

## ZÁVĚR

Nedávno publikované krystalové struktury GCPII poskytly náhled do organizace vazebné kapsy pro substrát a odhalily několik aminokyselin, které se podílejí na vazbě substrátu/inhibitoru v S1' místě enzymu. Abychom doplnili a rozšířili strukturální studie, vytvořili jsme QM/MM model GCPII v komplexu se substrátem, N-acetyl-aspartyl-glutamátem (NAAG). To nám umožnilo předpovědět další aminokyseliny důležité pro vazbu substrátu. Využili jsme místně specifické mutagenese, abychom odhalili vliv těchto jednotlivých aminokyselin na vazbu substrátu/inhibitoru a na enzymovou aktivitu GCPII.

Počítačový model komplexu GCPII/NAAG společně s výsledky z místně specifické mutagenese, ukazuje že aminokyseliny v S1' místě (vázájící glutarát) jsou nezbytné pro vysokou afinitu substrátu nebo inhibitoru, zatímco, zbytky v S1 místě jsou více důležité při přeměně substrátu a mohly by hrát nějakou roli v katalytickém mechanismu enzymu.

Přestože QM/MM model nám umožnil předpovědět strukturu a interakce mezi substrátem a enzymem v S1 místě, komplexní popis reakčního mechanismu GCPII je zatím mimo rámec našich možností.

V blízké budoucnosti bychom se rádi dozvěděli více informací o katalytickém mechanismu GCPII. Chceme se zaměřit na Glu424, který je situován v bezprostřední blízkosti zinků v aktivním místě a s největší pravděpodobností se přímo účastní katalýzy. Mutace této aminokyseliny by nám mohla ukázat její roli v enzymovém mechanismu, navíc můžeme získat krystalovou strukturu GCPII s nerozštěpeným substrátem N-acetyl-aspartyl-glutamátem.

Lidskou GCPII tvoří 750 aminokyselin a předpokládalo se, že její struktura se skládá ze šesti individuálních domén. Analyzovali jsme příspěvek těchto předpovězených domén na strukturu a funkci rekombinantní lidské GCPII.

Připravili jsme 13 mutantů GCPII, zkrácených nebo prodloužených z C- nebo N-konce. Sledovali jsme jejich produkci v hmyzích buňkách a změřili jejich hydrolytickou aktivitu. Zjistili jsme, že změny na C- i N-konci naruší hydrolytickou aktivitu a také negativně ovlivní správné sbalení GCPII.

Tuto studii jsme započali v době kdy ještě nebyly k dispozici krystalové struktury GCPII. Nyní je již známo, že extracelulární doména GCPII se skládá ze tří částí, které tvoří velmi kompaktní strukturu (fold) a všechny tři tyto části tvoří aktivní místo enzymu. Proto je změna na obou koncích tak letální pro enzymovou aktivitu a správné sbalení proteinu.

Získali jsme krystalové struktury lidské GCPII v komplexu s 2-(fosfonomethyl)pentandiovou kyselinou, kviskvalovou kyselinou a L-serin *O*-sulfátem, což jsou mimetika/deriváty glutamátu. Přestože se tyto inhibitory mezi sebou strukturně liší, všechny se váží velice podobně do S1' podmísta GCPII a jsou zde stabilizovány kombinací polárních a van der Waalových interakcí. Zdá se že S1' místo se při vazbě různých substrátů přeskupuje, aby interakce mezi substrátem a inhibitorem byly účinnější.

Prezentované struktury, společně s dostupnými biochemickými daty, ukazují flexibilitu S1' podmísta GCPII a potvrzují strukturní rysy nutné pro účinný inhibitor GCPII.

Naše data lze použít pro vývoj nových inhibitorů GCPII s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi a tím pádem lepší účinností proti GCPII.

Pokusy s GCPII knokautovanými myši ukázaly, že v mozku se vyskytuje další enzym s NAAG-hydrolytickou aktivitou. Předpokládali jsme, že se jedná o GCPIII, blízký homolog GCPII, ten by mohl zastoupit aktivitu GCPII v těchto knokautech.

Připravili jsme rekombinantní GCPIII a ukázali, že její aktivita je závislá na N-glykosylaci, je citlivá k několika známým inhibitorům GCPII, které jí efektivně inhibují. V porovnání s GCPII má poněkud nižší schopnost štěpit NAAG, jinou pH závislost a trochu jinou substrátovou specifitu.

Věříme, že aktivita GCPIII je natolik význačná, že dokáže nahradit GCPII v knokautovaných myších. Naše výsledky mohou pomoci při vývoji účinných a selektivních inhibitorů obou enzymů.

Proč má ovšem mozek dva podobné proteiny se stejnou enzymovou aktivitou? Odpověď je, že vlastně nevíme. Možné vysvětlení je, že GCPII a GCPIII mají různou biologickou roli. Jedním z našich cílů je najít interakčního partnera GCPIII a vyjasnit její biologickou roli v mozku.

Pouze omezené a kontroverzní data jsou publikované o lokalizaci a expresi GCPII v lidském mozku. Proto jsme se rozhodli systematicky analyzovat expresi GCPII v lidském mozku pomocí imunodetekce. Použili jsme novou protilátku GCP-04, která rozpoznává extracelulární část GCPII a je citlivější ke GCPII než k homolognímu proteinu GCPIII. Ukázali jsme také, že je citlivější než komerčně používaná protilátka 7E11.

Nalezli jsme expresi GCPII ve všech studovaných částech mozku, převážně v astrocytech bílé hmoty. Naše publikovaná data jsou jen odrazovým můstkem pro dalších studie zabývající se rolí GCPII v lidském mozku.

Je obecně známo, že GCPII je exprimována v prostatě a ve vyšších koncentracích během rakoviny prostaty. Analogicky jsme ukázali, že GCPII je produkována astrocyty a rádi bychom prozkoumali možnost její exprese v nádorech mozku, hlavně v astrocytomech.

V benigní prostatě je mRNA PSM' produkována ve vyšší koncentraci než mRNA GCPII. Zajímavé je, že při rakovině prostaty je tomu naopak. Velmi omezené informace jsou k dispozici o proteinu PSM', zkrácené formy GCPII. My jsme se zaměřili na studium původu proteinu PSM' a jeho „putování“ v buňce.

Naše pokusy ukázaly, že PSM' je proteolyticky aktivní N-glykosylovaný protein. Kupodivu to není produkt alternativního sestřihu mRNA GCPII, což je obecně uznávaná skutečnost. Předpokládali jsme, že se může jednat o produkt posttranslačního štěpení GCPII během internalizace a endocytózy do buňky, ale ani tuto hypotézu jsme nepotvrdili. Můžeme jen spekulovat, že PSM' vzniká během cesty Golgiho aparátem a je přemístěna neznámým mechanismem do cytosolu buňky.

Přestože pravý původ PSM' je stále neznámý, naše výsledky mohou zlepšit informace o metabolismu GCPII a jejího chování v buňce, stejně jako naše obecné znalosti o putování N-glykosylovaných cytosolárních proteinů v buňce.