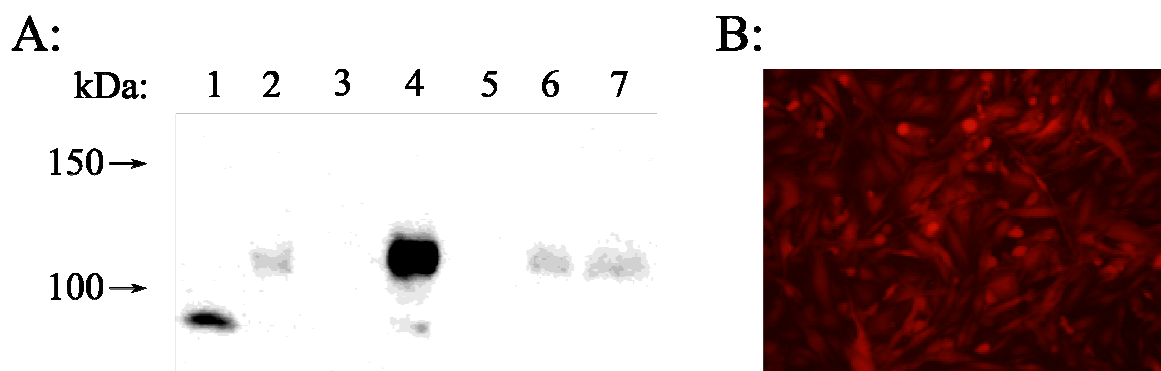
Panel B: Dráha 1: standard extracelulární hGCPII (0,5 ng); dráha 2: mléčná žláza; dráha 3: vaječník; dráha 4: děloha; dráha 5: prostata; dráha 6: varle; dráha 7: semenné vajíčky; dráha 8: ledvina; dráha 9: slinná žláza (žena/samice); dráha 10: slinná žláza (muž/samec); dráha 11: kůže; dráha 12: standard extracelulární hGCPII (0,5 ng).

V případě tkáňové distribuce obou orthologů byly pozorovány podstatné rozdíly. Pro oba enzymy je společná vysoká exprese v mozku (viz obr. 18, panel A, dráha 2; „A2“), mozečku (A3) a ledvinách (B8). Myší GCPII je mnohem více exprimována ve slezině (A4), vaječníku (B3), děloze (B4) a ve varleti (B6). Výrazně vyšší exprese lidské GCPII je v prostatě (B5) a mužské slinné žláze (B10). U ostatních tkání (A5 – A11, B2, B7, B9 a B11) je exprese GCPII mnohem menší než u výše zmíněných. „Nepřítomnost“ GCPII v těchto tkáních tak může být způsobena jen tím, že dané množství GCPII je již pod úrovní detekce protilátkou GCP-04.

5.6 Tvorba stabilní savčí buněčné linie exprimující myší GCPII

Původní linie U373MG je odvozena od lidského astrocytomu. Naším cílem bylo vytvořit stabilní buněčnou linii za účelem sledování vlivu myší GCPII na růst nádorů v xenograftech myších modelů.

Původní linie U373MG byla v naší laboratoři modifikována transfekcí plasmidem pTet-Off-Advanced (Clontech) zajišťujícím expresi regulačního proteinu v Tet-Off systému (Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System, Clontech). Poté byly tyto buňky transfekovány plasmidem pcDNA4mKate2 kódujícím mKate2, fluorescenční protein ve vzdálené červené oblasti pro vizualizaci buněk (nepublikované výsledky Pavla Šáchy, Jany Starkové a Karolíny Šrámkové). Nakonec byly buňky transfekovány plasmidem pTRE-Tight_mGCPII (vytvořený v naší laboratoři [110]), jenž umožňuje inducibilní expresi myší GCPII v savčích buňkách. Expresi myší GCPII je možné regulovat doxycyklinem: v nepřítomnosti doxycyklinu je myší GCPII buňkami exprimována, po přidání doxycyklinu do kultivačního média (do výsledné koncentrace 100 ng/ml) je exprese mGCPII utlumena. Jednotlivé získané klony byly testovány jednak z hlediska exprese a regulace exprese myší GCPII (viz obr. 19, panel A), jednak byla sledována i fluorescence buněk díky expresi mKate2 (viz obr. 19, panel B). Z několika obdržných klonů (cca 20) byl vybrán jeden (klon č. 6), který vynikal vysokou expresí myší GCPII i vynikajícími regulačními vlastnostmi (viz obr. 19, panel A).



Obr. 19: Imunochemická detekce regulace exprese myší GCPII a fluorescence proteinu mKate2 v buňkách stabilní buněčné linie odvozené od U373MG.

Panel A: Tři klony stabilní buněčné linie odvozené od U373MG inducibilně produkují myší GCPII v závislosti na přítomnosti/nepřítomnosti doxycyklinu (dox). Po přenosu proteinů na membránu byla myší GCPII detekována protilátkou GCP-04.

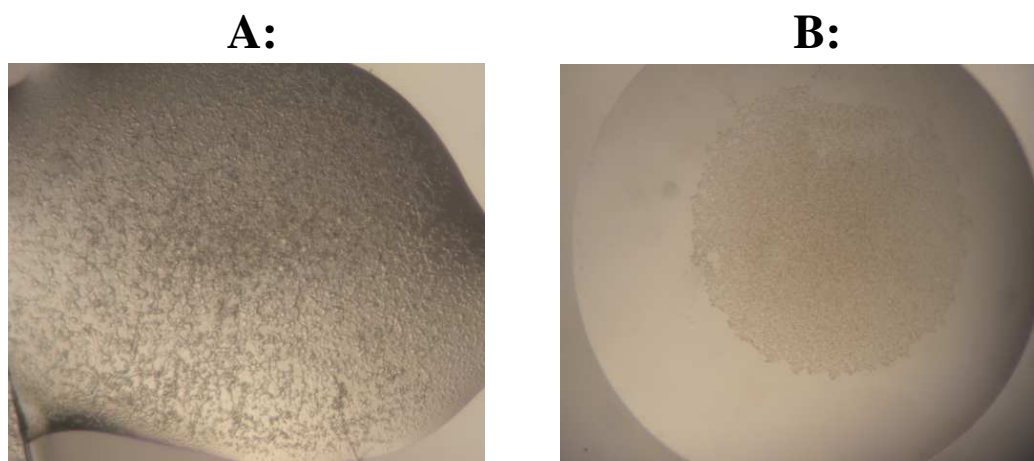
Dráha 1: extracelulární hGCPII (2 ng); dráha 2: klon 3; dráha 3: klon 3+dox; dráha 4: klon 6; dráha 5: klon 6+dox; dráha 6: klon 15; dráha 7: klon 15+dox. U vzorků klonů bez doxycyklinu byl nanesen vždy 1 µg celkových proteinů, u vzorků klonů s doxycyklinem pak 50 µg celkových proteinů.

Panel B: Fluorescence buněk stabilní buněčné linie, která konstitutivně exprimuje fluorescenční protein mKate2. Snímek byl pořízen fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81, expoziční doba byla 500 ms.

5.7 Krystalizace myší GCPII

Krystalizační experimenty byly provedeny jednak v krystalizačních podmínkách publikovaných pro lidskou GCPII [21], jednak byl proveden test 96 krystalizačních podmínek (kit JCSG+ Suite, Qiagen) pomocí krystalizačního robotu (viz 4.3.23). Extracelulární myší GCPII netvořila dostatečně velké monokrystaly v žádné z testovaných podmínek. U několika z nich (přibližně 15) ovšem došlo k vytvoření jemného či mikrokrytalického precipitátu (viz obr. 20, panel B), popř. velmi mnoha mikrokrytalů (viz obr. 20, panel A). V případě asi 5 podmínek došlo k vytvoření útvarů připomínající krystaly, avšak může se jednat o separaci fází apod. (data neuvedena). Zmíněné podmínky budou dále použity pro jejich budoucí optimalizaci.

Vyhodnocení podmínek bylo provedeno s pomocí Kláry Grantz-Šaškové.



Obr. 20: Příklady útvarů obržených při pokusech o krystalizaci extracelulární myší GCPII.

Panel A: Velké množství mikrokrytalů obržených při krystalizaci myší GCPII ve 200 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 10% (w/v) PEG 8000, pH 8,0 (podmínka č. 20 v kitu JCSG+ Suite, Qiagen). Krystalizace myší GCPII byla provedena bez inhibitoru či substrátu a smíchání kapek bylo provedeno roboticky (viz 4.3.23.2).

Panel B: Krystalický mikroprecipitát vytvořený při krystalizaci myší GCPII v podmínce pro krystalizaci lidské GCPII (33% (v/v) pentaerythritolpropoxylát PO/OH 5/4, 100 mM Tris-HCl, 1% (w/v) PEG 3350, pH 8,0). Krystalizace myší GCPII byla provedena s přidaným specifickým inhibitorem 2-PMPA a smíchání kapek bylo provedeno manuálně (viz 4.3.23.1).

6. Diskuze

Teoretická část této práce shrnuje základní poznatky o lidské GCPII a jejím současném i potenciálním budoucím terapeutickém využití. Zároveň se zabývá myším orthologem GCPII, neboť myš je velice rozšířený modelový organismus. V praktické části práce byly oba proteiny porovnány z hlediska jejich enzymových vlastností, stejně jako i jejich tkáňové distribuce.

Jelikož GCPII vyžaduje pro své správné sbalení a funkci postranlační modifikace (především N-glykosylaci), je nutné používat poměrně složitý a náročný eukaryotní expresní systém namísto jednoduchého prokaryotního (např. *E. coli*). Proto byla DNA kódující extracelulární část myší GCPII klonována do vektoru umožňujícího heterologní expresi sekretovaného proteinu v hmyzích S2 buňkách (vektor odvozený od pMT/BiP/V5-HisA). Výtěžek rekombinantní myší GCPII byla srovnatelná s lidskou GCPII (přibližně 20 mg biotinylovaného proteinu/1 litr média); podmínky pro expresi proto nebyly nijak upravovány (viz 5.1 a 5.2).

Rekombinantní extracelulární myší GCPII byla exprimována ve fúzi s purifikační značkou (avi-tag), která umožňuje snadnou, rychlou a efektivní purifikaci afinitní chromatografií. Dříve jsme v naší laboratoři purifikovali několikakrokovým procesem sestávajícím ze dvou ionexových chromatografií a gelové permeační chromatografie [17]. Tento protokol, ač byl víceméně univerzální, musel být pro každý nový protein poměrně složitě a především zdlouhavě optimalizován. Myší GCPII byla v naší laboratoři třetím proteinem, jenž byl purifikován novým protokolem. Její purifikace potvrdila vysokou univerzálnost afinitní purifikace – bylo dosaženo stejného výtěžku a čistoty jako v případě lidské GCPII a jejího homologu NAALADasy L (okolo 3 mg proteinu/1 litr média; viz tab. 4, str. 54). Díky této purifikaci je možné snadno produkovat dostatečné množství velmi čistého rekombinantního proteinu, což je výhodné zejména pro krystalizaci proteinů, tvorbu protilátek a jiné metody spotřebovávající velká množství proteinu.

Důležitým úkolem bylo srovnání enzymových vlastností myší a lidské GCPII. Jelikož myš je jedním z nejpoužívanějších modelů ve studiích zabývajících se funkcí GCPII, je nezbytné vědět, zda-li jsou si oba proteiny opravdu podobny. Dosud nebyla

připravena čistá rekombinantní myší GCPII a tak neexistuje ani žádné porovnání obou enzymů.

Proteolytická aktivita extracelulární myší GCPII byla stanovena radioenzymovou metodou využívající tritiem značený endogenní substrát N-Ac-Asp-Glu. Pro jeho hydrolýzu bylo stanoveno $K_M = 1300 \pm 190$ nM a $k_{cat} = 0,3 \pm 0,01$ s⁻¹. Obě hodnoty jsou velmi blízké lidské GCPII ($K_M = 1100 \pm 160$ nM a $k_{cat} = 0,5 \pm 0,02$ s⁻¹); lidská extracelulární GCPII má dvojnásobnou katalytickou účinnost (k_{cat}/K_M) ve srovnání s myší extracelulární GCPII (viz obr. 11, str. 55). Oba enzymy si tak jsou velmi podobné, co se týče jejich proteolytické aktivity a štěpení N-Ac-Asp-Glu.

Pro charakterizaci inhibice myší GCPII byl zvolen inhibitor 2-PMPA; vysoce účinný, specifický a velmi často používaný inhibitor lidské GCPII. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny pro 100 nM substrát N-Ac-Asp-Glu pro oba enzymy opět radioenzymovou metodou ($IC_{50} = 110 \pm 70$ pM pro myší GCPII; $IC_{50} = 250 \pm 30$ pM pro lidskou GCPII). Citlivost obou enzymů vůči 2-PMPA byla i v tomto případě velmi podobná (viz obr. 12, str. 56)

Substrátová specifita myší GCPII byla testována s použitím dvou dipeptidových knihoven: N-Ac-X-Glu a N-Ac-Asp-X (kde X je libovolná proteinogenní aminokyselina vyjma lysinu a prolinu). Tyto dipeptidové knihovny jsou odvozeny od endogenního substrátu GCPII, tj. N-Ac-Asp-Glu. Jejich použitím lze testovat požadavky aktivního místa na přítomnost skupin nutných pro interakci s aminokyselinovými zbytky, které tvoří aktivní místo a podílí se na vazbě substrátu. Z předchozích výsledků bylo známo, že lidská GCPII preferuje kyselé dipeptidy N-Ac-Asp-Glu a N-Ac-Glu-Glu, ale také N-Ac-Asp-Met [17]. Tento výsledek byl potvrzen; předchozí výsledky byly dosaženy s rekombinantním enzymem bez purifikační značky avi-tag. Myší GCPII vykazovala prakticky stejnou preferenci štěpených dipeptidů, avšak s přibližně čtyřikrát nižší katalytickou účinností (viz obr. 13 a 14, str. 57 a 58). Jedinou výjimkou byl N-Ac-Asp-Met, který byl štěpen myší GCPII lépe než lidskou GCPII. Zároveň byl N-Ac-Asp-Met pro myší GCPII přinejmenším stejně dobrým substrátem jako endogenní substrát N-Ac-Asp-Glu. Vysoká chyba v případě N-Ac-Asp-Met (u myší GCPII) byla způsobena jedním vzorkem v daném triplikátu, který měl oproti zbývajícím dvěma výrazně nižší hodnotu $\lambda_{420}/\lambda_{480}$ (3096 RFU vs. 9658 a 10242 RFU). Skutečná hodnota $\lambda_{420}/\lambda_{480}$ pro N-Ac-Asp-Met je tedy pravděpodobně ještě vyšší než aritmetický průměr vzorků triplikátu (tj. 7665 RFU).

Celkově však lze říci, že myší GCPII je z pohledu enzymových vlastností dobrým modelem lidské GCPII, neboť oba enzymy si jsou v tomto ohledu velmi podobné.

Další rozsáhlou částí diplomové práce bylo testování schopnosti protilátek vytvořených proti lidské GCPII rozpoznávat i myší GCPII. Jak plyne z výsledků, všechny testované protilátky (GCP-01, GCP-02 a GCP-04), které byly vytvořeny proti denaturované lidské GCPII rozpoznávají i myší GCPII. Jejich citlivost vůči oběma proteinům je přibližně stejná (viz obr. 15, str. 59). František Sedlák určil epitopy jednotlivých protilátek (nepublikované výsledky); jejich srovnáním lze zjistit, že se ve všech případech liší v záměně jedné aminokyseliny. Nakolik je tato změna důležitá pro rozpoznávání epitopu je diskutabilní, záleží samozřejmě na typu záměny, stejně jako na „významnosti“ pozice aminokyseliny. Příkladem může být epitop protilátky GCP-04, kdy poslední aminokyselina hraje již podřadnější roli oproti předchozím aminokyselinám (viz 5.5.1), nebo dvojice protilátek GCP-01 a GCP-02 mající podobné epitopy, avšak odlišné citlivosti k myší GCPII (viz 5.5.1).

Naprosto opačný výsledek byl získán u protilátek vytvořených proti nativní lidské GCPII. Ani jedna z protilátek, které byly k dispozici (GCP-05, J415 a J591) nerozpoznávala myší GCPII (viz obr. 17, str. 61). Epitop těchto protilátek v lidské nativní GCPII je neznámý (stejně jako trojrozměrná struktura myší GCPII), takže nemohou být porovnány dané oblasti obou proteinů. Je však zřejmé, že u všech tří protilátek je epitopem oblast, která se liší v lidské a myší GCPII. To je určitým způsobem zajímavé, neboť proteiny mají 86% identitu (91% podobnost) a jejich trojrozměrná struktura tak bude pravděpodobně velmi podobná. Epitopem by tak mohla být spíše nějaká nekonzervovaná oblast vytvářející flexibilní část proteinu.

V současné době je ve spolupráci s laboratoří prof. Hořejšího vyvíjena protilátka proti nativní myší GCPII, kdy byly laboratorní myši imunizovány rekombinantní extracelulární myší GCPII.

Ačkoliv si jsou oba orthology velmi podobné z hlediska enzymových vlastností, jejich exprese v jednotlivých tkáních byla poněkud odlišná. Podobná situace byla pozorována již v předchozí studii s prasečí a potkaní GCPII, kdy se enzymové vlastnosti proteinu podobaly, zatímco v jejich expresi byly větší či menší rozdíly [76]. U myši i člověka byla společná vysoká exprese v mozku a ledvinách. GCPII byla mnohem více exprimována v myší slezině, vaječníku, děloze a varleti. Naopak výrazná exprese byla pozorována v lidské prostatě a mužské slinné žláze, zatímco odpovídající myší tkáně

GCPII neexprimovaly (viz obr. 18, str. 62). Zajímavá je dvojice tkání prostata/varle a mužská/ženská slinná žláza. U myši se GCPII v prostatě neexprimuje (či jen velmi málo), zatímco ve varleti se exprimuje ve velkém množství. U člověka je situace právě opačná.

Ve shodě s předchozími studii (provedené na úrovni mRNA) byla pozorována exprese GCPII v myším mozku, ledvině, vaječnicích, varlatech a (samičí) slinné žláze. Ve studii byla ovšem myší slezina bez exprese GCPII, zatímco zde patřila k tkáním s vysokou expresí [43]. V případě dalších neshod (plíce, srdce, játra, slinivka břišní a semenné vajíčky) byla exprese GCPII velmi malá a je tudíž pravděpodobné, že se ji na úrovni mRNA nepodařilo detekovat.

Tyto rozdíly v expresi obou proteinů by mohly být důležité při využití myši jako modelového organismu a je nutné být si jich vědom při navrhování i testování nových léků či metod terapie.

V souvislosti s funkcemi GCPII se spekuluje o její roli ve vzniku a růstu nádorů. Proto byla vytvořena stabilní buněčná linie odvozená od lidského astrocytomu, která inducibilně exprimuje myší GCPII. Tato buněčná linie bude v budoucnu použita pro implantaci do myši. Potenciální růst nádorů je pak možno přímo sledovat vizualizací proteinu mKate2 fluoreskujícího ve vzdálené červené oblasti, který tato linie konstitutivně exprimuje (viz obr. 19, str. 63, panel B). Jelikož exprese myší GCPII je indukovatelná nepřítomností či přítomností doxycyklinu, je možné použít jako xenograft exprimující/neexprimující myší GCPII stejnou buněčnou linii. To je výhoda tohoto systému, neboť případné rozdíly v růstu nádoru nemohou být způsobeny odlišnostmi v buněčné linii. V současnosti se připravují tyto experimenty s lidskou GCPII a použití myší GCPII se nabízí (vzhledem k použitému myšimu modelu) jako další logický krok.

Trojrozměrná struktura lidské GCPII je již dobře známa a existuje několik krystalových struktur s různými ligandy v aktivním místě [15, 19, 21]. Jak již bylo zmíněno, oba enzymy vykazují vysokou sekvenční podobnost, stejně jako podobné enzymové vlastnosti. Proto lze předpokládat, že celková trojrozměrná struktura myší GCPII bude velmi podobná svému lidskému protějšku. Přesto jsme se rozhodli krystalovat myší GCPII, neboť případné rozdíly v architektuře aktivního místa by mohly vysvětlit odlišné výsledky při testování substrátové specifity obou enzymů.

Jelikož při použití podmínek užívaných pro krystalizaci lidské GCPII se nepodařilo získat žádné monokrystaly myší GCPII (pouze krystalický mikroprecipitát), byl proveden test dalších 96 podmínek pomocí krystalizačního robotu. Ani v tomto případě však nedošlo k tvorbě velkých monokrystalů myší GCPII. Podařilo se však identifikovat několik podmínek, ve kterých došlo k tvorbě jemných precipitátů, krystalických precipitátů či dokonce mikrokrystalů (viz obr. 20, str. 64). Z těchto několika je třeba vybrat ty nejvhodnější a pokusit se o jejich optimalizaci (např. změnou koncentrace precipitačního činidla či proteinu, změnou pH, přidáním inhibitoru či substrátu apod.).

Cílem této práce bylo porovnání myší a lidské GCPII a zhodnotit, zda-li je myší GCPII dobrým modelem pro svůj lidský ortholog. Z dosažených výsledků je zřejmé, že celkově si oba enzymy odpovídají svými enzymovými vlastnostmi – jejich aktivita, substrátová specifita i citlivost vůči inhibitoru 2-PMPA byly velmi podobné. V tomto ohledu je myší GCPII vhodným modelem pro lidskou GCPII. Avšak na druhé straně je nutné mít na paměti fakt, že se oba proteiny liší svou expresí v jednotlivých tkáních a částečně i substrátovou specifikou. Rozdílný expresní profil v obou organismech může naznačovat na dosud neznámý substrát GCPII, popř. na novou neenzymovou funkci GCPII v těchto tkáních.

7. Závěr

1. extracelulární myší GCPII byla klonována do vhodného vektoru, exprimována v hmyzích S2 buňkách a purifikována afinitní chromatografií ve velmi dobré čistotě a výtěžku
2. afinita extracelulární myší a lidské GCPII k endogennímu substrátu N-Ac-Asp-Glu byla velmi podobná; lidská GCPII vykazuje dvakrát vyšší katalytickou účinnost
3. extracelulární myší a lidská GCPII byly podobně citlivé k inhibici 2-PMPA, specifickému inhibitoru lidské GCPII
4. substrátová specifita myší a lidské extracelulární GCPII pro dipeptidy vzorce N-Ac-Asp-X a N-Ac-X-Glu byla velmi blízká (s výjimkou N-Ac-Asp-Met), myší GCPII však vykazovala nižší katalytickou účinnost
5. protilátky vytvořené proti denaturované lidské GCPII rozpoznávaly denaturovanou myší GCPII (všechny přibližně se stejnou afinitou); naopak protilátky vytvořené proti nativní lidské GCPII neinteragovaly s nativní myší GCPII
6. tkáňová distribuce myší GCPII je odlišná ve srovnání s lidským orthologem: GCPII je exprimována ve velkém množství v myší slezině, vaječnících, děloze a varletech, odpovídající lidské tkáni exprimují GCPII jen v malém množství; naopak exprese GCPII v lidské prostatě byla vysoká, zatímco v myší prostatě byla velmi malá až nulová
7. krystalizací se podařilo připravit mikrokryštaly myší GCPII; podmínky budou dále optimalizovány k získání dostatečně velkých monokrystalů a následné vyřešení trojrozměrné struktury myší GCPII

8. Seznam zkratek

[³ H]NAAG	N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát značený tritiem
2-PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová
2-MPPA	kyselina 2-(3-merkaptopropyl)pentandiová
7E11-C5.3	myší monoklonální protilátka proti GCPII
AP-2	adaptorový protein 2
ALS	amyotrofická laterální skleróza
BSA	hovězí sérový albumin
CNS	centrální nervová soustava
CV	objem nosiče (z angl. <i>column volume</i>)
CYT-356	protilátka 7E11-C5.3 značená radionuklidem ¹¹¹ In
DM1	maytansinoid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
EST	část exprimované mRNA (z angl. <i>expressed sequence tag</i>)
FDA	Úřad pro schvalování léčiv a potravin (z angl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>fetal bovine serum</i>)
GABA	kyselina γ -aminobutanová
GCPII	glutamátkarboxypeptidasa II
GCPIII	glutamátkarboxypeptidasa III
hGCPII	lidská GCPII
IUBMB	Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (z angl. <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
J415	myší monoklonální protilátka proti GCPII
J591	myší monoklonální protilátka proti GCPII
LNCaP	buněčná linie odvozená od metastáz karcinomu prostaty v lymfatických uzlinách (z angl. <i>lymph node carcinoma of the prostate</i>)
MCAO	uzavření cévy <i>arteria cerebri media</i> (z angl. <i>middle cerebral artery occlusion</i>)
mGCPII	myší glutamátkarboxypeptidasa II
mGlu receptory	metabotropní glutamátové receptory
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)

MOPS	kyselina 3-(N-morfolino)propansulfonová
MWCO	limit molekulové hmotnosti (z angl. molecular weight cut off)
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát
NAALADasa	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase (= GCPII)
NAALADasa L	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like
NDA	naftalen-2,3-dikarbaldehyd
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PAK-1	kinasa aktivovaná p21
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PC-3	buněčná linie odvozená od buněk karcinomu prostaty
PET	pozitronová emisní tomografie
PSA	antigen specifický pro prostatu (z angl. prostate-specific antigen)
PSM'	alternativně sestřižená forma GCPII
PSMA	membránový antigen specifický pro prostatu (z angl. prostate-specific membrane antigen); identická ke GCPII
PSM-C	alternativně sestřižená forma GCPII
PSM-D	alternativně sestřižená forma GCPII
PSM-E	alternativně sestřižená forma GCPII
RIT	radioimunoterapie
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)
SDS-PAGE	redukující polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS
SOD1	superoxiddismutasa 1
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (z angl. single photon emission computed tomography)
TEV proteasa	proteasa z viru tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus)
TfR	transferinový receptor
TGF- β	transformující růstový faktor β (z angl. transforming growth factor)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZJ-43	kyselina N-[[[(1S)-1-karboxy-3-methylbutyl]amino]karbonyl]-L-glutamová
v/v	objemový zlomek (objem složky/objem roztoku)
w/v	poměr hmotnost složky/objem roztoku
w/w	hmotnostní zlomek (hmotnost složky/hmotnost roztoku)

9. Příloha

Tab. 5: Seznam použitých primerů

Název primeru	Sekvence primeru
Fmus44OK	5'-AAA AGA TCT AAA CCT TCC AAT GAA GCT ACT GG-3'
Rmus752OK2	5'-AAA CTC GAG TTA AGC TAC TTC CCT CAG AGT C-3'
MT primer	5'-CAT CTC AGT GCA ACT AAA-3'
BGH primer	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
Rmin3	5'-CAT AGA CAC TGT GAT AGA GAG GAT AGC TGC-3'
Zoo2	5'-CTC CAC TCT GAG GGT CAA TGC CAC C-3'

10. Seznam použité literatury

1. 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 Res* 1987; 7:927-35
2. Robinson M.B., Blakely R.D., Couto R., Coyle J.T.: **Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain.** *J Biol Chem* 1987; 262:14498-506
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.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:749-53
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.** *Clin Cancer Res* 1996; 2:1445-51
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).** *Eur J Biochem* 1997; 250:1-6
6. O'Keefe D.S., Su S.L., Bacich D.J., Horiguchi Y., Luo Y., Powell C.T., Zandvliet D., Russell P.J., Molloy P.L., Nowak N.J., Shows T.B., Mullins C., 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.** *Biochim Biophys Acta* 1998; 1443:113-27
7. Leek J., Lench N., Maraj B., Bailey A., Carr I.M., Andersen S., Cross J., Whelan P., MacLennan K.A., Meredith D.M., Markham A.F.: **Prostate-specific membrane antigen: evidence for the existence of a second related human gene.** *Br J Cancer* 1995; 72:583-8
8. 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 alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity.** *J Biol Chem* 1999; 274:8470-83
9. 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 Res* 1995; 55:1441-3

10. 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 Res* 1998; 58:4787-9
11. O'Keefe D.S., Bacich D.J., Heston W.D.W.: **Prostate specific membrane antigen.** V knize „*Prostate cancer: biology, genetics and the new therapeutics*“, (Chung L.W.K., Issacs W.B., Simons J.W., edit.), Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2001, 307-26
12. 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
13. 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 Res* 1993; 53:227-30
14. Davis M.I., Bennett M.J., Thomas L.M., Bjorkman P.J.: **Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:5981-6
15. Mesters J.R., Bařinka 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 J* 2006; 25:1375-84
16. 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.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:12590-5
17. Bařinka C., Rinnová M., Šácha P., Rojas C., Majer P., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II.** *J Neurochem* 2002; 80:477-87
18. Lawrence C.M., Ray S., Babyonyshev M., Galluser R., Borhani D.W., Harrison S.C.: **Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor.** *Science* 1999; 286:779-82
19. Bařinka C., Hlouchová K., Rovenská 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.** *J Mol Biol* 2008; 376:1438-50

20. Bařinka C., řácha P., Sklenář J., Man P., Bezouřka K., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity.** *Protein Sci* 2004; 13:1627-35
21. Bařinka C., Starková J., Konvalinka J., Lubkowski J.: **A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2007; 63:150-3
22. Rawlings N.D., Barrett A.J.: **Structure of membrane glutamate carboxypeptidase.** *Biochim Biophys Acta* 1997; 1339:247-252
23. Hlouchová K., Bařinka C., Klusák V., řácha P., Mlčochová P., Majer P, Rulíšek L., Konvalinka J.: **Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III.** *J Neurochem* 2007; 101:682-96
24. Luthi-Carter R., Barczak A.K., Speno H., Coyle J.T.: **Molecular characterization of human brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase).** *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:1020-5
25. 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.** *J Biol Chem* 1990; 265:21297-301
26. Slusher B.S., Vornov J.J., Thomas A.G.: **Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury.** *Nat Med* 1999; 5:1396-1402
27. 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 Res* 1998; 795:341-8
28. Halsted C.H.: **Jejunal Brush-Border Folate Hydrolase. A Novel Enzyme.** *West J Med* 1991; 155:605-9
29. Serval V., Barbeito L., Pittaluga A., Cheramy A., Lavielle S., Glowinski J.: **Competitive inhibition of N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase activity by N-acetyl-L-aspartyl-beta-linked L-glutamate.** *J Neurochem* 1990; 55:39-46
30. Jackson P.F., Cole D.C., Slusher B.S., Stetz S.L., Ross L.E., Donzanti B.A., Trainor D.A.: **Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase.** *J Med Chem* 1996; 39:619-22

31. Rojas C., Frazier S.T., Flanary J., Slusher B.S.: **Kinetics and inhibition of glutamate carboxypeptidase II using a microplate assay.** *Anal Biochem* 2002; 310:50-4
32. Tsukamoto T., Wozniak K.M., Slusher B.S.: **Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase II inhibitors.** *Drug Discov Today*; 12:767-76
33. 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.** *Eur J Pharmacol* 2001; 430:33-40
34. Gafurov B., Urazaev A.K., Grossfeld R.M., Lieberman E.M.: **N-acetylaspartylglutamate (NAAG) is the probable mediator of axon-to-glia signaling in the crayfish medial giant nerve fiber.** *Neuroscience* 2001; 106:227-35
35. Majer P., Jackson P.F., Delahanty G., Grella B.S., Ko Y.S., Li W., Liu Q., Maclin K.M., Poláková J., Shaffer K.A., Stoermer D., Vitharana D., Wang E.Y., Zakrzewski A., Rojas C., Slusher B.S., Wozniak K.M., Burak E., Limsakun T., Tsukamoto T.: **Synthesis and biological evaluation of thiol-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II: discovery of an orally active GCP II inhibitor.** *J Med Chem* 2003; 46:1989-96
36. van der Post J.P., de Visser S.J., de Kam M.L., Woelfler M., Hilt D.C., Vornov J., Burak E.S., Bortey E., Slusher B.S., Limsakun T., Cohen A.F., van Gerven J.M.: **The central nervous system effects, pharmacokinetics and safety of the NAALADase-inhibitor GPI 5693.** *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60:128-36
37. Kozikowski A.P., Nan F., Conti P., Zhang J., Ramadan E., Bzdega T., Wroblewska B., Neale J.H., Pshenichkin S., Wroblewski J.T.: **Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase).** *J Med Chem* 2001; 44:298-301
38. Liu H., Rajasekaran A.K., Moy P., Xia Y., Kim S., Navarro V., Rahmati R., Bander N.H.: **Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Res* 1998; 58:4055-60
39. Rajasekaran S.A., Anilkumar G., Oshima E., Bowie J.U., Liu H., Heston W., Bander N.H., Rajasekaran A.K.: **A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen.** *Mol Biol Cell* 2003; 14:4835-45
40. Anilkumar G., Rajasekaran S.A., Wang S., Hankinson O., Bander N.H., Rajasekaran A.K.: **Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity.** *Cancer Res* 2003; 63:2645-8

41. 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; 144:1361-72
42. Curatolo A., D'Arcangelo P., Lino A., Brancati A.: **Distribution of N-acetylaspartic and N-acetylaspartylglutamic acids in the neuraxis of birds.** *Boll Soc Ital Biol Sper* 1965; 41:591-3
43. Forloni G., Grzanna R., Blakely R.D., Coyle J.T.: **Co-localization of N-acetyl-aspartyl-glutamate in central cholinergic, noradrenergic, and serotonergic neurons.** *Synapse* 1987; 1:455-60
44. Wroblewska B., Wroblewski J.T., Saab O.H., Neale J.H.: **N-acetylaspartylglutamate inhibits forskolin-stimulated cyclic AMP levels via a metabotropic glutamate receptor in cultured cerebellar granule cells.** *J Neurochem* 1993; 61:943-8
45. Wroblewska B., Wroblewski J.T., Pshenichkin S., Surin A., Sullivan S.E., Neale J.H.: **N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells.** *J Neurochem* 1997; 69:174-81
46. Westbrook G.L., Mayer M.L., Namboodiri M.A., Neale J.H.: **High concentrations of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) selectively activate NMDA receptors on mouse spinal cord neurons in cell culture.** *J Neurosci* 1986; 6:3385-92
47. 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.** *J Neurochem* 2002; 83:20-9
48. 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.** *Eur J Neurosci* 2001; 13:340-6
49. Sanabria E.R., Wozniak K.M., Slusher B.S., Keller A.J.: **GCP II (NAALADase) inhibition suppresses mossy fiber-CA3 synaptic neurotransmission by a presynaptic mechanism.** *Neurophysiol* 2004; 91:182-93
50. Watkins J.C.: **L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back.** *Biochem Soc Trans* 2000; 28:297-309

51. 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 Pharmacol Sci* 2005; 26:477-84
52. Doble A.: **The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy.** *Pharmacol Ther* 1999; 81:163-221
53. Choi D.W.: **Ionic dependence of glutamate neurotoxicity.** *J Neurosci* 1987; 7:369-79
54. Waxman E.A., Lynch D.R.: **N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease.** *Neuroscientist* 2005; 11:37-49
55. Becker J.U., Wira C.R., Arnold J.L.: **Stroke, ischemic.** *eMedicine* 2010; webová adresa: <http://emedicine.medscape.com/article/793904-overview> (prohlédnuto 23.3.2010)
56. Lu X.M., Tang Z., Liu W., Lin Q., Slusher B.S.: **N-acetylaspartylglutamate protects against transient focal cerebral ischemia in rats.** *Eur J Pharmacol* 2000; 408:233-9
57. Tortella F.C., Lin Y., Ved H., Slusher B.S., Dave J.R.: **Neuroprotection produced by the NAALADase inhibitor 2-PMPA in rat cerebellar neurons.** *Eur J Pharmacol* 2000; 402:31-7
58. 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.** *J Neurosci* 1997; 17:1891-7
59. 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.** *J Neurochem* 2005; 95:314-23
60. Tsai G., Dunham K.S., Drager U., Grier A., Anderson C., Collura J., Coyle J.T.: **Early embryonic death of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) homozygous mutants.** *Synapse* 2003; 50:285-92
61. Han L., Picker J.D., Schaevitz L.R., Tsai G., Feng J., Jiang Z., Chu H.C., Basu A.C., Berger-Sweeney J., Coyle J.T.: **Phenotypic characterization of mice heterozygous for a null mutation of glutamate carboxypeptidase II.** *Synapse* 2009; 63:625-35
62. Zhou J., Neale J.H., Pomper M.G., Kozikowski A.P.: **NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:1015-26

63. Zhong C., Zhao X., Van K.C., Bzdega T., Smyth A., Zhou J., Kozikowski A.P., Jiang J., O'Connor W.T., Berman R.F., Neale J.H., Lyeth B.G.: **NAAG peptidase inhibitor increases dialysate NAAG and reduces glutamate, aspartate and GABA levels in the dorsal hippocampus following fluid percussion injury in the rat.** *J Neurochem* 2006; 97:1015-25
64. Yamamoto T., Hirasawa S., Wroblewska B., Grajkowska E., Zhou J., Kozikowski A., Wroblewski J., Neale J.H.: **Antinociceptive effects of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) peptidase inhibitors ZJ-11, ZJ-17 and ZJ-43 in the rat formalin test and in the rat neuropathic pain model.** *Eur J Neurosci* 2004; 20:483-94
65. Yamamoto T., Nozaki-Taguchi N., Sakashita Y., Inagaki T.: **Inhibition of spinal N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase produces an antinociceptive effect in the rat formalin test.** *Neuroscience* 2001; 102:473-9
66. Chen S.R., Wozniak K.M., Slusher B.S., Pan H.L.: **Effect of 2-(phosphono-methyl)-pentanedioic acid on allodynia and afferent ectopic discharges in a rat model of neuropathic pain.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:662-7
67. Strong M.J.: **Amyotrophic lateral sclerosis: contemporary concepts in etiopathogenesis and pharmacotherapy.** *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13:1593-614
68. Ghadge G.D., Slusher B.S., Bodner A., Canto M.D., Wozniak K., Thomas A.G., Rojas C., Tsukamoto T., Majer P., Miller R.J., Monti A.L., Roos R.P.: **Glutamate carboxypeptidase II inhibition protects motor neurons from death in familial amyotrophic lateral sclerosis models.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:9554-9
69. Tsai G., Coyle J.T.: **Glutamatergic mechanisms in schizophrenia.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42:165-79
70. Olszewski R.T., Bukhari N., Zhou J., Kozikowski A.P., Wroblewski J.T., Shamimi-Noori S., Wroblewska B., Bzdega T., Vicini S., Barton F.B., Neale J.H.: **NAAG peptidase inhibition reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR.** *J Neurochem* 2004; 89:876-85
71. Rovenská M., Hlouchová 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; 68:171-82

72. 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.** *Clin Cancer Res* 1997; 3:81-5
73. Wright G.L., Haley C., Beckett M.L., Schellhammer P.F.: **Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues.** *Urol Oncol* 1995; 1:18-28
74. Troyer J.K., Beckett M.L., Wright G.L. Jr.: **Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) in tissue extracts and body fluids.** *Int J Cancer* 1995; 62:552-8
75. Bostwick D.G., Pacelli A., Blute M., Roche P., Murphy G.P.: **Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases.** *Cancer* 1998; 82:2256-61
76. 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; 48:326-34
77. 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 Res* 1997; 57:3629-34
78. Chang S.S., Reuter V.E., Heston W.D., Bander N.H., Grauer L.S., Gaudin P.B.: **Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature.** *Cancer Res* 1999; 59:3192-8
79. Folkman J., Long D.M. Jr., Becker F.F.: **Growth and metastasis of tumor in organ culture.** *Cancer* 1963; 16:453-67
80. Conway R.E., Petrovic N., Li Z., Heston W.D., Wu D., Shapiro L.H.: **Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction.** *Mol Cell Biol* 2006; 26:5310-24
81. Lopes A.D., Davis W.L., Rosenstraus M.J., Uveges A.J., Gilman S.C.: **Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5.** *Cancer Res* 1990; 50:6423-9

82. Troyer J.K., Feng Q., Beckett M.L., Wright G.L.: **Biochemical Characterization and Mapping of the 7E11-C5.3 Epitope of the Prostate-Specific Membrane Antigen.** *Urol Oncol* 1995; 1:29-37
83. Troyer J.K., Beckett M.L., Wright G.L. Jr.: **Location of prostate-specific membrane antigen in the LNCaP prostate carcinoma cell line.** *Prostate* 1997; 30:232-42
84. Meraney A.M., Heston W.D.W.: **Recombinant antibody candidates for the treatment of prostate cancer.** V knize „*Prostate cancer: biology, genetics, and the new therapeutics, 2nd edition*“ (Chung L.W.K., Isaacs W.B., Simons J.W., edit.), Totawa, NJ: Humana Press Inc., 2007, 395-408
85. Smith-Jones P.M., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J., Navarro V., Hunter C.J., Bastidas D., Bander N.H.: **In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Res* 2000; 60:5237-43
86. Smith-Jones P.M., Vallabhajosula S., Navarro V., Bastidas D., Goldsmith S.J., Bander N.H.: **Radiolabeled monoclonal antibodies specific to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen: preclinical studies in nude mice bearing LNCaP human prostate tumor.** *J Nucl Med* 2003; 44:610-7
87. Bander N.H., Trabulsi E.J., Kostakoglu L., Yao D., Vallabhajosula S., Smith-Jones P., Joyce M.A., Milowsky M., Nanus D.M., Goldsmith S.J.: **Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen.** *J Urol* 2003; 170:1717-21
88. Milowsky M.I., Nanus D.M., Kostakoglu L., Sheehan C.E., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J., Ross J.S., Bander N.H.: **Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors.** *J Clin Oncol* 2007; 25:540-7
89. Wang X., Yin L., Rao P., Stein R., Harsch K.M., Lee Z., Heston W.D.: **Targeted treatment of prostate cancer.** *J Cell Biochem* 2007; 102:571-9
90. Foss C.A., Mease R.C., Fan H., Wang Y., Ravert H.T., Dannals R.F., Olszewski R.T., Heston W.D., Kozikowski A.P., Pomper M.G.: **Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: in vivo imaging in experimental models of prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2005; 11:4022-8

91. Chen Y., Dhara S., Banerjee S.R., Byun Y., Pullambhatla M., Mease R.C., Pomper M.G.: **A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390:624-9
92. Bander N.H., Nanus D.M., Milowsky M.I., Kostakoglu L., Vallabahajosula S., Goldsmith S.J.: **Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen.** *Semin Oncol* 2003; 30:667-76
93. Bander N.H., Milowsky M.I., Nanus D.M., Kostakoglu L., Vallabahajosula S., Goldsmith S.J.: **Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer.** *J Clin Oncol* 2005; 23:4591-601
94. Milowsky M.I., Nanus D.M., Kostakoglu L., Vallabahajosula S., Goldsmith S.J., Bander N.H.: **Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer.** *J Clin Oncol* 2004; 22:2522-31
95. Fracasso G., Bellisola G., Cingarlini S., Castelletti D., Prayer-Galetti T., Pagano F., Tridente G., Colombatti M.: **Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen.** *Prostate* 2002; 53:9-23
96. Galsky M.D., Eisenberger M., Moore-Cooper S., Kelly W.K., Slovin S.F., DeLaCruz A., Lee Y., Webb I.J., Scher H.I.: **Phase I trial of the prostate-specific membrane antigen-directed immunoconjugate MLN2704 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer.** *J Clin Oncol* 2008; 26:2147-54
97. Ma D., Hopf C.E., Malewicz A.D., Donovan G.P., Senter P.D., Goeckeler W.F., Maddon P.J., Olson W.C.: **Potent antitumor activity of an auristatin-conjugated, fully human monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen.** *Clin Cancer Res* 2006; 12:2591-6
98. Lupold S.E., Hicke B.J., Lin Y., Coffey D.S.: **Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Res* 2002; 62:4029-33
99. Chu T.C., Marks J.W. III, Lavery L.A., Faulkner S., Rosenblum M.G., Ellington A.D., Levy M.: **Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells.** *Cancer Res* 2006; 66:5989-92
100. Gong M.C., Latouche J.B., Krause A., Heston W.D., Bander N.H., Sadelain M.: **Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate**

cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia* 1999; 1:123-7

101. Tjoa B.A., Simmons S.J., Bowes V.A., Ragde H., Rogers M., Elgamal A., Kenny G.M., Cobb O.E., Ireton R.C., Troychak M.J., Salgaller M.L., Boynton A.L., Murphy G.P.: **Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides.** *Prostate* 1998; 36:39-44
102. Fitch W.M.: **Homology a personal view on some of the problems.** *Trends Genet* 2000; 16:227-31
103. 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.** *J Neurochem* 1997; 69:2270-7
104. 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.** *Mamm Genome* 2001; 12:117-23
105. Halsted C.H., Ling E.H., Luthi-Carter R., Villanueva J.A., Gardner J.M., Coyle J.T.: **Folypoly-gamma-glutamate carboxypeptidase from pig jejunum. Molecular characterization and relation to glutamate carboxypeptidase II.** *J Biol Chem* 1998; 273:20417-24 (Erratum in: *J Biol Chem* 2000; 275:30746)
106. Shafizadeh T.B., Halsted C.H.J.: **Gamma-glutamyl hydrolase, not glutamate carboxypeptidase II, hydrolyzes dietary folate in rat small intestine.** *Nutr* 2007; 137:1149-53
107. Tykvart J.: **One-step purification of recombinant glutamate carboxypeptidase II and its homolog.** Diplomová práce PřF UK Praha (2009), katedra biochemie, str. 56-67
108. Bradford M.M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976; 72:248-54
109. Roach M.C., Harmony M.D.: **Determination of amino acids at subfemtomole levels by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection.** *Anal Chem* 1987; 59:411-5
110. Knedlík T.: **Myší glutamátcarboxypeptidasa II: klonování, exprese a aktivita.** Bakalářská práce PřF UK Praha (2008), katedra biochemie, str. 36-40

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka