

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie



**Exprese a charakterizace
rekombinantního homologu
glutamátkarboxypeptidasy II**

Jan Tykvart

Bakalářská práce

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

Praha 2007

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

V Praze dne 7. 6. 2007

Jan Tyšvář

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za přijetí do své laboratorní skupiny a za rady a připomínky týkající se této práce. Rád bych také poděkoval Mgr. Pavlu Šáchovi, který mě s laskavostí a trpělivostí sobě vlastní provedl přes všechna zákoutí a skryté nástrahy, kterým jsem při jeden a půl letém řešení této práce musel čelit. Neméně velký dík si zaslouží všichni členové naší laboratoře za vytvoření inspirujícího a příjemného (nejen pracovního) prostředí.

Děkuji také Janě Starkové za pomoc při práci s hmyzími a bakteriálními buňkami, RNDr. Pavle Angelisové za přípravu polyklonální a monoklonálních protilátek a Dr. Jürgenu Felsbergovi, CSc. za provedení sekvenace DNA.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a všem svým „nevědeckým“ přátelům, za jejich lásku a podporu, bez nichž by tato práce jen těžko vznikla.

Práce byla provedena za finanční podpory MŠMT ČR (grant 1M0508) a Gilead Sciences and IOCB Research Center, ÚOCHB AV ČR.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Obecný úvod.....	1
1.2. Cíl práce.....	2
1.2.1. Teoretická část	2
1.2.2. Praktická část	2
2. Teoretická část	3
2.1. Glutamátcarboxypeptidasa II	3
2.1.1. Historie studia GCPII.....	3
2.1.2. Funkce GCPII v lidském těle.....	4
2.1.3. GCPII jako multifunkční enzym.....	5
2.2. Lidské homology glutamátcarboxypeptidasy II	6
2.2.1. Obecný úvod k lidským homologům GCPII	6
2.2.2. GCPII a její lidské homology na úrovni DNA	7
2.2.2.1. Umístění genů v lidském genomu	7
2.2.2.2. Exon-intronová struktura	7
2.2.2.3. Promotory a enhancery	9
2.2.2.4. Srovnání nukleotidové sekvence cDNA	10
2.2.3. GCPII a její lidské homology na úrovni RNA.....	10
2.2.3.1. Transkripce mRNA v různých lidských tkáních.....	10
2.2.3.2. Alternativní sestřih mRNA.....	14
2.2.4. GCPII a její lidské homology na úrovni proteinu.....	15
2.2.4.1. Struktura GCPII a jejích lidských homologů.....	15
2.2.4.2. Porovnání aminokyselinové sekvence	17
2.2.4.3. Enzymová aktivita	20
2.2.4.4. Inhibitory	21
2.2.4.5. Exprese v lidských tkáních	22
3. Praktická část.....	24
3.1. Materiály.....	24
3.1.1. Chemikálie	24
3.1.2. Oligonukleotidy	26

3.1.3. Restrikční endonukleasy a pufry.....	26
3.1.4. Kmeny savčích buněk, bakterií, média a plazmidy	26
3.1.5. Ostatní.....	27
3.1.6. Přístroje.....	28
3.2. Metody	29
3.2.1. PCR (polymerasová řetězová reakce).....	29
3.2.2. Horizontální agarosová elektroforéza.....	29
3.2.3. Izolace DNA z agarosového gelu (Peqlab).....	30
3.2.4. Ligace DNA.....	30
3.2.5. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas.....	31
3.2.6. Transformace bakterií <i>E. coli</i>	31
3.2.7. Minipreparace plazmidové DNA z bakterií.....	32
3.2.8. Maxipreparace plazmidové DNA z bakterií	33
3.2.9. Nadprodukce rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i> (kmen BL21 RIL).....	34
3.2.10. Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	35
3.2.11. Detekce proteinů z SDS-PAGE metodou barvení stříbrem.....	36
3.2.12. Purifikace HisNAALADasyL(28-740) na Ni-NTA kolonce.....	37
3.2.13. Metoda imunochemické detekce proteinů po přenosu na membránu (WESTERN BLOT)	38
3.2.14. Počítání buněk.....	40
3.2.15. Transfekce hmyzích buněk <i>Drosophila melanogaster</i> (S2 buněk) a generace stabilní buněčné linie	40
3.2.16. Měření množství proteinu ve vzorku podle Bradfordové.....	41
3.2.17. Dialýza.....	41
3.3. Výsledky.....	42
3.3.1. Příprava plazmidu kódujícího HisNAALADasuL(28-740) metodou molekulárního klonování	42
3.3.2. Produkce HisNAALADasyL(28-740) v <i>E. coli</i>	45
3.3.3. Purifikace HisNAALADasyL(28-740) na Ni-NTA agarose	46
3.3.4. Imunizace myši rekombinantním proteinem HisNAALADasaL(28-740)	47
3.3.5. Určení specifity a citlivosti polyklonální a monoklonálních protilátek proti HisNAALADaseL(28-740)	47

3.3.5.1. Charakterizace polyklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740) .	47
3.3.5.2. Příprava monoklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740).....	48
3.3.5.3. Charakterizace monoklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740)	49
4. Diskuze.....	51
5. Závěr	54
6. Seznam zkratk.....	55
7. Literatura	57

1. Úvod

1.1. Obecný úvod

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, E.C. 3.4.17.21) je transmembránový glykoprotein II. typu. Skládá se z krátké N-koncové intracelulární části, transmembránové části a dlouhé C-koncové extracelulární části. Patří do rodiny metalopeptidas M28 podle database MEROPS [1]. Pro tuto rodinu peptidas je charakteristická přítomnost dvou katalytických iontů zinku, které jsou ve struktuře proteinu vázány koordinačně-kovalentními vazbami na zbytky His, Glu a Cys. Jak již z názvu proteinu vyplývá, GCPII patří mezi exopeptidasy štěpící od C-konce peptidu, případně proteinu.

Do této doby byly objeveny dva přirozené substráty GCPII vyskytující se v lidském organismu. GCPII hraje významnou roli jak při fyziologických dějích, tak při patologických procesech v lidském organismu. Výskyt tohoto proteinu v různých lidských tkáních naznačuje i jeho jinou než pouze enzymatickou funkci. Stále více se v literatuře v souvislosti s GCPII používá termín „multifunkční protein“. Vlastnosti a možné využití tohoto proteinu je zkoumáno odborníky z různých vědeckých oborů (urologie, neurologie, dietologie aj.).

V souvislosti se vzrůstající důležitostí GCPII, se stále více pozornosti zaměřuje i na blízké homology této proteasy. Zkoumá se jejich exprese a možná funkce v lidském organismu. Tento výzkum je zatím ve svých počátcích, ale jeho úspěšný rozvoj může pomoci zodpovědět mnoho otázek související s funkcí a vlastnostmi GCPII.

1.2. Cíl práce

1.2.1. Teoretická část

- Vypracovat rešerši srovnávající geny pro lidské homologní proteiny GCPII, GCPIII a NAALADasyL a jejich expresi v lidských tkáních
- Pomocí informací získaných z volně přístupných internetových databází provést porovnání proteinů GCPII, GCPIII a NAALADasyL na genové i proteinové úrovni

1.2.2. Praktická část

- Metodou molekulárního klonování připravit plazmid kódující extracelulární část NAALADasyL spolu s N-terminální His kotvou (HisNAALADasyL(28-740))
- Vyprodukovat tento protein v bakteriích *Escherichia coli*
- Vyčistit získaný protein na kolonce obsahující Ni-NTA agarosu
- Provést ověření specifity a citlivosti polyklonální a monoklonálních protilátek získaných po imunizaci myši purifikovaným proteinem

2. Teoretická část

2.1. Glutamátcarboxypeptidasa II

2.1.1. Historie studia GCPII

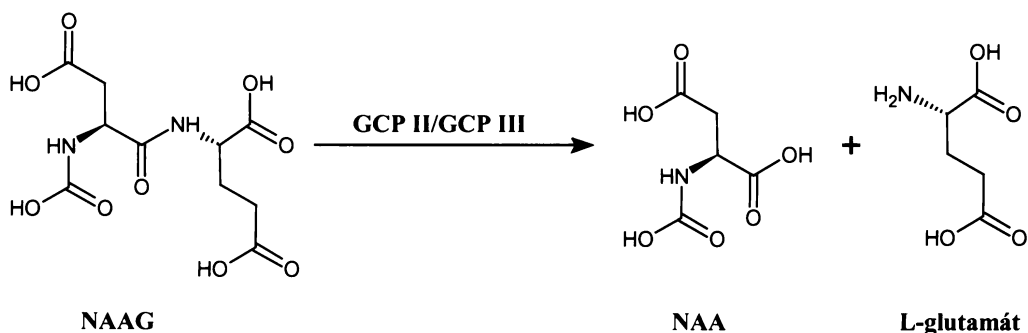
GCPII se řadí k relativně „mladým“ proteinům. Navzdory tomu je její minulost plná zvratů a překvapení. První práce o ní se objevila v roce 1987 [2]. V té době však protein nebyl nazván GCPII, nýbrž NAALADasa. Tento název vycházel z proteolytické aktivity enzymu, jenž štěpil sloučeninu NAAG (N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát) na NAA (N-acetyl-L-aspartát) a L-glutamát, a je odvozen od anglického výrazu N-acetyl-alpha-linked-acidic-dipeptidase. Ve stejném roce publikovali Horoszewicz et al. práci o monoklonální protilátce, kterou získali po imunizování myši buňkami LNCaP (z angl. lymph-node carcinoma of the prostate) [3]. Protilátka byla nazvána 7E11-C5.3 a protein, který specificky rozpoznávala PSMA (z angl. prostate specific membrane antigen). V roce 1991 Halsted et al. objevily nový enzym ve střevech prasete a člověka. Tento enzym odštěpoval L-glutamát s folylpoly- γ -L-glutamátu (kyseliny listové) a byl proto nazván BBFH (z angl. brush-border folate hydrolase), později se začalo více používat označení FOLH (z angl. folate hydrolase) [4]. Několik let probíhal výzkum těchto proteinů naprosto nezávisle. Teprve v roce 1996 se objevily dvě publikace, které se zabývaly příbuzností a podobnými biochemickými vlastnostmi všech tří proteinů [5,6]. Po zveřejnění zmiňovaných prací začalo být o PSMA, NAALADase a FOLH uvažováno jako o jednom a téže proteinu. Tímto sloučením „tří“ proteinů však vznikl názvoslovný problém. Pokus o jeho vyřešení přišel v roce 1998, kdy Luthi-Cater et al. navrhli používat jméno glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) [7]. Tento název byl posléze schválen IUBMB (z angl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Část vědecké společnosti název přijala, ale mnoho urologů stále používá název PSMA a neméně velká část neurobiologů pilně bádá na proteinu zvaném NAALADasa.

V této práci bude používán název schválený a doporučený IUBMB a pouze tam, kde by to narušovalo logickou plynulost a spojitost textu, bude využito některé z dalších jmen GCPII.

2.1.2. Funkce GCPII v lidském těle

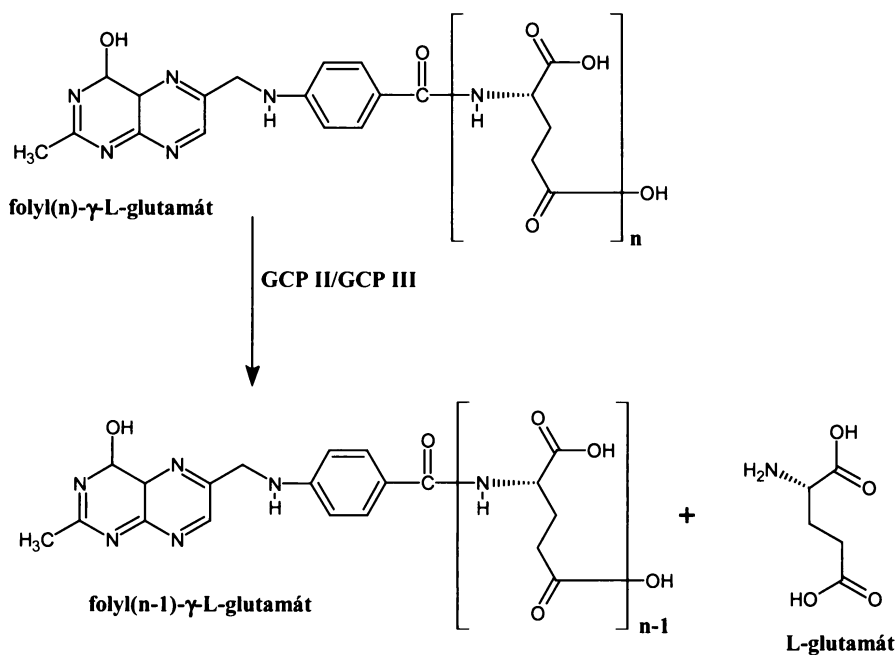
GCPII byla postupem času detekována v různých částech lidského těla. Ve většině z nich však její role není doposud známa. Ve vědecké literatuře lze nalézt mnoho prací zabývajících se expresí GCPII (jak na úrovni mRNA, tak proteinu). Výsledky dosažené různými skupinami se však často liší, což může být způsobeno různými detekčními metodami či rozdílnou přípravou preparátů.

Exprese GCPII v mozkové tkáni byla doposud u člověka prokázána pouze v gliových buňkách – astrocytech [8], kde tato proteasa slouží jako molekula hydrolyzující peptidový neurotransmitter NAAG na NAA a L-glutamát (viz obr. 1) [2]. NAAG selektivně aktivuje metabotropní glutamátový receptor mGluR3 a navíc funguje jako slabý agonista ionotropního glutamátového receptoru NMDA [9,10]. Působí tedy jako tlumivý neurotransmitter. Jeho štěpením vzniká nejrozšířenější excitační neurotransmitter L-glutamát. Z dosavadních pokusů vyplývá, že inhibice GCPII má na zvířecích modelech neuroprotektivní účinky (např. při mozkové mrtvici či amyloτροφické laterální skleróze) [11,12].



Obr. 1: Schéma štěpení NAAGu na NAA a L-glutamát.

V tenkém střevě hraje GCPII důležitou roli při vstřebávání folátu (pteroyl-L-glutamátu známého spíše jako kyselina listová) ze strávené potravy [13]. GCPII je exprimována na apikální straně epiteliálních buněk tenkého střeva [14], kde z pteroylpoly- γ -L-glutamátu, získaného v potravě, postupně odštěpuje koncové L-glutamáty (viz obr. 2, str. 5). Pteroyl-L-glutamát je poté absorbován epiteliálními buňkami a využíván organismem. Podobnou funkci zastává GCPII pravděpodobně i v tubulárních kanálcích ledvin, kde byla také pozorována její exprese [15].



Obr. 2: Schéma znázorňující odštěpení jednoho L-glutamátu z molekuly folylpoly- γ -L-glutamátu. Počet glutamátů navázaných na folát se běžně pohybuje kolem 5-7.

GCPII je silně exprimována v různých druzích nádorových tkání. Především to jsou epiteliální buňky prostaty, kde je její exprese řádově vyšší než v jiných zdravých i nádorových tkáních [5]. I když je exprese tohoto proteinu u karcinomu prostaty zkoumána téměř 20 let, stále se o pravé funkci GCPII při vzniku a vývoji této nemoci můžeme pouze dohadovat [16,17]. Nehledě na neznalost pravé funkce GCPII, je nyní tento protein testován a částečně i využíván jako diganostický a terapeutický marker karcinomu prostaty [18,19]. Expese GCPII byla nedávno objevena v endoteliálních buňkách neovaskulatur nádorů [20]. Přestože vyšlo několik prací zkoumající úlohu GCPII v těchto endoteliálních buňkách [21], její přesná funkce je zatím stále nejasná.

2.1.3. GCPII jako multifunkční enzym

Z předchozích odstavců je patrné, že GCPII nemusí sloužit pouze jako proteasa štěpící NAAG a pteroylpoly- γ -L-glutamát. Její prozatím neobjasněná funkce při nádorových procesech poukazuje na další, dosud neobjevené vlastnosti tohoto proteinu. Schopnost internalizace [22], zvýšení rychlosti internalizace při navázání protilátky s extracelulárním epitopem [23], interakce s aktin vázajícím proteinem filaminem A [24] a sekvenční podobnost s transferinovým receptorem vede k předpokladu, že by GCPII mohla mít receptorovou funkci, či hrát dosud neobjasněnou roli v buněčné signalizaci, případně adhezi [25].

2.2. Lidské homology glutamátcarboxypeptidasy II

2.2.1. Obecný úvod k lidským homologům GCPII

V genomu člověka je lokalizován gen pro glutamátcarboxypeptidasu II (FOLH1) na kratším rameni jedenáctého chromosomu, přesněji v pozici 11p11-p12 [26] (původně byl gen nesprávně lokalizován na delším rameni chromosomu 11 v pozici 11q14 [27]). Krátce po určení správné lokalizace genu FOLH1 se objevili dvě práce popisující jeho delecii u myši. Bacich et al. v roce 2002 publikovali, že ztráta tohoto genu není pro myši embryo letální [28]. Naproti tomu Tsai et al. ve svém článku uvádějí o rok později pravý opak [29]. Tyto vzájemně se vylučující výsledky, i problémy s lokalizací genu pro GCPII, vedly vědce k hledání možných homologů GCPII jak u člověka, tak u jiných živočišných druhů.

V roce 1997 Shneider et al. publikovali objev nové peptidasy nacházející se ve střevní stěně (přesněji v řasinkovém epitelu) potkana a člověka [30]. Protein pojmenovali I100. Získali a osekvenovali celou potkaní a část lidské cDNA kódující I100. Porovnáním nukleotidové sekvence kódující I100 s cDNA kódující potkaní GCPII (tehdy označovanou NAALADasa) a lidskou GCPII (známou jako PSMA) se zjistilo, že jsou si proteiny na úrovni DNA vysoce podobné. Přelomovou prací v oblasti lidských homologů GCPII byla bezesporu práce Pangalos et al. z roku 1999 [31]. Ten se svým týmem izoloval a biochemicky charakterizoval dva lidské homology GCPII. Jeden, již zmíněný protein I100, byl nazván NAALADasa-like (NAALADasaL). Druhý protein byl nazván NAALADasaII (dnes se více používá název GCPIII). Po zveřejnění této práce byla následně získána i myší forma GCPIII [32].

V posledních letech se objevilo několik prací popisujících další homology GCPII. PSMA-like (PSMAL), jehož gen PSMAL se také nachází na chromosomu 11 a vykazuje 98% homologii s genem FOLH1. Tento gen však postrádá část promotoru, celý první exon a část prvního intronu genu FOLH1. Díky tomu by protein vzniklý jeho překladem postrádal N-koncovou část a pravděpodobně by nevykazoval enzymatickou aktivitu [33]. Dále byly nedávno popsány proteiny blood plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP) [34] a NAALADase-like2 (NAALADasaL2) [35].

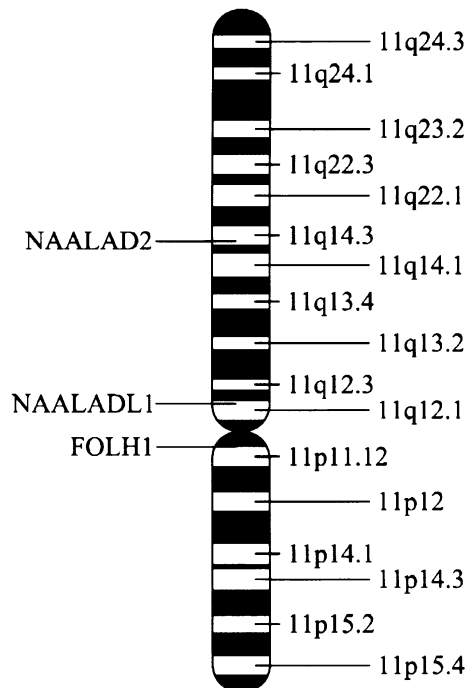
Na genové úrovni vykazuje gen FOLH1 největší homologii s geny PSMAL a NAALAD2. Pokud se však zaměříme více na protein vzniklý z daného genu, jsou dvěma nejbližšími homology GCPII proteiny GCPIII a NAALADasaL. Oba tyto proteiny

obsahují všechny tři proteasové domény určené u GCPII [36]. Mohly by tudíž alespoň teoreticky vykazovat podobnou enzymovou aktivitu jako tato proteasa (v případě GCPIII u „knock-outované“ myši tomu tak pravděpodobně je [28]). V následujících odstavcích budou výrazem „homology“ označovány pouze tyto dva proteiny.

2.2.2. GCPII a její lidské homology na úrovni DNA

2.2.2.1. Umístění genů v lidském genomu

Všechny tři proteiny (GCPII, GCPIII a NAALADasaL) jsou kódovány geny na 11. chromozomu (viz obr. 3) [31]. Názvy proteinů, jim příslušících genů a jejich přístupová čísla v databázi GenBank jsou shrnuty v tab. 1. Přítomnost genů NAALAD2 a NAALADL1 v oblasti 11q12-14 spolu s genem PSMAL (přístupové číslo NP_710163), který je umístěn také v této oblasti a má 98% identitu s GCPII, vedla pravděpodobně k potížím při lokalizaci genu pro GCPII a značné zkřížené reaktivitě právě na tomto úseku chromosomu 11 [26,27].



Obr. 3: Genomová lokalizace lidské GCPII a jejích homologů na chromozomu 11.

Tab. 1: Základní informace o genech kódujících GCPII a její homology.

Název proteinu	Název genu	Přístupové číslo v databázi GenBank	Localizace na chromosomu	Přibližná velikost genu (bp)
GCPII	FOLH1	Q04609	11p11.2	62 000
GCPIII	NAALAD2	Q9Y3Q0	11q14.3	58 000
NAALADasaL	NAALADL1	Q9UQQ1	11q12	14 000

2.2.2.2. Exon-intronová struktura

Gen FOLH1 byl zmapován v roce 1998 [26]. Exon-intronové uspořádání tohoto genu bylo určeno na základě srovnávací analýzy genu a cDNA kódující GCPII pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Začátky a konce intronových sekvencí vymezují GT-AG páry.

Ačkoliv publikace popisující gen FOLH1 vyšla již v roce 1998, neobjevila se doposud ve vědecké literatuře práce charakterizující podobným způsobem geny NAALAD2 a NAALADL1. Proto jsme se rozhodli příslušnou analýzu provést sami. V databázi GeneBank jsme vyhledali příslušné geny, jim příslušící cDNA (geny a jejich přístupová čísla jsou uvedena v tab. 1, str. 7). Provedla se jejich analýza pomocí programu SPIDEY (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>) a určily se přesné polohy a velikosti exonových i intronových částí daných genů. V tab. 2 jsou zobrazeny počty a velikosti exonů, které kódují proteiny GCPII, GCPIII a NAALADasuL. Všechny popsané exony splňují pravidlo GT-AG párů.

Tab. 2: Počet a velikost exonových úseků v genech kódujících proteiny GCPII, GCPIII a NAALADasuL.

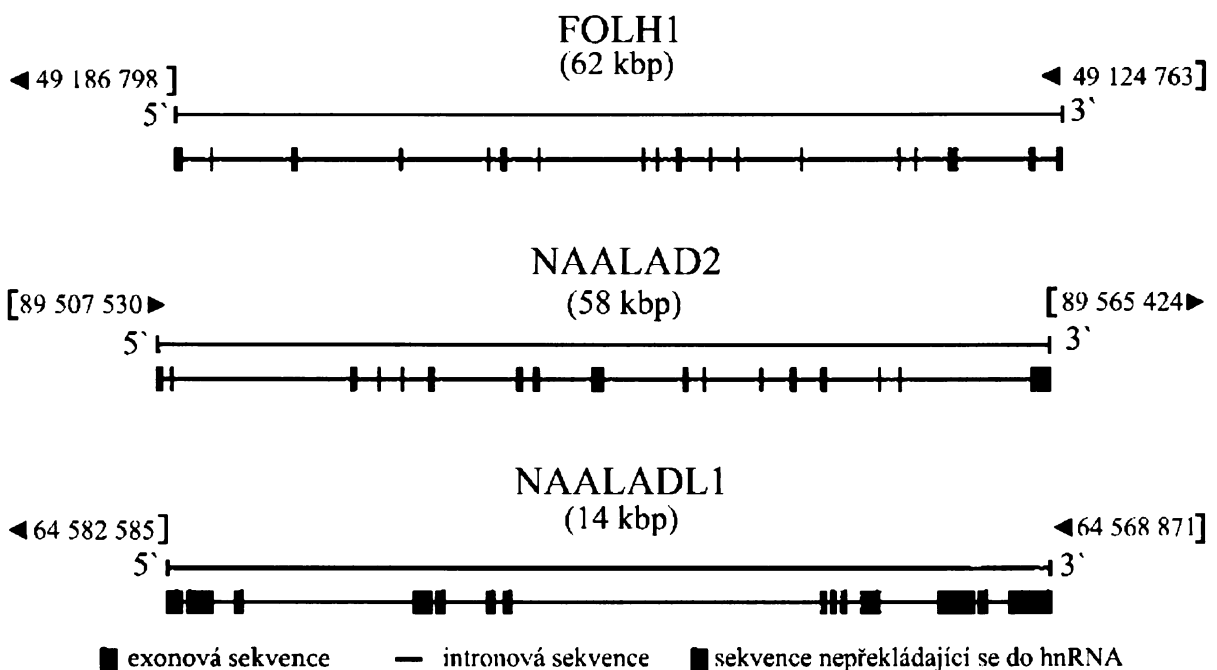
exon	velikost exonového úseku (bp)		
	GCPII	GCPIII	NAALADasuL
1	379	82	201
2	106	112	173
3	187	187	122
4	102	102	123
5	126	126	284
6	187	187	105
7	94	94	86
8	99	99	120
9	86	86	86
10	120	120	64
11	83	83	66
12	64	64	94
13	68	68	91
14	92	92	82
15	91	91	174
16	265	265	88
17	82	82	93
18	93	93	635
19	311	1047	

O'Keefe et al. ve své práci publikovali několik rozdílů mezi genovou sekvencí a sekvencí cDNA [26]. V tab. 3, str. 9 jsou shrnuty rozdíly zjištěné při porovnávání genu NAALAD2 s cDNA kódující GCPIII. Ani jedna ze tří mutací by však neovlivnila případně vzniklý protein, jelikož se ve dvou případech jedná o tiché mutace a v třetím je rozdílnost umístěna až za „stop“ kodonem. Při srovnávání genu NAALADL1 s cDNA NAALADasyL nebyly zjištěny žádné rozdíly.

Tab. 3: Rozdíly v exonové sekvenci mezi genem NAALAD2 a cDNA kódující GCPIII.

Exon	Změna gen-cDNA	Změna aminokyseliny	umístění mutace v cDNA
2	ACG-ACA	tichá mutace (Leu)	111
16	TTG-TTA	tichá mutace (Thr)	1836
19	delece TT	za „stop“ kodonem	2375-6

Na obr. 4 jsou vidět schématická znázornění všech tří genů a jejich exonů. Gen NAALADL1 se od druhých dvou liší především tím, že má 18 exonů na rozdíl od genů FOLH1 a NAALAD2, které jich mají 19 a menší velikostí intronových sekvencí.



Obr. 4: Schématické znázornění genů FOLH1, NAALAD2 a NAALADL1. Čísla na začátcích a koncích sekvence určují polohu genu na chromosomu 11.

2.2.2.3. Promotory a enhancery

Promotor je úsek genomové DNA nacházející se v blízkém okolí počátku transkripce DNA a slouží k započetí, případně urychlení frekvence transkripce genu, před nímž se vyskytuje. Enhancer je úsek genomové DNA ovlivňující promotor určitého genu. Jeho umístění vzhledem k promotoru není omezeno.

Gen kódující GCPII neobsahuje nejběžnější promotor u eukaryotických organismů TATA box, ale pomocí několika predikčních programů byly zjištěny možné druhy promotorů, které by mohly řídit expresi tohoto proteinu [26,37]. Navíc byl objeven enhancer nazvaný PSME (z angl. prostate specific membrane enhancer), který se nachází

ve třetím intronu samotného genu FOLH1 a je pravděpodobně zodpovědný za zvýšenou expresi GCPII při karcinomu prostaty [38].

Přítomnost, poloha a typ promotorů, respektive enhancerů v genech NAALAD2 a NAALADL1 zatím čeká na své popsání.

2.2.2.4. Srovnání nukleotidové sekvence cDNA

Z porovnání cDNA kódující příslušné proteiny plyne, že GCPIII je na úrovni cDNA více homologní s GCPII, než NAALADasaL s oběma dalšími proteasami (viz tab. 4).

Tab. 4: Hodnoty identity cDNA kódující GCPII, GCPIII a NAALADasaL. (výpočet byl proveden pomocí programu Vector NTI Advanced Software).

	GCPII	GCPIII	NAALADasaL
GCPII	-	70.4%	49.4%
GCPIII	70.4%	-	49.9%
NAALADasaL	49.4%	49.9%	-

2.2.3. GCPII a její lidské homology na úrovni RNA

2.2.3.1. Transkripce mRNA v různých lidských tkáních

Existuje několik možných biochemických metod, jimiž lze stanovit přítomnost specifické mRNA v tkáni. Dvěmi základními jsou Northern blot a metoda využívající polymerasové řetězové reakce (RT-PCR, z angl. reverse transcription polymerase chain reaction). Metoda RT-PCR je obecně citlivnější a má řadu modifikací jako např. nested PCR, seminested PCR či Q(RT)-PCR (quantitative (real time)-PCR). Nejnovější metodou využívanou pro analýzu mRNA jsou tzv. DNA čipy. Při této metodě jsou nasyntetizované oligonukleotidy uchyceny na povrch DNA čipu. Buněčná cDNA je označena a následně umístěna na čip, kde se hybridizují pouze takové cDNA, které jsou komplementární s nasyntetizovanými oligonukleotidy. Touto metodou se dá sledovat exprese mRNA kódující veškeré proteiny v buňce.

První studie zabývající se expresí mRNA kódující GCPII byla publikována v roce 1994 [39]. Tehdy byla mRNA detekována pomocí radioaktivně značené komplementární DNA. Velká exprese byla nalezena v prostatě, menší v mozku, slinných žlázách a tenkém střevě. V roce 1998 provedli Reneberg et al. obdobnou studii, ale za použití techniky RT-PCR. Touto metodou byla přítomnost mRNA kódující GCPII prokázána v již dříve

publikovaných tkáních, ale navíc také ve varlatech, srdci, plicích, ledvinách, slezině a štítné žláze [40].

Expresí mRNA kódující protein NAALADasaL byla popsána ve dvou publikacích. Shneider et al. použili techniku radioaktivně značené protilátky [30] a Pangalos et al. využili metody RT-PCR [31]. Zatímco v prvním publikaci byla detekována mRNA pouze v dolní části tenkého střeva (ileu), v druhé byla mRNA detekována ve více druzích tkání.

Pangalos et al. navíc jako jediní publikovali podobnou studii i s mRNA kódující GCPIII. Metodou radioaktivně značené komplemetární DNA detekovali mRNA ve varleti, vaječnicích a prostatě. Použitím RT-PCR získali po 35 cyklech pozitivní výsledek u velkého počtu tkání. Výsledky jimi publikované jsou shrnuty v tab. 5.

Tab. 5: Expresí mRNA kódující GCPII, GCPIII a NAALADasaL v různých lidských tkáních stanovená metodou RT-PCR. Symboly : - ... žádná produkce; + ... mírná produkce; ++ ... dobře viditelná produkce; +++ ... velická produkce. Převzato z [31].

	počet cyklů RT-PCR	mozek	srdce	plice	játra	ledviny	slinivka břišní	tenké střevo	tlusté střevo	slezina	prostata	varle	vaječnky	placenta	krev	kosterní svalstvo	brzlík
GCPII	25	-	-	-	+	+	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-
GCPIII	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAALADasaL	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCPII	30	+	-	-	++	++	-	++	+	+	+++	+	+	-	-	-	-
GCPIII	30	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-
NAALADasaL	30	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
GCPII	35	+++	+	+	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	-	+	+
GCPIII	35	++	++	+	++	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+	+	+
NAALADasaL	35	-	+	+	+	+	+	+++	++	+++	++	+++	++	+	++	-	+

Jelikož primery použité při RT-PCR obsahovaly 25-30 bazí, je možnost zkřížené reaktivity mezi různými mRNA značně malá, i když při vyšších počtech cyklů ji nelze úplně vyloučit. Na agarosových gelech je v případě GCPII a GCPIII vidět vždy jen jeden získaný produkt (až na dvojpruh viditelný po 35 cyklech u GCPII ve slinivce břišní). Naproti tomu u NAALADasyL jsou všechny produkty získané RT-PCR ve třech různých dlouhých formách, což může ukazovat buď na různé sestřihové varianty mRNA nebo na malou specifitu primerů.

Druhá možnost, jak porovnat expresi mRNA kódující GCPII, GCPIII a NAALADasuL spočívá v použití ESTs (z angl. Expressed Sequence Tags). ESTs jsou krátké (400-600 bází) osekvenované části cDNA. Samotná metoda vykazuje relativně veliké procento chyb (přibližně 2%) a spočívá v převedení veškeré mRNA z dané tkáně na cDNA. Tyto cDNA jsou poté klonovány do plazmidu a sekvenovány pouze jedním primerem. Díky použití pouze jednoho primeru je tato metoda relativně levná a v dnešní době z větší části automatizovaná. Příslušné sekvence cDNA se shromažďují v databázi UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) a slouží k různým účelům. Mimo jiné umožňuje tato databáze zobrazit počet ESTs, které odpovídají cDNA pro daný protein. Toto číslo porovnané s celkovým počtem osekvenovaných ESTs z určité tkáně udává relativní četnost přepisu genu pro daný protein a navíc umožní předpovědět v jaké tkáni se dá exprese tohoto proteinu očekávat. Databáze UniGene však nabízí mnohem více funkcí, než pouhé porovnání exprese mRNA (shrnutí v [41]). V tab. 6 jsou uvedena porovnání počtu ESTs pro GCPII, GCPIII a NAALADasuL v závislosti na typu tkáně, zdravotním stavu a vývojovém stádiu člověka.

Tab. 6: Porovnání exprese mRNA kódující GCPII, GCPIII a NAALADasuL u člověka pomocí ESTs. Data jsou převzata z databáze UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). U názvu proteinu je v závorce vždy uvedeno kódové označení daného proteinu v databázi UniGene. Data byla aktuální ke dni 24.4.2007.

Rozdělení podle typu tkáně	GCPII (Hs.654487)		GCPIII (Hs.503560)		NAALADasuL (Hs.13967)	
tuková tkáň	0	0 / 12777	0	0 / 12777	78	1 / 12777
nadledviny	0	0 / 32215	0	0 / 32215	0	0 / 32215
ascit	0	0 / 40022	0	0 / 40022	0	0 / 40022
močový měchýř	0	0 / 29175	0	0 / 29175	0	0 / 29175
krev	0	0 / 119874	0	0 / 119874	16	2 / 119874
kost	13	1 / 71667	13	1 / 71667	0	0 / 71667
kostní dřev	0	0 / 47392	0	0 / 47392	21	1 / 47392
mozek	72	65 / 890811	16	15 / 890811	3	3 / 890811
pochva	0	0 / 47558	0	0 / 47558	42	2 / 47558
hlemýžď (vnitřní ucho)	0	0 / 16098	62	1 / 16098	0	0 / 16098
tlusté střevo	5	1 / 181250	5	1 / 181250	11	2 / 181250
pojivová tkáň	13	2 / 145437	6	1 / 145437	0	0 / 145437
hlavový nerv	0	0 / 18109	0	0 / 18109	55	1 / 18109
embryonální tkáň	0	0 / 194985	30	6 / 194985	0	0 / 194985
jícen	0	0 / 18916	0	0 / 18916	0	0 / 18916
oko	0	0 / 199696	10	2 / 199696	45	9 / 199696
srdce	0	0 / 87149	0	0 / 87149	0	0 / 87149
ledvina	38	8 / 206123	0	0 / 206123	14	3 / 206123
hrtan	0	0 / 24256	0	0 / 24256	0	0 / 24256

Rozdělení podle typu tkáně	GCPII (Hs.654487)	GCPIII (Hs.503560)	NAALADasaL (Hs.13967)
játra	15 ● 3 / 197800	5 ● 1 / 197800	0 0 / 197800
plice	0 0 / 333931	0 0 / 333931	11 ● 4 / 333931
lymfatická tekutina	0 0 / 44428	0 0 / 44428	0 0 / 44428
lymfatická uzlina	0 0 / 90609	0 0 / 90609	11 ● 1 / 90609
prsni žláza	6 1 / 151863	0 0 / 151863	0 0 / 151863
ústa	15 ● 1 / 62897	0 0 / 62897	0 0 / 62897
sval	18 ● 2 / 106514	9 ● 1 / 106514	0 0 / 106514
periferní nervová tkáň	191 ● 3 / 15645	0 0 / 15645	63 ● 1 / 15645
vaječníky	9 ● 1 / 101128	0 0 / 101128	9 ● 1 / 101128
slinivka břišní	0 0 / 214089	0 0 / 214089	0 0 / 214089
příštitná tělíska	0 0 / 20554	0 0 / 20554	0 0 / 20554
hltn	0 0 / 41803	0 0 / 41803	23 ● 1 / 41803
hypofýza	0 0 / 16586	301 ● 5 / 16586	0 0 / 16586
placenta	0 0 / 281155	7 ● 2 / 281155	0 0 / 281155
prostata	184 ● 35 / 189548	26 ● 5 / 189548	21 ● 4 / 189548
slinné žlázy	49 ● 1 / 20254	0 0 / 20254	0 0 / 20254
kůže	0 0 / 186159	0 0 / 186159	0 0 / 186159
tenké střevo	0 0 / 43311	0 0 / 43311	46 ● 2 / 43311
slezina	138 ● 7 / 50510	19 ● 1 / 50510	0 0 / 50510
žaludek	0 0 / 95320	0 0 / 95320	0 0 / 95320
varle	0 0 / 337730	56 ● 19 / 337730	2 1 / 337730
brzlík	0 0 / 74105	0 0 / 74105	0 0 / 74105
štítná žláza	0 0 / 47348	0 0 / 47348	0 0 / 47348
mandle	0 0 / 17026	0 0 / 17026	58 ● 1 / 17026
průdušnice	0 0 / 46887	0 0 / 46887	0 0 / 46887
pupeční šňůra	0 0 / 13515	0 0 / 13515	0 0 / 13515
děloha	21 ● 5 / 228444	4 ● 1 / 228444	4 ● 1 / 228444
cévy	0 0 / 49597	0 0 / 49597	20 ● 1 / 49597
celé tělo	0 0 / 43023	0 0 / 43023	46 ● 2 / 43023
celý mozek	37 ● 5 / 133484	22 ● 3 / 133484	0 0 / 133484

Rozdělení podle zdravotního stavu	GCPII (Hs.654487)	GCPIII (Hs.503560)	NAALADasaL (Hs.13967)
nádor nadledvin	0 0 / 12703	0 0 / 12703	0 0 / 12703
nádor kosti	0 0 / 99675	10 ● 1 / 99675	0 0 / 99675
nádor prsu	10 ● 1 / 93020	0 0 / 93020	0 0 / 93020
nádor děložního krčku	0 0 / 33938	0 0 / 33938	0 0 / 33938
nádor tlustého střeva	8 1 / 112359	8 1 / 112359	0 0 / 112359
nádor jícnu	0 0 / 16386	0 0 / 16386	0 0 / 16386
nádor zažívacího traktu	0 0 / 119030	0 0 / 119030	0 0 / 119030
nádor zárodečných buněk	0 0 / 254527	19 ● 5 / 254527	0 0 / 254527
nádor gliových buněk	37 ● 4 / 106450	0 0 / 106450	0 0 / 106450
nádor hlavy a krku	7 1 / 133267	0 0 / 133267	0 0 / 133267
nádor ledvin	44 ● 3 / 67205	0 0 / 67205	0 0 / 67205
leukémie	0 0 / 93575	0 0 / 93575	0 0 / 93575
nádor jater	11 ● 1 / 88101	11 ● 1 / 88101	0 0 / 88101
nádor lymfatických uzlin	0 0 / 72121	0 0 / 72121	0 0 / 72121
mozkový nádor negliového původu	0 0 / 128043	7 ● 1 / 128043	0 0 / 128043
nenádorová tkáň	77 ● 7 / 90133	0 0 / 90133	0 0 / 90133
zdravá tkáň	22 ● 72 / 3231433	18 ● 60 / 3231433	12 ● 41 / 3231433
nádor vaječníku	13 ● 1 / 76097	0 0 / 76097	13 ● 1 / 76097
nádor slinivky břišní	0 0 / 104989	0 0 / 104989	0 0 / 104989
nádor prostaty	270 ● 30 / 111050	0 0 / 111050	0 0 / 111050
nádor dýchacího traktu	0 0 / 103597	0 0 / 103597	0 0 / 103597
retinoblastom	0 0 / 46485	0 0 / 46485	0 0 / 46485
nádor kůže	0 0 / 124880	0 0 / 124880	0 0 / 124880
nádor pojivových tkání a svalů	15 ● 2 / 125478	7 ● 1 / 125478	0 0 / 125478
nádor močového měchýře	0 0 / 26381	0 0 / 26381	0 0 / 26381
nádor dělohy	33 ● 3 / 90251	0 0 / 90251	0 0 / 90251

Rozdělení podle vývojového stádia	GCPII (Hs.654487)	GCPIII (Hs.503560)	NAALADasaL (Hs.13967)
embryo	0 0 / 179566	27 ● 5 / 179566	11 ● 2 / 179566
embryoid	0 0 / 70535	14 ● 1 / 70535	0 0 / 70535
plod	9 ● 5 / 553710	23 ● 13 / 553710	9 ● 5 / 553710
novorozeně (mladší než 4 týdny)	0 0 / 26593	0 0 / 26593	0 0 / 26593
kojenec (mladší než 3 roky)	0 0 / 21845	0 0 / 21845	0 0 / 21845
adolescent (mladší než 17 let)	0 0 / 53891	18 ● 1 / 53891	18 ● 1 / 53891
dospělý (17 let a starší)	26 ● 50 / 1909841	9 ● 18 / 1909841	5 ● 10 / 1909841

Legenda :

nervová tkáň	191 ● 3 / 15645
vaječníky	9 ● 1 / 101128

počet transkriptů na 1 milión (TPM) intenzita tečky úměrná TPM počet EST daného genu celkový počet EST v dané tkáni

2.2.3.2. Alternativní sestřih mRNA

Bylo prokázáno, že existují nejméně tři různé formy mRNA vzniklé alternativním sestřihem, které kodují GCPII [42,43]. Jejich označení a velikosti jsou shrnuty v tab. 7. Nejzajímavější se zdá být zkrácená forma PSM', která se vyskytuje v epiteliálních buňkách prostaty a její poměr k nezkrácené formě PSMA byl označen termínem „tumor index“ a slouží ke stanovení stupně dediferenciace a agresivity karcinomu prostaty [42,43].

Tab. 7: Různé formy mRNA kódující GCPII.

Označení formy mRNA	Velikost řetězce (bp)	Velikost a poloha "vystřížené" části řetězce (bp)
PSMA (GCPII)	2653	-
PSM'	2387	114-380 (266)
PSM-C	2520	247-380 (133)
PSM-D	2488	215-380 (165)

Ve všech třech případech alternativních sestřihů mRNA pro GCPII je vyštěpen „start“ kodon ATG (poloha 262-264), a tudíž, pokud dochází k translaci sestřizovaných forem, bude začínat až na dalším „start“ kodonu ATG (poloha 433-435). Toto přesunutí „start“ kodonu by mělo za následek ztrátu jak intracelulární, tak transmembránové části proteinu a daný transkript by byl pravděpodobně cytosolický protein.

Do této doby nebyly publikovány žádné informace o možných alternativních formách GCPIII. Oproti tomu Pangalos et al. ukazují několik delecí a inzercí, které objevili při amplifikačních reakcích s cDNA kódující NAALADasaL (viz tab. 8, str. 15) [31].

Tab. 8: Inzerce a delece pozorované při amplifikačních reakcích s mRNA kódující NAALADasuL. U delece označují čísla polohu začátku a konce vložené sekvence bází ve změněné mRNA, u inzerce označují číslo báze, za kterou je vložena nová sekvence bází. Jako báze číslo 1 je označen adenin ve “start” kodonu. AMK-aminokyselin. Převzato a upraveno z [31].

typ a pořadí změny	poloha změny	změna čtecího rámce (velikost výsledného proteinu)
delece 1	497-619	ne (699 AMK)
delece 2	903-1007	ne (705 AMK)
delece 3	1525-1615	ano (522 AMK)
delece 4	1525-1697	ano (544 AMK)
inzerce 1	1094	ne (791 AMK)
inzerce 2	1697	ano (578 AMK)
inzerce 3	1870	ano (645 AMK)

Podobně jako mRNA kódující GCPII obsahuje další „start“ kodon, od kterého začíná translace zkrácené formy, má mRNA kódující GCPIII i NAALADasuL ve své sekvenci několik možných „start“ kodonů, od kterých by mohla začít transkripce případné zkrácené formy mRNA.

Na závěr tohoto oddílu je nutné připomenout, že přítomnost příslušné mRNA ještě nevyovídá o expresi proteinu.

2.2.4. GCPII a její lidské homology na úrovni proteinu

2.2.4.1. Struktura GCPII a jejích lidských homologů

GCPII, GCPIII i NAALADasaL jsou transmembránové proteiny II typu. To znamená, že obsahují velkou extracelulární C-koncovou část a malou intracelulární N-koncovou část. Velikostí jsou si tyto proteiny velice blízké a liší se zejména délkou svých intracelulárních částí (viz tab. 9).

Tab. 9: Základní informace o počtu aminokyselin v molekulách GCPII, GCPIII a NAALADasaL. Data převzata z [8,31,36].

název proteinu	celkový počet aminokyselin	počet aminokyselin v intracelulární / transmembránové / extracelulární části	relativní hmotnost proteinu (kDa)
GCP II	750	19 / 24 / 707	97*
GCP III	740	7 / 24 / 709	95*
NAALADasaL	740	5 / 22 / 713	95*

* značí hmotnost postranlačně modifikované extracelulární části daného proteinu, určenou imunodetekcí po přenosu na membránu

K prvnímu pokusu o popis struktury GCPII došlo v roce 1997 [44]. Autoři článku tehdy využili příbuznosti GCPII s jinými proteasami nižších organismů jejichž struktura již byla známa. Ale teprve rentgeno-strukturní analýza vykrytalované extracelulární části bez substrátu [45,46], se substrátem (NAAG) nebo vysoce účinným inhibitorem (2-PMPA, GPI-18431) [36] vedla k přesnému popsání extracelulární části GCPII. Ta se skládá ze tří domén (proteasové, apikální a C-terminální) (viz obr. 5).



Obr. 5: Struktura extracelulární části GCPII o rozlišení 2.2 Å. Je zde vyznačená homodimerní struktura extracelulární části GCPII (barevně jeden monomer a šedě druhý). Extracelulární domény jsou barevně odlišeny (proteasová - modrá; apikální - žlutá; C-terminální - hnědá); červená kulička – Ca^{2+} ion; zelená kulička – dva atomy Zn^{2+} iontů; žlutá kulička – Cl^- ion. Ve struktuře jsou také vyznačeny cukry připojené N-glykosidickou vazbou k proteinu, které byly v krystalové struktuře rozeznatelné. Převzato z [36].

Krystalová struktura ani jednoho ze dvou homologů GCPII nebyla dosud vyřešena. V roce 2007 byl publikován počítačový model GCPIII vycházející ze známé krystalové struktury GCPII, která je s GCPIII vysoce homologní [47]. Z výsledného modelu vyplývá, že struktura GCPIII je velice podobná struktuře GCPII (viz obr. 6, str. 17). Na úplné potvrzení tohoto předpokladu si však budeme muset počkat do doby, než bude GCPIII vykrytalována a provedena její rentgeno-strukturní analýza.

Model, případně krystalová struktura lidského proteinu NAALADaseL zatím nebyly publikovány.



Obr. 6: Model struktury extracelulární části GCPIII na základě známé struktury GCPII. Struktura GCPII je na obrázku znázorněna šedě a struktura GCPIII červeně. Převzato z [47].

2.2.4.2. Porovnání aminokyselinové sekvence

Isreali et al. jako první v roce 1993 dokázali naklonovat lidskou GCPII [48]. O čtyři roky později byla částečně osekvenována cDNA kódující lidskou NAALADasaL [30] a v roce 1999 Pangalos et al. publikovali celou nukleotidovou sekvenci jak NAALADasyL, tak GCPIII. Pomocí programu GENEDOC provedli porovnání jejich primárních struktur a zjistili sekvenční podobnosti mezi jednotlivými proteiny (viz tab. 10) [31].

Tab. 10: Hodnoty identity / podobnosti proteinů GCPII, GCPIII a NAALADasyL. Převzato z [31].

	GCPII	GCPIII	NAALADasaL
GCPII	-	67% / 87%	35% / 54%
GCPIII	67% / 87%	-	37% / 57%
NAALADasaL	35% / 54%	37% / 57%	-

Pomocí programu Vector NTI Advanced Software jsme provedli porovnání primárních struktur všech tří proteinů. Na základě toho porovnání jsme se pokusili určit aminokyseliny důležité pro enzymatickou aktivitu u proteinů GCPIII a NAALADasyL (viz obr. 7, str. 18).

GCPII (1) MWNLHETDSAVTTRPRWLCAGALILGGFLLGFHWFIKSSNE-ATNITPKH--KAEDE
 GCPIII (1) -----MAEIRRLYLWCLAAAL----FLGFHWFIKPLKE-TTSVRYHSIRWKESE
 NAALADasaL (1) -----MQWTVLGLGLGAAALLG----LGIHGFHFAIPKKANLAPQDLBLEIETGG

GCPII (65) LKAENIKKFLYNETPHLAGTEQNFQLAKQIQQWK--FGLDSVELHYDVLLSYPKTHPNYIS
 GCPIII (55) KAENIKSFLRSETPHLAGTEQNFLLAKKIQQWK--FGLDSAKLVHYDVLLSYPNETANYIS
 NAALADasaL (52) LAHKIENLRETEPHLAGPRBEDLQQLLQWVKPESGLDSAEAITYVLLSPSQEPNVIC

GCPII (130) INEDGNEIFNTSLFEPPPPGEYEVVIVVPPAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMKIINC
 GCPIII (120) IVDEHETEIFKTSYLEPPPDGEYEVVIVVPPYNAFSAQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERMGINIC
 NAALADasaL (119) IVGPTGCIINHSCHRTEENVVTEGEGGPDVQPYAIPSGTPEGLLVYANRAEEDFKELQTAGIKL

GCPII (197) GKIVIARYGKVRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADY---FAPGVKYPDGWNLPGGGVQRGNLNLN
 GCPIII (187) GKIVIARYGKFRGNKVKNAMLAGAIGILYSDPADY---FAPEVOYYPKGWNLPGGAQRGNLNLN
 NAALADasaL (185) GGLIIRYGGVGRGAKAVNAAKHAGVYSDPADINDGLSPDEPNHWYLPPLGVLRG--SY

GCPII (261) LNGAGDPLTPGYPANEAARRAEVIGPSIPVHPIGYDAQKLEKGGAPPDSSWGLKVPY
 GCPIII (251) LNGAGDPLTPGYPAKEYFRDDEEVGPRIPVHPIGYDAEILRLYLGGIAPPDSSWGLALNVSY
 NAALADasaL (250) YFYFGDPLTPYLPVPSFRDDEANSGEPPIPTPIGSDARDLLCNLMGLAP--WQALGCHY

GCPII (328) NGGPFTGN---FSTQKVMHMTNETRIYNVGTIRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGIDPSSG
 GCPIII (318) SGGPFTGS---DSFRKVMHVYNINKTRIYNVGTIRGVEPDRYVILGGHRDSWVFGAIDPSSG
 NAALADasaL (316) RGGPFRPDGDFPDSVVMVSVYNRLEIRSSNVGIIRGAVEPDRYVYGNHRDSWVHGAIDPSSG

GCPII (392) AAVHEIVRSFGLTKKEG-WRPRRTIFASWDAEEFGLLGSTEWAEENS LQERGVAYINQSSIE
 GCPIII (382) VAVLQEIIRSEFGLTKKEG-WRPRRTIFASWDAEEFGLLGSTEWAEENV LQERGVAYINQSSIE
 NAALADasaL (383) TAVLLEIRVGTLLKKGTRPRRIIFASWDAEEFGLLGSTEITEFFNKLQERGVAYINQDISIF

GCPII (458) GNYTLRVDCTPLYSLVNLTKEKSPDGFCEKSLYESWTKS--PSPESGPRISKLCSCNDFE
 GCPIII (448) GNYTLRVDCTPLYSLVNLTKEKSPDGFCEKSLYESWTKD--PSPENKNPRINKLGSNDFE
 NAALADasaL (450) NATLRVGTPLYSVVSATKEISPEPGD--LSYHNVYFNRSSPVGLPSGSLGGSNDA

GCPII (523) VEFQRLGIASGRARYTKNWETNKSGYPIYHYETELVEKFYDPMFKYHLVAQRGGVVELN
 GCPIII (513) AEFQRLGIASGRARYTKNKTKDKSSYPIYHTYETFELVEKFYDPTFKKQLVAQRGGVVELVD
 NAALADasaL (515) PEVHFLGIISMTIAYTYISKTRARYPIYHTATFTYVVKFLDPGFESHQAVARTAGLRLID

GCPII (590) SILPFDRCRDYAVVLRKYANKIYSMKHPQEKTSVVSFDSLFSAVKFEIASKFSERLQDFDKS
 GCPIII (580) SKLPFNQDYAEALNYASIIYSKKHDDQLTDHVSFDSLFSAVKFEIASSDFHKRLIQDLN
 NAALADasaL (582) SFFLPKISDYETLR---FQIAQLGALLEQHSLSGLVAVEKFEAEALGQRSTLKG

GCPII (657) N--PIVRRMMNDQMLLERAFTDPLGLPPIFYRHVIAPSSHNYAGESFPGIYDAFDIESKVDP
 GCPIII (647) N--PIAVRMMNDQMLLERAFTDPLGLPPIFYRHVIAPSSHNYAGESFPGIYDAFDIENKANS
 NAALADasaL (646) SPDPQVRMNDQMLLLERFNPRFPFRYSHVAPRGC---VVFPQSNACSEARDTASG

GCPII (722) SKAWEVKROIYAAFTQAAAETLNEVA--
 GCPIII (712) RLAWKEVKHISIAAFTQAAAETLNEVL--
 NAALADasaL (710) SEAWEVVRQSIYVTAHAAETLNEVADL

Obr. 7: Porovnání aminokyselinové sekvence GCPII, GCPIII a NAALADasyL. Značení: zelená kolečka-AMK v S1 místě; červená kolečka-AMK v S1' místě; modrá kolečka-AMK vázající Zn²⁺; fialové kolečko-katalytická AMK; žluté pozadí-identita všech tří sekvencí; modré pozadí-identita dvou sekvencí ze tří; zelené pozadí-oblast podobnosti; zelená písmena-slabá podobnost AMK; fialová písmena-glykosylační místa. Provnání bylo provedeno v programu Vector NTI Advanced Software - gap opening penalty 10; gap extension penalty 0.05; gap separation penalty range 8.

Speno et al. v roce 1999 metodou bodové mutagenese charakterisovali aktivní místo GCPII [49]. Vyřešené struktury proteinu bez substrátu [45,46] a se substrátem [36] umožnily přesnější zkoumání mechanismu katalytické funkce této proteasy. K enzymové aktivitě jsou zapotřebí aminokyseliny koordinačně vázající dva atomy zinku, vázající L-glutamát v S1 místě a N-acetyl-L-aspartát v S1' místě (popis vazebných míst odpovídá

hydrolytickému štěpení NAAGu) a katalytická aminokyselina účastní se přenosu vodíku mezi substrátem a molekulou vody. V tab. 11 jsou zobrazeny aminokyseliny plnící tuto funkci u GCPII (vyplývá z rentgeno-strukturálních analýz krystalových struktur). Na základě porovnání primárních struktur GCPII, GCPIII a NAALADasyL (viz obr. 7, str. 18) jsou v tabulce zobrazeny možné katalyticky důležité aminokyseliny obou homologů GCPII.

Tab. 11: Změny v aminokyselinách důležitých pro enzymovou aktivitu homologů GCPII. Červeně označené aminokyseliny se neshodují s GCPII. Porovnání struktur GCPII, GCPIII a NAALADasyL bylo provedeno pomocí programu Vector NTI Advanced Software - gap opening penalty 10; gap extension penalty 0.05; gap separation penalty range 8. Značka “-“ znamená nepřirazenou aminokyselinu vzhledem ke GCPII (viz obr. 7, str. 18). Převzato a upraveno z [36].

Funkce aminokyseliny	GCPII	GCPIII	NAALADasyL
Vazba L-Glu (S1 místo)	I386	I376	V377
	D453	D443	D445
	S454	S444	I446
	E457	E447	F449
	R463	R453	R455
	N519	S509	S511
	R534	R524	D526
	R536	R526	A528
	G548	S538	A538
	Y549	Y539	Y539
Vazba NAA (S1' místo)	R210	R200	R198
	N257	N247	-
	Y552	Y542	Y542
	K699	K689	-
	Y700	Y690	-
	F209*	F209*	G197*
	L428*	L418*	L420*
G518*	G508*	G510*	
Katalytická aminokyselina	E424	E434	E416
Ligandy zinku	H377	H367	H368
	D387	D377	D378
	E425	E415	E417
	D453	D443	D445
	H553	H543	H543

*aminokyseliny určené pomocí zatím nepublikovaných dat

Glykosylace patří mezi další vlastnosti proteinu, které určuje primární aminokyselinová sekvence. Jelikož je GCPII transmembránový protein s velikou extracelulární částí, byla u něj existence postranslační modifikace N- či O-glykosylací předpokládána. GCPII obsahuje 10 možných glykosylačních míst (triplet Asp-Xxx-Thr/Ser v aminokyselinové sekvenci, kde Xxx je libovolná aminokyselina kromě prolinu [50]) a všechny jsou postranslačně N-glykosylovány. Tyto postranslační modifikace jsou nutné pro zachování enzymové aktivity proteinu [51]. V tab. 12 jsou uvedena možná

glykosylační místa ve všech třech proteinech. Oba homology obsahují ve své primární struktuře 7 asparaginů, které by mohly být N-glykosidicky modifikovány (viz obr. 7, str. 18). Jejich možná glykosylace nebyla narozdíl od GCPII dosud experimentálně potvrzena.

Tab. 12: Místa možné N-glykosidické modifikace GCPII a jejích homologů.

Pořadí glykosylace	GCPII	GCPIII	NAALADasaL
1	N51	N111	N136
2	N76	N143	N274
3	N121	N185	N299
4	N140	N314	N334
5	N153	N449	N345
6	N195	N603	N451
7	N336	N638	N492
8	N459		
9	N476		
10	N638		

GCPII je schopná internalizace prostřednictvím váčků potažených klatrinem [23]. Za tuto vlastnost je zodpovědný motiv MXXXL v intracelulární oblasti GCPII [22]. Jednalo se o nový internalizační motiv, který do té doby nebyl nalezen u žádného jiného proteinu. Vzhledem k výrazné odlišnosti intracelulárních částí GCPII a jejích homologů se u GCPIII a NAALADasyL tento internalizační motiv nezachoval (viz tab. 13). Zatím nebyla publikována žádná práce dokazující internalizační schopnosti těchto dvou proteinů.

Tab. 13: Porovnání intracelulární aminokyselinové sekvence GCPII a jejích homologů. Internalizační motiv GCPII je vyznačen červeně. Pro popis sekvence jsou použity jednopísmenné zkratky aminokyselin.

Protein	Aminokyselinová sekvence intracelulární části proteinu
GCPII	MW NLLHETDS AVATARRPR
GCPIII	MAESRGR
NAALADasaL	MQWTK

2.2.4.3. Enzymová aktivita

GCPII štěpí v těle se přirozeně vyskytující substráty N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) a folylpoly- γ -L-glutamát [1,5]. Z obou látek odštěpuje C-terminální L-glutamát (viz obr. 1, str. 4 a obr. 2, str. 5). Díky těmto dvěma enzymovým aktivitám dostala GCPII tři ze svých čtyř jmen (NAALADasa, FOLH a GCPII). U GCPIII byla prokázána schopnost hydrolysy NAAGu [31,47] i folylpoly- γ -L-glutamátu (nepublikovaná data z naší laboratoře). GCPIII štěpí oba dva substráty s menší efektivitou než GCPII. U NAALADasyL nebyla zjištěna „naaladasová“ aktivita [30,31] a její „folát hydrolasová“

aktivita zatím nebyla zkoumána. Konstanty charakterizující afinitu a efektivitu štěpení NAAGu GCPII a GCPIII shrnuje tab.14.

Tab. 14: Porovnání účinnosti hydrolysy NAAGu proteiny GCPII a GCPIII. Převzato z [47].

protein	K_M (nmol.L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M ($\cdot 10^{-5}$ L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
GCPII	1 200 ± 500	1.2 ± 0.2	9.3 ± 4.9
GCPIII	370 ± 70	0.11 ± 0.01	3.0 ± 0.6

Poslední enzymová aktivita, která se často spojuje s GCPII, GCPIII a hlavně NAALADasouL je dipeptidyl peptidasová aktivita (označovaná jako DPPIV aktivita, z angl. DPPIV-like activity), což je schopnost odštěpovat dipeptidy z N-konce proteinových substrátů. Tato aktivita byla nejdříve připsána všem třem proteinům [31], ale vzápětí byla u GCPII a GCPIII zpochybněna a nakonec zcela vyvrácena [32,47,52]. DPPIV aktivita NAALADasyL byla testována jak s transfekovanými buňkami [31], tak s čistým proteinem [30], a zatím nebyla publikována práce, která by s těmito výsledky byla v rozporu.

2.2.4.4. Inhibitory

Jelikož se na zvířecích modelech inhibice GCPII ukázala být prospěšná při různých neuropathologických procesech [11,12], bylo vynaloženo veliké úsilí na získání specifického inhibitoru s vysokou inhibiční schopností. V roce 1996 Jackson et al. publikovali objevení účinného inhibitoru GCPII odvozeného od fosfátu, sloučeninu 2-PMPA [53]. 2-PMPA se ukázala být vysoce specifickým a účinným inhibitorem GCPII [54]. Jediný problém s jeho možným farmaceutickým využitím byla nízká biologická dostupnost této látky (látku se nemohla podávat orální cestou). Tento problém se řeší navržením nových inhibitorů, které vycházejí z 2-PMPA, ale ve své molekule obsahovaly thiolovou funkční skupinu [55]. Získané látky se ukázaly býti podobně efektivní při inhibici GCPII, ale narozdíl od 2-PMPA byly orálně dostupné [56]. Poslední strukturní typ inhibitorů GCPII, který lze nalézt v literatuře, jsou látky odvozené od struktury močoviny [57].

Ačkoliv jsou již k dispozici účinné, selektivní a biologicky dobře dostupné inhibitory GCPII, budeme si muset na jejich použití v medicíně ještě počkat. V této chvíli jsou některé inhibitory v první fázi klinických testů [12].

2.2.4.5. Expres v lidských tkáních

Detekce exprese určitého proteinu ve tkáni se dá provést pomocí metody Western blot nebo imunohistochemicky s využitím monoklonální protilátky rozeznávající daný protein. Katalyzuje-li protein určitou chemickou reakci, lze k určení přítomnosti proteinu využít jeho enzymovou aktivitu.

Publikací zabývajících se expresí GCP II ve zdravých i nádorových tkáních vyšlo několik [8,15,20,58,59]. Různí autoři použili různé metody stanovení proteinu a v závislosti na citlivosti té či oné metody obdrželi rozdílné výsledky. Nejobsáhlejší studie, která zkoumala expresi GCPII ve velikém počtu tkání, jak zdravých tak nádorových, pochází z roku 2007 [59]. Většina autorů používala k detekci GCPII monoklonální protilátky buď pro western blot nebo imunohistochemickou analýzu. Přehledné tabulky s vyznačenou expresí a použitým typem monoklonálních protilátek je obsahem bakalářské práce, která byla vypracována Lucií Kohoutovou v roce 2006 v naší laboratoři ([60] – viz ods. 2.5.3.6.; tab. 2, str. 36-38).

Expres GCPIII ani NAALADasyL nebyla na úrovni proteinu zatím popsána. Narozdíl od GCPII, proti které dnes máme snad už desítky různých monoklonálních protilátek, není zatím žádná specifická monoklonální protilátka proti GCPIII a NAALADaseL dostupná. Vzhledem k tomu, že enzymatické funkce těchto dvou proteinů jsou sdílené i s jinými proteiny (GCPII respektive DPPIV), není možné použít ani stanovení na základě specifické enzymové aktivity.

I přesto tyto problémy lze, alespoň u GCPIII, spekulovat o její lokalizaci v lidském organismu. Sacha et al. ukázali, že monoklonální protilátka GCP 04, která je vysoce účinná při vazbě na GCPII, mírně zkříženě reaguje s GCPIII, a to navzdory různému epitopu protilátky GCP 04 v obou proteinech (mutace v jedné aminokyselině) [8]. Zkřížená reaktivita není velká a pravděpodobně by neměla vést k získání falešných pozitivních výsledků. Bohužel většina monoklonálních protilátek používaných proti GCPII nemá publikovaný přesný epitop na struktuře proteinu. Vysoká sekvenční podobnost GCPII s GCPIII však vede k domněnce, že by mohlo zkříženě reagovat více používaných protilátek.

Klára Hlouchová ve své diplomové práci vypracované v naší laboratoři uvádí pokus, jenž spočíval v použití dvou různých protilátek rozeznávajících GCPII. Při zkoumání zkřížené reaktivity těchto protilátek s GCPIII se ukázala jedna z nich výrazně reaktivnější než druhá. Této vlastnosti se poté využilo, když se porovnávaly signály poskytnuté oběma protilátkami proti stejným vzorkům. Výsledky získané z tohoto

experimentu však nebyly dostatečně citlivé, aby jednoznačně ukázaly expresi GCPIII v některé ze zkoumaných tkání ([61] - viz ods. 5.7.2.).

Monoklonální protilátky specifické proti GCPIII a NAALADaseL, na jejichž získání se v naší laboratoři pracuje, by umožnily detailnější a přesnější studium obou proteinů. Přesná lokalizace exprese těchto proteinů v lidském těle by mohla pomoci osvětlit i jejich fyziologickou úlohu.

3. Praktická část

3.1. Materiály

3.1.1. Chemikálie

BioRad (USA):

agarosa

Biosynth (Švýcarsko):

IPTG (izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid)

Fluka (Švýcarsko):

akrylamid

glycerol

N, N'-metylenbisakrylamid

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)

Duchefa (Holandsko):

L-glycin

Gibco (USA):

fetální hovězí serum (FBS)

Invitrogen (USA):

blasticidin S

Lach-ner (CZ):

izopropanol

Lachema (CZ):

dihydrogenfosforečnan draselný

dihydrogenfosforečnan sodný

dusičnan stříbrný

ethanol

hydrogenfosforečnan sodný

hydroxid sodný

chlorid draselný

chlorid sodný

kyselina chlorovodíková

kyselina octová

methanol

octan draselný

uhličitan sodný

Merck (USA):

dodecylsulfát sodný

Penta (CZ):

azid sodný

thiosíran sodný

močovina

ROTH (SRN):

kyselina trichloroctová

Serva (SRN):

bromfenolová modř

lysozym

peroxodisíran amonný

Sigma (SRN):

DTT (dithiothreitol)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)

fenol

formaldehyd

chlorid litný

chloroform

kanamycin

2-merkptoethanol

imidazol
sacharosa

USB (USA):

ethidiumbromid
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)
Tween 20

3.1.2. Oligonukleotidy

Primery použité na polymerasovou řetězovou reakci byly nasyntetizovány firmou Jena Bioscience (SRN).

Název primeru	Sekvence	Množství	Metoda čištění
FNAL28NdeI	5' - aaacatatgatccccaaaaagccaactcactggc - 3'	30 nmol	HPLC
RNAL740ST	5' - ttctcagatcatcagaggtcagccacaggcc - 3'	30 nmol	HPLC

3.1.3. Restrikční endonukleasy a pufry

Použité enzymy *NdeI*, *XhoI*, *KpnI* a BSA (z angl. bovine serum albumin) byly zakoupeny u firmy NEB (New England BioLabs, UK). Pufry NEB1-4 se dodávají společně s restrikčními enzymy. Jejich přesné složení lze nalézt na internetových stránkách firmy New England BioLabs (www.neb.com).

3.1.4. Kmeny savčích buněk, bakterií, média a plazmidy

- kmeny hmyzích a bakteriálních buněk :

Schneiderovy S2 buňky, Invitrogen (USA) - imortalizovaná buněčná linie odvozená z kmenových buněk *Drosophila melanogaster*

Escherichia coli DH5α, Novagen (USA)

Escherichia coli BL21 RIL, Novagen (USA)

- použitá média :

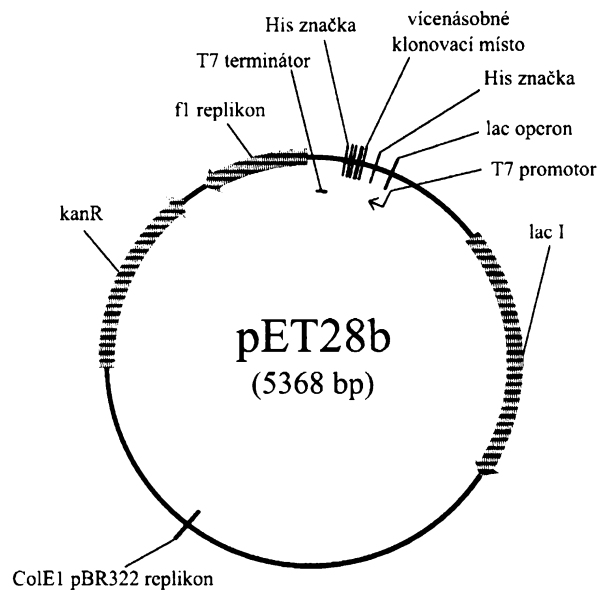
LB médium, Sigma (USA)

LB agar, Sigma (USA)

médium SF900II, Gibco (USA)

- pET28b :

Plazmid pET28b (Novagen) se používá převážně k nadprodukci rekombinantního proteinu v bakteriích. Plazmid obsahuje T7 promotor, který je specifický pro T7 RNA polymerasu. V bakteriích se však T7 RNA polymerasa přirozeně nevyskytuje a je tudíž potřeba na transformaci a následnou produkci proteinu použít geneticky modifikované bakterie. Plazmid dále obsahuje dva počátky replikace. f1 replikon slouží k přepisu jednovláknového plazmidu a ColE1 pBR322 replikon řídí množení celého plazmidu v bakteriích. kanR gen propůjčuje transformované bakterii rezistenci na antibiotikum kanamycin. Před a za vícenásobným klonovacím místem jsou krátké úseky DNA kódující tzv. His značku. Tato značka se přepíše do primární struktury proteinu jako šest po sobě jdoucích histidinů. Této sekvence se dá využít při čištění produkovaného rekombinantního proteinu. Plazmid obsahuje lac operon a expresi rekombinantního proteinu lze tudíž indukovat IPTG (izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid). Mapa plazmidu je vidět na obr. 8.



Obr. 8: Schematická mapa plazmidu pET28b. Převzato a upraveno podle [62].

- pCoBlast :

Vektor pCoBlast byl zakoupen u společnosti Invitrogen (USA). Tento vektor byl použit při stabilní transfekci Schneiderových S2 buněk (kap. 3.2.15.). V plazmidu jsou kódovány proteiny udělující transfekované buňce rezistenci na antibiotika blasticidin S a ampicilin.

3.1.5. Ostatní

Pfu polymerasa, Promega (USA) – 3 000 U/ml

Pfu polymerasový pufr, Promega (USA)

T4 ligasa, NEB (UK) – 400 000 U/ml

T4 ligační pufr, NEB (UK)

RNAsa A, Sigma (USA)

α m-HRP (anti mouse horseradish peroxidase), Pierce (USA)
souprava na čištění DNA z agarosového gelu (Gel Extraction Kit), Peqlab (SRN)
Lambda DNA marker štěpený *BstEII*, NEB (UK)
SDS marker (Protein Test Mixture 4), Serva (SRN)
Casein blocker, chemoluminiscenční substrát WestPico a WestFemto, Pierce (USA)
souprava pro transfekci Schneiderových S2 buněk (Transfection kit), Gibco (USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay), Bio-Rad Laboratories (USA)
Ni-NTA agarosa, QIAGEN (SRN)
směs dNTPs, Top Bio (CZ)
10% fetální hovězí sérum (FBS), Sigma (USA)

3.1.6. Přístroje

autokláv MLS-3020U, Sanyo (Japonsko)
blotovací zařízení Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell,
Bio-Rad Laboratories (USA)
centrifugy: Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments (SRN)
Biofuge Pico, Heraeus Instrument (SRN)
CCD kamera LAS 3000, FUJIFILM Corporation (Japonsko)
hemacytometr Bright-line hemacytometer-cell counting chamber, Sigma (USA).
horizontální agarosová elektroforéza, Gibco (USA)
chromatografický přístroj ÄKTAexplorer, Amersham Pharmacia Biotech (Kanada)
pH metr Unicam 9450 (USA)
DC 290 Zoom Digital camera, Kodak (USA)
rotační inkubátor Innova 4300, New Brunswick Scientific (SRN)
spektrofotometr Helios α Unicam (USA)
termální cyklér Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (USA)
termostaty: Techne, Cambridge Ltd. (UK)
Thermomix BU, B. Braun (SRN)
transilluminátor, UVP (USA)
vertikální polyakrylamidová elektroforéza, Sigma (USA)
dialyzační cela Slide-A-Lyzer 3 500 MWCO, Pierce (USA)

3.2. Metody

3.2.1. PCR (polymerasová řetězová reakce)

Připravená reakční směs byla umístěna do termálního cykléru a byly nastaveny následující podmínky.

1.	94 °C	2 min	prvotní denaturace
2.	94 °C	15 s	denaturace
3.	45 °C	30 sec	hybridizace
4.	72 °C	6 min	syntéza DNA (polymerace)
			30x (kroky 2-4)
5.	68 °C	5 min	dosyntetizování DNA (polymerace)
6.	4 °C		uchování reakce do dalšího zpracování

Po skončení reakce byla celá reakční směs nanesena na agarosový gel. Z něj byl vyříznut příslušný proužek a vyčištěn pomocí soupravy Peqlab (kap. 3.2.3.).

3.2.2. Horizontální agarosová elektroforéza

Roztoky:

TAE pufr: 0,04 M Tris-acetát
1 mM EDTA
upraveno na pH 8,0

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

Asi 30ml 1% (w/v) agarosového roztoku bylo nalito do připravené aparatury. Do roztoku byl přidán ethidiumbromid (výsledná koncentrace 0,5 µg/ml) pro vizualizaci DNA. Nanášené vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 a naneseny na gel. Pro stanovení molekulových hmotností byl použit standard Lamda DNA marker, NEB (DNA bakteriofága lambda štěpená restriční endonukleasou *BstEII*). DNA byla

elektroforeticky rozdělena při 120V, po dobu 20 min. Proužky DNA byly zviditelněny na UV prohlížečce při 302 nm (transilluminátor, UVP) a zdokumentovány fotoaparátem (DC 290 Zoom Digital camera, Kodak).

3.2.3. Izolace DNA z agarosového gelu (Peqlab)

Po vizualizaci agarosového gelu ethidiumbromidem, se pomocí skalpelu vyřízl proužek gelu obsahující danou DNA. Izolace této DNA z agarosového gelu byla provedena pomocí soupravy od firmy Peqlab následujícím postupem.

Vyříznutý gel byl umístěn do 1,5 ml mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 500 μ l „Binden“ pufru. Mikrozkušavka se nechala asi 7 minut (do úplného rozpuštění gelu) ve vodní lázni o teplotě 55 °C. Vzniklý roztok byl nanesen na kolonku, která byla vložena do nové, čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Tato mikrozkušavka se poté centrifugovala (13 000x g, 1 min, lab. teplota). Po centrifugaci se z mikrozkušavky vylil stočený roztok. Na kolonku se přidalo 600 μ l „Wash“ pufru a znovu se umístila do mikrozkušavky a centrifugovala (13 000x g, 1 minutu, lab. teplota). Proteklý pufr se vylil z mikrozkušavky a celý postup se opakovat ještě jednou. Poté byla kolonka přemístěna do nové, čisté mikrozkušavky. Bylo na ni nanesen 50 μ l „Elution“ pufru a nechala se 5 minut stát při laboratorní teplotě. Potom se provedla centrifugace (13 000x g, 1 min, lab. teplota). Vyeluovaný roztok obsahoval DNA z gelu. Správnost a výtěžek reakce byly ověřeny znovunanesením části vzorku na agarosový gel.

3.2.4. Ligace DNA

Do 1,5 ml mikrozkušavky byla připravena následující ligační směs :

- 400 U T4 ligasy (400 U/ μ l)
- 1 μ l T4 ligačního pufru
- 6 μ l inserční DNA (menší část DNA ve výsledném plazmidu)
- 2 μ l vektorového plazmidu (větší část výsledného plazmidu)

Ligační směs se nechala stát přes noc při laboratorní teplotě. Po proběhnutí ligační reakce se touto směsí transformovaly kompetentní bakteriální buňky DH5 α , případně BL21 RIL (kap. 3.2.6.).

3.2.5. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

Do 1,5 ml mikrozkuřavky byla připravena reakční směs. Složení štěpících směsí je shrnuto v tab. 15. Ve všech případech platilo, že reakční směs byla doplněna destilovanou vodou na celkový objem 50 μ l. Po proběhnutí štěpící reakce byla směs analyzována na agarosovém gelu.

Tab. 15: Složení 2 různých štěpících směsí. Všechny směsi jsou nakonec doplněny destilovanou vodou na celkový objem 50 μ l. Označení pufru je zavedené firmou NEB (New England Biolabs).

použité restrikční endonukleasy	množství <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> (U)	množství <i>XhoI</i> (U)	množství DNA (μ g)	pufr (5 μ l)	BSA (μ l)	teplota ($^{\circ}$ C)	čas (hod)
<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>	20	20	0,5 / 1	NEB2	1	37	1
<i>KpnI</i> , <i>XhoI</i>	10	20	0,5 / 1	NEB1	1	37	1

Množství přidané DNA závisí na způsobu její izolace. Pokud šlo o DNA z maxipreparace plazmidové DNA, bylo jí dáno do reakční směsi 1 μ g. Pokud se jednalo o DNA z minipreparace plazmidové DNA, tak se jí přidalo do reakční směsi 0,5 μ g. DNA získaná pomocí PCR byla do reakce přidána všechna.

3.2.6. Transformace bakterií *E. coli*

100 μ l kompetentních buněk *Escherichia coli*, uchovávaných při -70° C, bylo smícháno s 3 μ l plazmidové DNA, případně 10 μ l ligační směsi, a chlazeno 20 min na ledu. Pak byl proveden tepelný šok ("heat shock"), kdy byly vzorky nejprve ponechány 90 s na vodní lázni při 42° C a potom 60 s na ledu. Při laboratorní teplotě bylo přidáno 400 μ l sterilního LB média bez antibiotika a transformované buňky byly inkubovány 50 minut při 37° C. Během inkubace byly misky (průměr 90 mm) s LB agarem obsahujícím antibiotikum (kanamycin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml), vysušeny dnem vzhůru při 37° C. Na takto připravené misky bylo po uplynutí inkubační doby rozetřeno 50-100 μ l vzorku a bakterie byly ponechány růst při 37° C přes noc (růst se provádí dnem vzhůru). Další den byla pomocí párátko přenesena jedna bakteriální kolonie do sterilního LB média, které obsahovalo kanamycin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml. Bakterie byly ponechány růst přes noc v rotačním inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick) při 37° C a 230 ot./min a dále byly využity buď na minipreparaci plazmidové DNA (kap. 3.2.7.) nebo na inokulaci většího objemu LB média při maxipreparaci plazmidové DNA (kap. 3.2.8.).

3.2.7. Minipreparace plazmidové DNA z bakterií

Roztoky:

roztok I: 25 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
upraveno na pH 8,0

roztok II: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

roztok III: 3 M CH₃COOK
2 M CH₃COOH

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

Jedna bakteriální kolonie byla přenesena pomocí sterilního párátko ze selekční misky do 2 ml LB média, které obsahovalo kanamycin o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Bakterie byly ponechány růst přes noc v rotačním inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick) při 37 °C a 230 ot./min. 1,5 ml narostlé bakteriální kultury bylo přeneseno do mikrozkuřavky a centrifugováno (13 000x g, 20 s, lab. teplota; Biofuge Pico, Heraeus Instrument). Supernatant byl vývěvou důkladně odsát a peleta byla rozsuspendována v 100 µl roztoku I. Následně bylo ke vzorku přidáno 200 µl roztoku II (čerstvě připraveného), protřepáno a ponecháno stát 5 min při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 150 µl roztoku III a vzorek byl promíchán několikerym otočením mikrozkuřavky a ponechán 5 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci (13 000x g, 5 min, lab. teplota) byl supernatant přenesen do nové mikrozkuřavky. Bylo přidáno 500 µl směsi fenol/chloroform (1:1) a po promíchání opět centrifugováno (13 000x g, 5 min, lab. teplota). Do čistých mikrozkuřavek byla odebrána horní vrstva tak, aby nedošlo k nasátí proteinů na fázovém rozhraní. Bylo přidáno 800 µl 96% ethanolu pro UV spektroskopii, vše důkladně protřepáno a ponecháno 20 min při -20 °C. Po centrifugaci (13 000x g, 8 min, lab. teplota) byl vývěvou odsát supernatant a peleta byla promyta 200 µl 70 %

ethanolu. Ethanol byl odstraněn opět vývěvou a zbytky ethanolu sušením na vzduchu. Peleta byla rozsuspendována v 50 μ l TE pufru s 1 μ l RNasy A (10 mg/ml, Sigma) a následně byl vzorek 60 min inkubován při 37 °C. Výsledky minipreparace DNA byly testovány agarosovou elektroforézou.

3.2.8. Maxipreparace plazmidové DNA z bakterií

Roztoky:

roztok I: 25 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
upraveno na pH 8,0

roztok II: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

roztok III: 3 M CH₃COOK
2 M CH₃COOH

pufr TE: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
upraveno na pH 8,0

Jedna bakteriální kolonie byla přenesena pomocí sterilního párátko ze selekční misky do 2 ml LB média, které obsahovalo kanamycin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml. Bakterie byly ponechány růst 8 hodin v rotačním inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick) při 37 °C a 230 ot./min. 2 ml narostlé bakteriální kultury bylo přeneseno do 0,5 l LB média (kanamycin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml) a ponechány růst přes noc při 37 °C a 230 ot./min v rotačním inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick). Poté byla kultura centrifugována v 500 ml kyvetách (3 400x g, 4 °C, 30 min; Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments). Supernatant byl odstraněn a peleta rozsuspendována ve 20 ml roztoku I. Bylo přidáno 25 mg lysozymu. Suspenze byla ponechána stát za občasného promíchání při lab. teplotě 20 min. Poté bylo přidáno 40 ml roztoku II. Vše bylo důkladně promícháno (vytvořila se hustá slizovitá hmota) a ponecháno stát při lab. teplotě 10 min.

Následně bylo přidáno 30 ml roztoku III, vše dokonale promícháno a necháno stát při lab. teplotě 5 až 10 minut. Po centrifugaci (3 400x g, 30 min, 4 °C) byl supernatant přefiltrován do nových 500 ml kyvet přes 6x složenou gázu. K supernatantu bylo přidáno 60 ml izopropanolu a ponecháno stát 10 min při lab. teplotě, následovala centrifugace (3 400x g, 10 min, lab. teplota). Supernatant byl důkladně odstraněn a peleta byla rozsuspendována ve 4,5 ml TE pufru a přenesena do 15 ml zkumavky. Po přidání 300 µl 1 M Tris – HCl (pH 8,0) a 1,5 ml 10 M LiCl bylo vše promícháno, ponecháno stát 40 minut na ledu a poté centrifugováno (3 400x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a bylo přidáno 6 ml izopropanolu, necháno stát 10 min při lab. teplotě, následovala další centrifugace (3 400x g, 10 min, 25 °C). Peleta byla rozpuštěna v 0,7 ml TE pufru a přenesena do mikrozkušavky s 10 µl RNasy A (10 mg/ml). Roztok byl inkubován 1 hodinu při 37 °C. Byl přidán stejný objem 13% polyethylenglykolu 8000 (w/v, v 1,6 M NaCl). Obsah mikrozkušavky byl důkladně promíchán a centrifugován (13 000x g, 8 min, lab. teplota; Biofuge Pico, Heraeus Instrument). Supernatant byl odstraněn a peleta byla rozsuspendována v 0,5 ml TE pufru. DNA byla extrahována stejným objemem fenolu. Suspenze byla centrifugována (13 000x g, 5 min, lab. teplota), horní fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky a DNA byla extrahována 2x směsí fenol/chloroform (1:1), 1x chloroformem (do nové mikrozkušavky byla vždy odebírána horní vodná fáze). Po extrakci byl ke vzorku přidán 3M octan sodný (1/10 objemu) a 96% vychlazený UV ethanol (dvojnásobek objemu vzorku), vzorek byl důkladně promíchán a ponechán stát 30 min při -20 °C. Po centrifugaci (13 000x g, 10 min, lab. teplota) byl ethanol odsát a peleta promyta 70 % ethanolom, ethanol byl opět odsát. Peleta byla vysušena na vzduchu a pak rozpuštěna ve 300 µl sterilního TE pufru. Pro zjištění úspěšnosti maxipreparace byla provedena agarosová elektroforéza.

3.2.9. Nadprodukce rekombinantního proteinu v *E. coli* (kmen BL21 RIL)

Buňky *E. coli* BL21 RIL, používané k expresi eukaryotních rekombinantních proteinů, byly transformovány plazmidem pET28bHisNaalL(28-740) (viz 3.2.6.). Ze selekční misky byly vypíchnuty dvě kolonie a každá byla přenesena do 12 ml LB média. Média se nechala přes noc v rotačním inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick) při 37 °C a 230 ot./min. Mezitím se připravili dvě 2 l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LB média a zklávovaly se. Druhý den se k 0,5 l LB média přidalo antibiotikum kanamycin (výsledná

koncentrace antibiotika 50 µg/ml). Erlenmayerovy baňky se umístily do rotačního inkubátoru (Innova 4000, New Brunswick) při 37 °C a 230 ot./min a do každé bylo přidáno 12 ml narostlé buněčné kultury. Postupně se na spektrofotometru Helios α Unicam (USA) měřila optická hustota média. Až dosáhla hodnoty absorbance 0,5 byl z každé baňky odebrán 1 ml média pro analýzu směsi před indukci. Poté bylo do každé baňky přidáno 0,5 ml 1 M IPTG a buněčná kultura se nechala třepat 3 hodiny. Poté byly znovu odebrány 1 ml vzorky na analýzu z obou baněk. Média byla přenesena do 500 ml kyvet a stočena na rotační centrifuze (Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments) při 20 °C a otáčkách 3 400x g po dobu 30 minut. Supernatant z buněk byl odlit a peleta přenesena do 50 ml zkumavek. Získané pelety byly rozpuštěny v 8 M močovně (pH 8,0) a použity k purifikaci (kap. 3.2.12.).

3.2.10. Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Roztoky:

separační 10% gel: 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
2,3 ml 44% akrylamidové směsi: 42,8g akrylamid
1,2 g N',N'-bisakrylamid
56ml destilované vody
100 µl 10% (w/v) SDS
10 µl TEMED
100 µl 10% (w/v) APS
doplněno vodou do 10 ml

zaostřovací 5% gel: 1,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)
0,75 ml 44% akrylamidové směsi
50 µl 10% (w/v) SDS
10 µl TEMED
50 µl 10% (w/v) APS
doplněno vodou do 5 ml

vzorkový pufr (6x): 3,5 ml 1 M Tris (pH 6,8)
3,0 ml glycerol
1 g SDS
600 μ l 2-merkptoethanol
1,2 mg bromfenolová modř
doplněno vodou do 10ml

elektrodový pufr (5x): 15,1 g Tris
94 g glycin
5 g SDS
900 ml voda
pH 8,8 (neupravuje se)

Byl použit přístroj pro vertikální polyakrylamidovou elektroforézu, Sigma. Vzorky byly připraveny smícháním roztoku proteinu se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 a denaturovány minutovým varem na vodní lázni.

Separace proteinů probíhala při konstantním napětí 150V přibližně 60 min

3.2.11. Detekce proteinů z SDS-PAGE metodou barvení stříbrem

Detekce proteinů byla provedena barvením stříbrem. Barvení proběhlo postupným promýváním gelu v následujících roztocích:

- | | | |
|----------------|---|------------------|
| 1) fixace: | 12% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol,
0,02% (v/v) formaldehyd | 60 minut |
| 2) promytí: | 50% (v/v) methanol | 3 x 10 minut |
| 3) exponace: | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l H_2O) | 1 minutu |
| 4) promytí: | destilovaná voda | 3 x 20 s |
| 5) impregnace: | AgNO_3 (2 g/l), 0,5 ml 37% formaldehyd,
doplněno vodou do 1 litru | 20 minut |
| 6) promytí: | destilovaná voda | 3 x 20 s |
| 7) vyvolání: | Na_2CO_3 (60 g/l), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/l),
0,5 ml 37% formaldehydu,
doplněno vodou do 1 litru | 10 s až 10 minut |
| 8) promytí: | destilovaná voda | 10 s |

9) promytí:	12% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol	10 minut
10) uchování:	50% methanol	10 minut

Gel byl následně naskenován a obrázek uložen v počítači pro další zpracování.

3.2.12. Purifikace HisNAALADasyL(28-740) na Ni-NTA kolonce

Roztoky:

Lyzovací pufr: 8 M močovina
0,3 M NaCl
50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0

Ekvilibrační pufr: 8 M močovina
0,5 M NaCl
50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0

Promývací pufr: 8 M močovina
0,5 M NaCl
10 mM imidazol
50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0

Eluční pufr1: 8 M močovina
100 mM NaCl
20 mM Tris, pH 7,5

Eluční pufr2: 8 M močovina
100 mM NaCl
1 M imidazol
20 mM Tris, pH 7,5

Peleta bakterií z 0,5 l nárůstu byla rozpuštěna ve 40 ml lyzovacího pufru. Takto připravený roztok byl následně třikrát sonikován (vždy po 20 sec a poté ihned umístěn na led) a centrifugován na přístroji Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments při 4 °C, 3 400x g, po dobu 30 minut. Získaný supernatant byl odlit do nové zkumavky. S takto připraveným roztokem byla provedena standardizace purifikační metody. Po provedení standardizace

byly všechny relativně čisté frakce slity do jedné (frakce L). Ta byla dialyzována proti 8 M močovině přes noc (abychom se zbavili přítomného imidazolu) a poté s ní byla provedena konečná purifikace a zakoncentrování.

Přístroj pro provádění kapalinové chromatografie ÄKTAexplorer, Amersham Pharmacia Biotech byl promyt ekvilibračním pufrům a následně k němu byla připojena kolonka, která obsahovala 1 ml Ni-NTA agarosového nosiče. Před nanesením vzorku na kolonku se nechalo kolonkou protéci 10 ml ekvilibračního pufru a odebral se vzorek na následnou analýzu (frakce ekv.). Po ekvilibraci kolonky byl na ni nanesen celý objem roztoku. Chromatografické dělení probíhalo za konstantní průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Roztok, který vytékal z kolony byl jímán a byl z něj odebrán vzorek na analýzu (frakce FT). Po nanesení roztoku obsahujícího čištěný protein byla kolonka promyta 12 ml ekvilibračního pufru (frakce W1) a následně 8,5 ml promývacího pufru (frakce W2). Toto promytí mělo vymýt všechny látky, které by se na kolonku vázaly nespecificky. Následně byl na kolonku zaveden eluční pufr1 a eluční pufr2. Tyto pufrы byly přístrojem smíchány tak, aby vznikl gradient imidazolu (s rostoucí tendencí až k 1 M koncentraci imidazolu) o objemu 10 ml. Jednotlivé frakce byly jímány po 1,5 ml a následně analyzovány (frakce E1-E7). Po dosažení 100% přítomnosti elučního pufru2 v nanášeném roztoku, byla ještě kolonka promyta 20 ml tohoto roztoku (frakce 1M imid.). Vzorky odebírané v průběhu purifikace byly nanесeny na polyakrylamidový gel a analyzovány (obr. 14., str. 46). Celá purifikace probíhala při konstantní průtokové rychlosti 2 ml.min⁻¹.

3.2.13. Metoda imunochemické detekce proteinů po přenosu na membránu (WESTERN BLOT)

Roztoky:

Blotovací pufr: 10% methanol
 0,1% SDS
 0,02 M Tris
 0,15 M L-Glycin

Ponceau S: 0,2 g Ponceau S
 3 g kyseliny trichloroctové
 3 g kyseliny sulfosalicylové
 doplněno vodou do 100 ml

PBS (0,5% Tween 20): 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄
 1,8 mM KH₂PO₄
 upraveno na pH 7,4
 k 500ml čistého PBS bylo přidáno 250 µl 100% Tweenu 20

Vyvolávací směs : chemoluminiscenční substrát WestPico a WestFemto, Pierce

Gel z SDS-PAGE byl ekvilibrován spolu s nitroceluloseovou membránou a čtyřmi listy silného filtračního papíru v blotovacím pufru přibližně minutu. Filtrační papíry, nitroceluloseová membrána a gel byly umístěny do blotovacího zařízení v pořadí (od kladného pólu, tzn. odzdoła): anoda, 2 filtrační papíry, membrána, gel, 2 filtrační papíry, katoda). Bublíny byly odstraněny válcováním zkumavkou s rovnými okraji. Transfer probíhal 60 minut při konstantním elektrickém proudu 50 mA (0,65 mA/cm²). Po ukončení elektrotransferu byla membrána na 5 minut vložena do roztoku Ponceau S. Poté byla několikrát opláchnuta destilovanou vodou, tužkou byla označena poloha markeru a roztokem PBS (0,5% Tween 20) byly z membrány vymyty zbytky Ponceau S. Membrána byla dále hodinu blokována v 5 ml Casein blockeru. Po hodině bylo k roztoku Caseinu blockeru přidáno buď 5 µl polyklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740), nebo byla membrána přenesena do média, které obsahovalo monoklonální protilátku proti HisNAALADaseL(28-740). Inkubace s primární protilátkou probíhala vždy přes noc. Druhý den byla membrána několikrát (3x10 min) propláchnuta roztokem PBS (0,5% Tween 20). Poté byla umístěna do 5 ml Casein blockeru a do roztoku byly přidány 2 µl sekundární protilátky (αm-HRP). Se sekundární protilátkou se nechala membrána inkubovat jednu hodinu. Následně byla membrána znovu několikrát (3x10 min) promyta roztokem PBS (0,5% Tween 20). Po promytí bylo na membránu přidáno 1,5 ml vyvolávací směsi (750 µl od každého z dvou roztoků). Podle citlivosti a množství vzorku byla zvolena buď sada WestPico (méně citlivá) nebo sada WestFemto (nejcitlivější). Membrána se nechala inkubovat s vyvolávací směsí 5 minut a poté na ní byly pomocí CCD kamery (LAS 3000, FUJIFILM Corporation) vizualizovány imunoreaktivní proužky.

3.2.14. Počítání buněk

Roztoky:

Trypan Blue: 0,4% Trypan Blue v PBS, pH 7,4

PBS: 137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

upraveno na pH 7,4

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 20–50 µl buněčné suspenze a tento roztok byl doplněn PBS na celkový objem 900 µl. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 100 µl roztoku Trypan Blue. Vzorek byl protřepán a ponechán stát při lab. teplotě 5 min. Následně se dobře protřepal a bylo z něj odebráno 15 µl, které byly naneseny pod sklíčko hemacytomu (Bright-line hemacytometer-cell counting chamber, Sigma). Pod mikroskopem se 100x zvětšením, byly spočítány buňky v 1 mm čtverci uprostřed a ve čtyřech čtvercích v rozích mřížky hemacytomu. Výsledný počet buněk se přepočítal podle vztahu :

průměrný počet buněk na 1 mm² x zředovací faktor x 10⁴ [počet buněk/ml]

3.2.15. Transfekce hmyzích buněk *Drosophila melanogaster* (S2 buněk) a generace stabilní buněčné linie

Roztoky:

Roztok A: 36 µl 2M CaCl₂ (Gibco - Transfection kit)

20 µg plazmidové DNA

1 µg pCoBlast

doplněno sterilní vodou pro tkáňové kultury na 300 µl

Roztok B: 300 µl 2xHBS (Gibco - Transfection kit) : 50 mM HEPES

280 mM NaCl

1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,1

Schneiderovy S2 buňky byly udržovány v médiu SF900II s přidavkem 10% fetálního hovězího séra (FBS) ve 22-24 °C. Před transfekcí byly buňky přeneseny do 35-mm misky a ponechány růst až do hustoty $2-4 \times 10^6$ buněk/ml.

Transfekce byla prováděna podle návodu od výrobce (Gibco - Transfection kit). Pro transfekci byl do jedné mikrozkušavky připraven roztok A a do druhé roztok B. Do roztoku B byl za stálého míchání na vortexu po kapkách přidáván roztok A. Výsledný roztok byl inkubován při laboratorní teplotě 30-40 min. Směs byla znovu promíchána a přidána po kapkách k narostlým buňkám. Po každé přidání kapce se miskou jemně zamíchalo. Buňky se inkubovaly 16 hodin ve 22-24 °C. Následně bylo odstraněno médium a přidáno nové médium SF900II s přidavkem 10% FBS. Buňky rostly po další dva dny a pak bylo médium nahrazeno opět SF900II s 10% FBS, ale tentokrát s přidavkem 5 $\mu\text{g/ml}$ Blastidinu S (selekční médium). Toto selekční médium bylo měněno každé čtyři dny dokud nebyla selekce ukončena (2-3 týdny). Poté bylo možno převést kulturu do bezsérového média (bez FBS a blastidinu S).

3.2.16. Měření množství proteinu ve vzorku podle Bradfordové

Koncentrace proteinu byla stanovena podle Bradfordové měření absorbance komplexu proteinů s Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay) při vlnové délce 595 nm [63]. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin v koncentračním rozmezí 0,025-0,5 mg/ml. Při měření se postupovalo podle protokolu dodaného výrobcem.

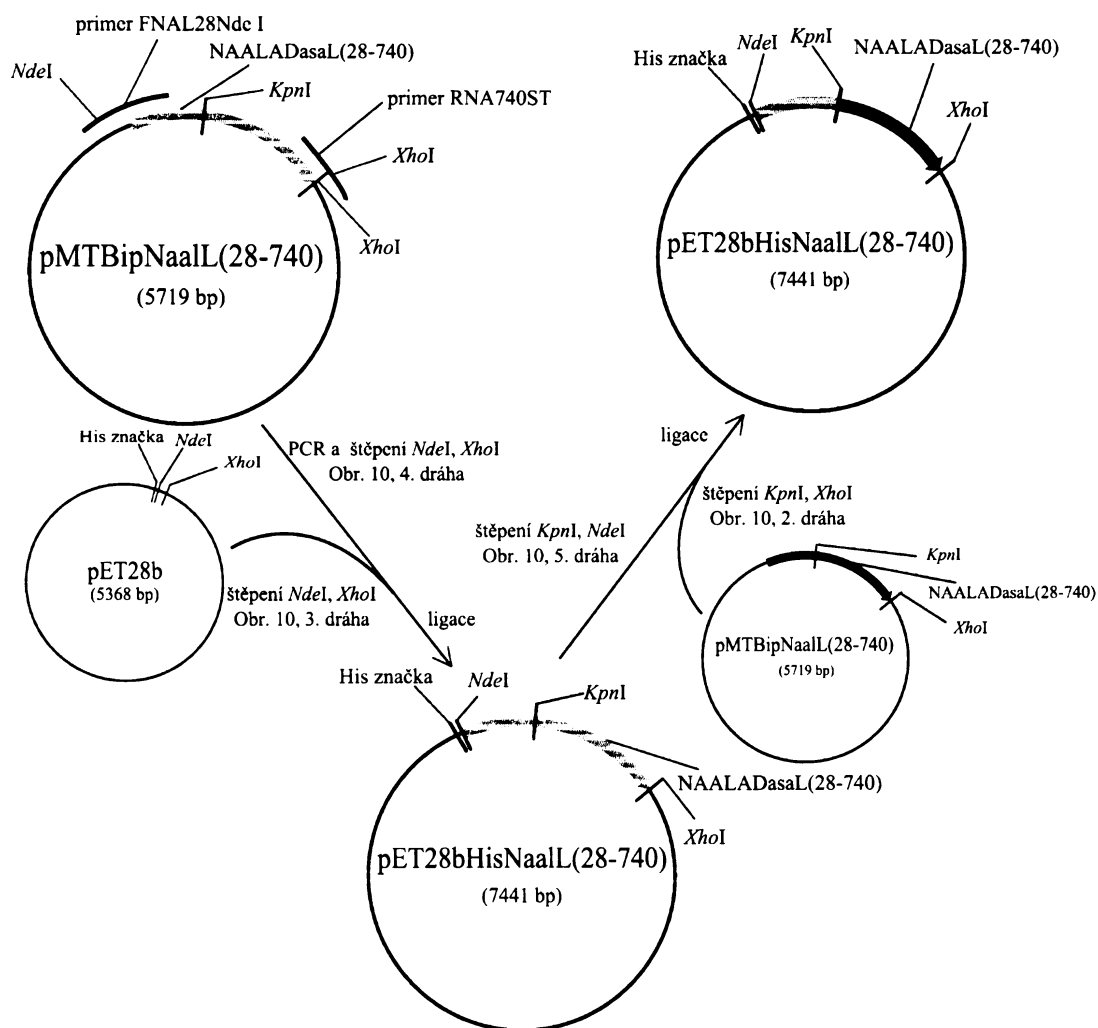
3.2.17. Dialýza

0,5 ml frakce E5 z provedené purifikace bylo nastříknuto do dialyzační cely (Slide-A-Lyzer 3 500 MWCO). Ta byla umístěna do nádoby s 500 ml 25mM Tris, pH 7,4. Dialýza probíhala při 4 °C, za stálého míchání. Dialyzační roztok byl třikrát vyměněn (vždy po 8 hodinách). Dialyzovaný roztok byl posléze odebrán z dialyzační cely injekční stříkačkou a centrifugován (13 000x g, 2 min, lab. teplota; Biofuge Pico, Heraeus Instrument). Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a po změření výsledné koncentrace proteinů v roztoku (kap. 3.2.16.) byl používán jako marker NAALADasyL(28-740).

3.3. Výsledky

3.3.1. Příprava plazmidu kódujícího HisNAALADasuL(28-740) metodou molekulárního klonování

Při přípravě DNA kódující extracelulární část NAALADasyL s N-terminálně připojenou His kotvou (HisNAALADasaL(28-740)) byl jako výchozí plazmid použit pMTBipNaalL(28-740), který byl již dříve připraven v naší laboratoři a osekvenován (Sacha et al. – publikace v přípravě). Z tohoto plazmidu byla pomocí metody PCR získána DNA kódující NAALADasuL(28-740) a byla do ní zavedena unikátní restrikční místa. Tato DNA byla následně překlonována do vektoru pET28b, kterým se transformovaly bakterie *E. coli*. Schéma celého postupu klonování je vidět na obr. 9.



Obr. 9: Schématický náčrt postupu při získání plazmidu kódujícího extracelulární část NAALADasyL s N-terminální His značkou.

Nejdříve byla pomocí metody PCR (kap. 3.2.1.) z plazmidu pMTBipNaalL(28-740) získána DNA kódující extracelulární část NAALADasyL(28-740). Pomocí navržených primerů FNAL28NdeI a RNAL740ST (kap. 3.1.2.) bylo na 5' konec DNA zavedeno restriční místo *NdeI*. Správný průběh PCR reakce byl ověřen na agarosovém gelu (kap. 3.2.2.). Z něj byl vyříznut a následně vyizolován příslušný proužek (kap. 3.2.3.). Získaná DNA byla štěpena restričními endonukleasami *NdeI*, *XhoI* (kap. 3.2.5.). Poté byla celá štěpící směs nanášena na agarosový gel a znovu z něj vyizolována (viz obr. 10, dráha 4, kap. 3.2.2.; 3.2.3.).

Plazmid pET28b, který obsahuje před i za vícenásobným klonovacím místem sekvenci DNA kódující 6 histidinů (tzv. His značku), byl štěpen restričními endonukleasami *NdeI*, *XhoI* (kap. 3.2.5.). Reakční směs byla nanášena na agarosový gel (kap. 3.2.2.) a z něj byl vyizolován příslušný proužek (viz obr. 10, dráha 3, kap. 3.2.3.).

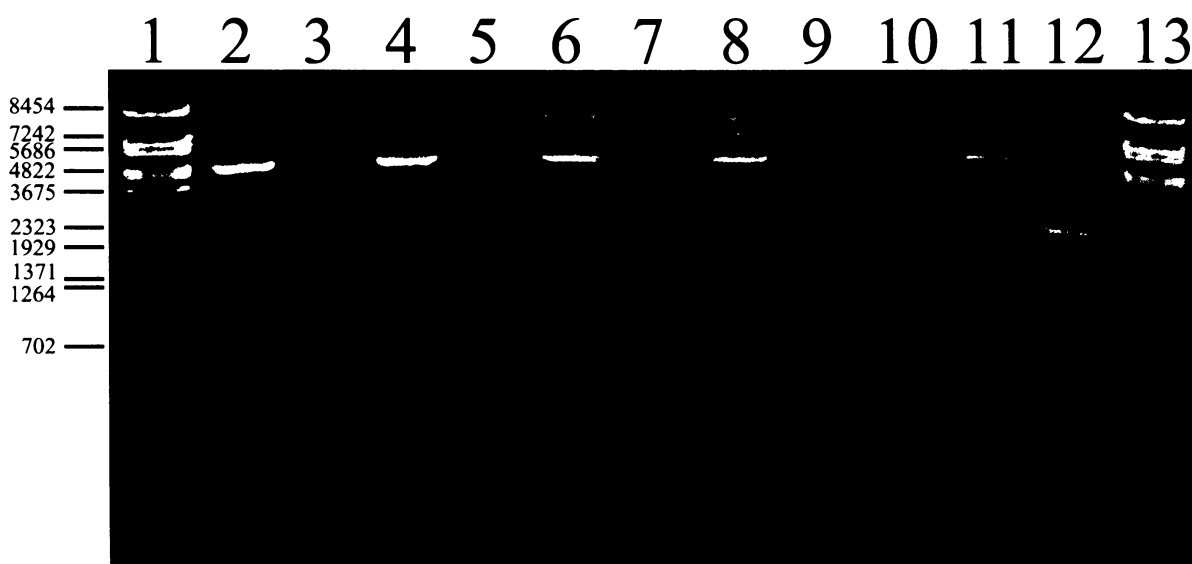


Obr. 10: Fragменты použité při klonování elektroforeticky rozdělené na agarosovém gelu. Vzorky byly smíseny se vzorkovým pufrém a děleny na 1% (w/v) agarosovém gelu při 120V 20 minut (kap. 3.2.2.). Dráhy: 1-Lamda marker *BstEII*, NEB (velikosti proužků jsou udány v bp)-7 μ l; 2-pMTBipNaalL(28-740) štěpený *KpnI*, *XhoI*-50 μ l; 3-pET28b štěpený *NdeI*, *XhoI*-50 μ l; 4-produkt PCR reakce štěpený *NdeI*, *XhoI*-50 μ l; 5-pET28bHisNaalL(28-740) štěpený *KpnI*, *XhoI*-45 μ l. Dráha 5 byla z jiného agarosového gelu a do obrázku byla přidána pomocí programu Adobe Photoshop tak, aby velikost fragmentů DNA odpovídala Lamda markeru *BstEII*.

Pomocí ligační reakce byly spojeny oba získané fragmenty DNA (kap. 3.2.4.). Bakterie *E. coli* (kmen DH5 α) byly touto ligační směsí transformovány (kap. 3.2.6.). Plazmid byl v bakteriích namnožen a následně vyizolován metodou minipreparace plazmidové DNA (kap. 3.2.7.).

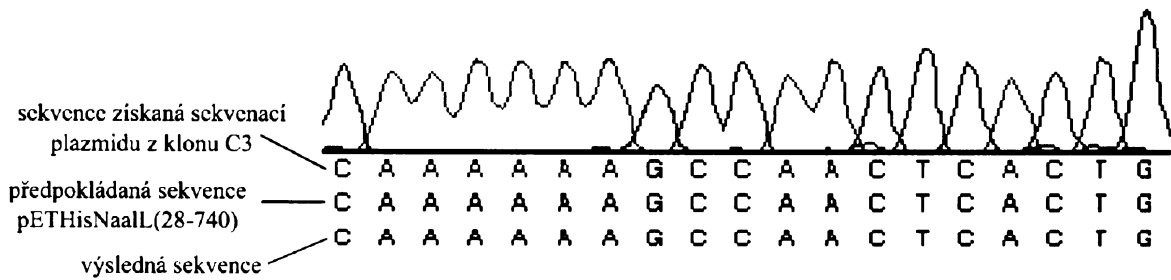
Takto získaný plazmid již vyhovoval našim požadavkům. Vzhledem k tomu, že fragment získaný pomocí PCR by bylo třeba celý osekvenovat, byla část DNA kódující

HisNAALADasuL(28-740) nahrazena shodnou DNA z plazmidu pMTBipNaalL(28-740), která již byla osekvenována (viz obr.9, str. 42). Plazmidy pET28bHisNaalL(28-740) a pMTBipNaalL(28-740) byly štěpeny restričními endonukleasami *KpnI* a *XhoI* (kap. 3.2.5.). Obě štěpící směsi byly poté nanenseny na agarosový gel (kap. 3.2.2.) a byly vyříznuty příslušné fragmenty (viz. obr. 10, dráhy 2 a 5, str. 43). Oba fragmenty byly z gelu vyizolovány (kap. 3.2.3.) a následně s nimi byla provedena ligační reakce (kap. 3.2.4.). Ligační směsi byly transformovány bakterie *E. coli* (kmen DH5 α) (kap. 3.2.6.). V bakteriích byly namnoženy kopie plazmidu a byly vybrány 4 kolonie, ze kterých byl minipreparací DNA získán příslušný plazmid. Správný průběh ligační reakce byl ověřen restričním štěpením (viz obr. 11; kap. 3.2.5.).



Obr. 11: Restriční analýza bakteriálních klonů transformovaných plazmidem pET28bHisNaalL(28-740) pomocí agarosové elektroforézy. Vzorky byly smíseny se vzorkovým pufrům a děleny na 1% (w/v) agarosovém gelu při 120V 20 minut (kap. 3.2.2.). Dráhy: 1-Lamda marker *BstEII*, NEB (velikosti proužků jsou udány v bp); 2,4,6,8-plazmidy z minipreparace pET28bHisNaalL(28-740) od různých klonů (C1-C4); 3,5,7,9-vzorek odpovídající štěpení plazmidu z daného klonu restričními enzymy *NdeI*, *XhoI*; 10-plazmid pET28bHisNaalL(28-740) z klonu C3 štěpený restričními enzymy *BglII*, *XhoI*; 11-plazmid pET28b štěpený *NdeI*, *XhoI*; 12- produkt PCR reakce štěpený *NdeI*, *XhoI*; 13- Lamda marker *BstEII*, NEB. Do všech drah bylo nanášeno 5 μ l vzorku.

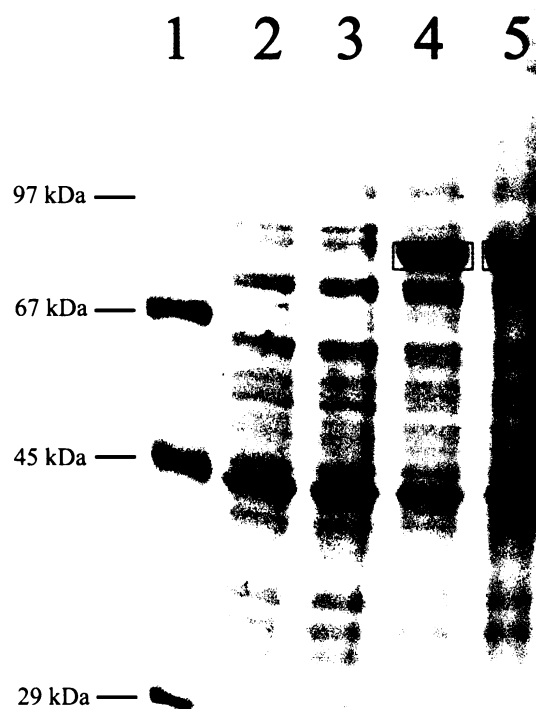
Po ověření správnosti transformovaných klonů byl vybrán jeden (klon C3) a s ním byla provedena maxipreparace plazmidu pET28bHisNaalL(28-740) (kap. 3.2.8.). Část DNA, která byla získána pomocí PCR (kap. 3.2.1.), byla osekvenována v laboratoři Jürgena Felsberga na MBÚ AV ČR. Ukázalo se, že během PCR nedošlo k žádné záměně v nukleotidové sekvenci DNA kódující NAALADasuL. Část sekvence je pro ukázkou uvedena na obr. 12, str. 45.



Obr. 12: Ukázka z výsledků sekvenace plazmidu získaného maxipreparací plazmidové DNA z klonu C3. Porovnání předpokládané a zjištěné sekvenace bylo provedeno programem Vector NTI advanced Software.

3.3.2. Produkce HisNAALADasyL(28-740) v *E. coli*

Produkce rekombinantního proteinu HisNAALADasyL(28-740) byla provedena jak je popsáno v experimentální části (kap. 3.2.9.). Proteiny připravené ve dvou nezávislých nárůstech byly nanášeny a analyzovány na polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (SDS-PAGE) (kap. 3.2.10.). Vizualizace proteinů byla provedena pomocí metody barvení stříbrem (kap. 3.2.11.). Na obr. 13 jsou vidět vzorky před a po indukci IPTG.

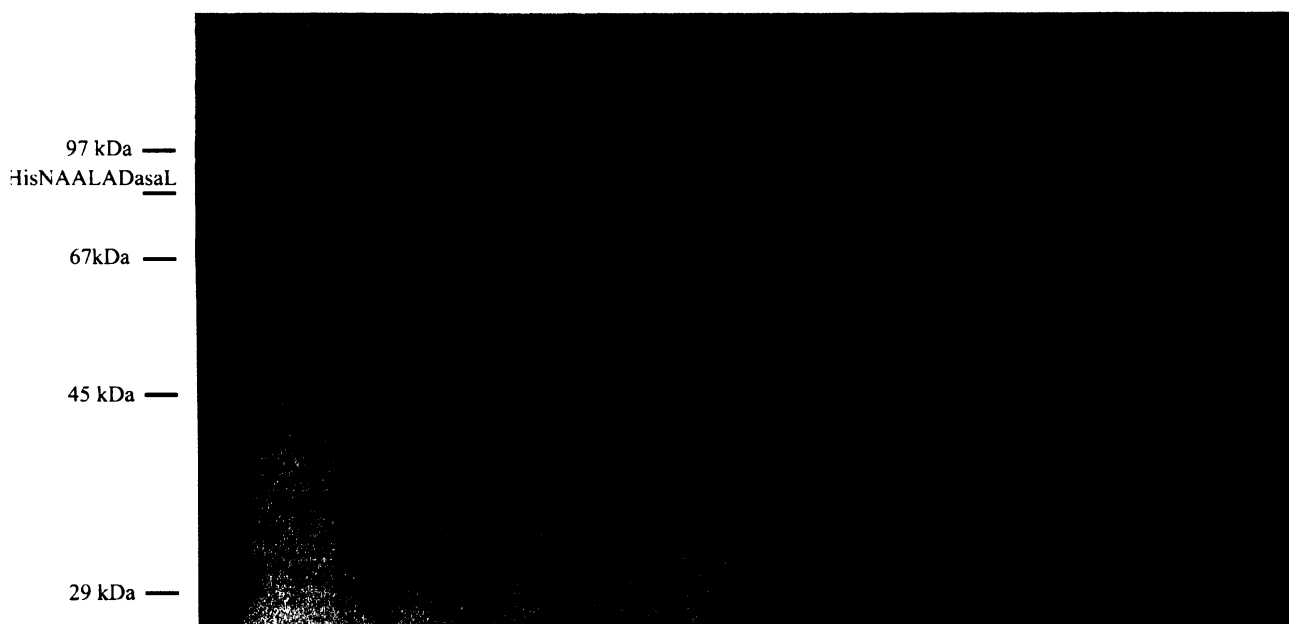


Obr. 13: Analýza vzorku bakteriální kultury před a po indukci IPTG pomocí SDS-PAGE barveného stříbrem. Vzorky byly smíseny se vzorkovým pufrům a rozděleny na 10% PAGE v denaturujícím prostředí při napětí 150V (kap. 3.2.10.). Dráhy: 1-SDS marker, Serva-6 μ l; 2,4-bakteriální kultura nárůstu I. před(2) a po(4) indukci IPTG; 3,5-bakteriální kultura nárůstu II. před(3) a po(5) indukci IPTG. Do drah 2-5 bylo nanášeno 15 μ l vzorku. Exprimovaná HisNAALADasyL(28-740) je vyznačena černým rámečkem.

3.3.3. Purifikace HisNAALADasyL(28-740) na Ni-NTA agarose

Proteiny obsahující ve své molekule His značku (tj. 6 histidinů) se koordinačně-kovalentními vazbami silně vážou na ionty Ni^{2+} . Tohoto jevu bylo využito při čištění rekombinantního proteinu HisNAALADasyL(28-740). Jako zdroj Ni^{2+} iontů byl použit komerčně dostupný nosič Ni-NTA agarosa (QIAGEN).

Rozpuštěné pelety v 8 M močovíně z obou nárůstů byly použity na standardizaci purifikační metody. Nejdříve byla prováděna purifikace s menším množstvím vzorku vsádkovou metodou, aby se ověřila vazba proteinu na nosič a zjistila koncentrace imidazolu, při které se protein z nosiče uvolňuje. Po několika pokusech se přešlo na kontinuální kapalinovou chromatografickou separaci na přístroji ÄKTAexplorer, Amersham Pharmacia Biotech. Po standardizaci metody byly všechny relativně čisté frakce spojeny do jedné a s ní byla provedena finální purifikace a zakoncentrování rekombinantního proteinu HisNAALADasyL(28-740) (kap. 3.2.12.). Frakce získané během chromatografie byly analyzovány na akrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí (kap 3.2.10.). Proteiny byly vizualizovány barvením stříbrem (kap. 3.2.11.). Obarvený gel je zobrazen na obr. 14.



Obr. 14: Průběh purifikace na Ni-NTA agarosové kolonce analyzovaný pomocí SDS-PAGE barveného stříbrem. Vzorky byly smíseny se vzorkovým pufrům a rozděleny na 10% PAGE v denaturujícím prostředí při napětí 150V (kap. 3.2.10.). Dráhy: 1-SDS marker, Serva-5 μ l; 2-ekvilibrace kolonky (frakce ekv.)-8 μ l; 3-roztok, který se nanášel na kolonku (frakce L)-10 μ l; 4-roztok, který protekl kolonkou při nanášení (frakce FT)-17,5 μ l; 5-první promytí kolonky (frakce W1)-12 μ l; 6-druhé promytí kolonky (frakce W2)-8,5 μ l; 7-13-postupná eluce proteinů zvyšující se koncentrací imidazolu (frakce E1-E7)-3 μ l; 14-promytí 1 M imidazolem (frakce 1 M imid)-20 μ l. Označení frakcí je vysvětleno v kap. 3.2.12.

3.3.4. Imunizace myši rekombinantním proteinem HisNAALADasaL(28-740)

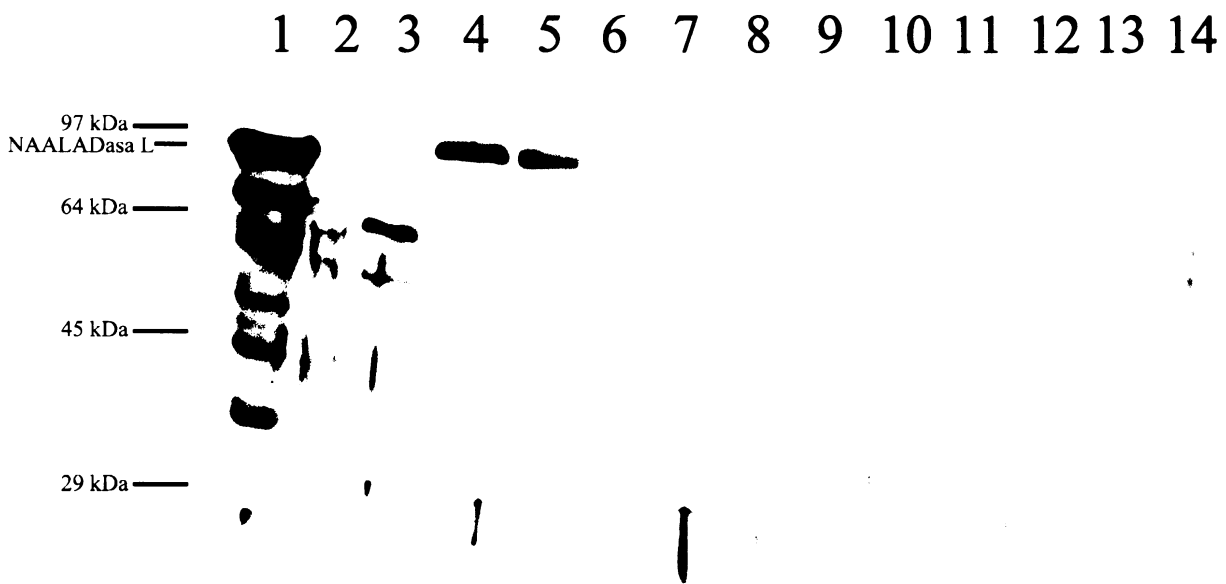
Z purifikace na Ni-NTA kolonce byly získány tři 1,5 ml frakce (E3, E4, E5), které obsahovaly relativně čistý protein v dostatečném množství k provedení imunizace. Pro imunizaci byla vybrána frakce E4. Imunizace byla provedena Pavlou Angelisovou v laboratoři Václava Hořejšího na ÚMG AV ČR.

3.3.5. Určení specifity a citlivosti polyklonální a monoklonálních protilátek proti HisNAALADaseL(28-740)

3.3.5.1. Charakterizace polyklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740)

Po imunizaci myši frakcí E4 z naší purifikace byla nejdříve získána polyklonální protilátka. Pro ověření, že obdržená protilátka skutečně interaguje s HisNAALADasou L(28-740) byla provedena imunochemická detekce tohoto proteinu po přenesení na membránu (kap. 3.2.13.). Výsledek imunochemické detekce a popis příslušných vzorků je uveden na obr. 15, str. 48).

Z výsledků imunodetekce bylo zřejmé, že polyklonální protilátka rozpoznává NAALADasuL(28-740), aniž by rozpoznávala homologní protein GCPII (jeho extracelulární část). Na druhou stranu byla zjištěna značná zkřížená reaktivita s frakcí, kterou se imunizovalo (dráha 1). To bylo pochopitelné, jelikož polyklonální sérum obsahovalo mnoho druhů protilátek, které ne všechny měly svůj epitop proti NAALADaseL(28-740). Další snahy byly zaměřeny na získání monoklonální protilátky, která by specificky rozpoznávala NAALADasuL(28-740).



Obr. 15: Imunodetekce různých variant proteinu NAALADaseL pomocí polyklonální protilátky. Všechny vzorky byly rozděleny na SDS-PAGE (kap. 3.2.10) a následně přeneseny na membránu a detekovány polyklonální protilátkou proti HisNAALADaseL(28-740) (kap. 3.2.13). Dráhy: 1-frakce E5 z purifikace na Ni-NTA kolonce-2 μ l; 2-SDS marker, Serva-20 μ l; 3- přečištěná extracelulární část GCPII-4ng; 4,5- média z S2 buněk stabilně transfekovaných pMTBipNaalL(28-740), vzorky se liší datem transfekce-5 μ l; 6- buněčný lyzát z S2 buněk stabilně transfekovaných pMTBipNaalL(1-740)-5 μ l; 7,8,9-buněčný lyzát z buněk HEK 293T(7), HEK(8), U87(9) tranzientně transfekovaných pcDNANaalL(28-740)-5 μ l; 10- buněčný lyzát z lidské slezinné tkáň-100ng; 11- buněčný lyzát z lidského varlete-100ng; 12- buněčný lyzát z lidského tenkého střeva-10ng; 13-médium z netransfekovaných S2 buněk-5 μ l; 14-buněčný lyzát z netransformovaných bakterií *E.coli* BL21 RIL-5 μ l. Vzorky 4,5,6 byly připraveny pomocí metody 3.2.15. Vzorky 7-14 byly dodány již připravené jinými pracovníky naší laboratoře. Pokud je u vzorku uvedena hmotnost, tak znamená celkové množství proteinů nanášené na gel. Při vizualizaci byl použit vyvolávací roztok WestPico. Fotka byla pořízena na CCD kameře (LAS 3000, FUJIFILM Corporation) - citlivost super, doba exponování 1 min.

3.3.5.2. Příprava monoklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740)

Polyklonální protilátka byla získána imunizací proteinem bez postranlačních modifikací (vlivem produkce proteinu v prokaryotním expresním systému). Navzdory tomu je z obr. 15, str. 48 patrné, že rozeznává i NAALADaseL(28-740) produkovanou v eukaryotních buňkách (dráhy 4,5,7,8). Navíc je u drah 4 a 5 vidět značná specifita polyklonální protilátky proti NAALADaseL(28-740). Proto bylo médium ze stabilně transfekovaných Schneiderových S2 buněk použito k selekci hybridomů při přípravě monoklonální protilátky. Navíc byly klony hybridomů selektovány tak, aby nereagovaly zkříženě s markerem GCPII, jak je vidět na obr. 15, dráha 3, str. 48.

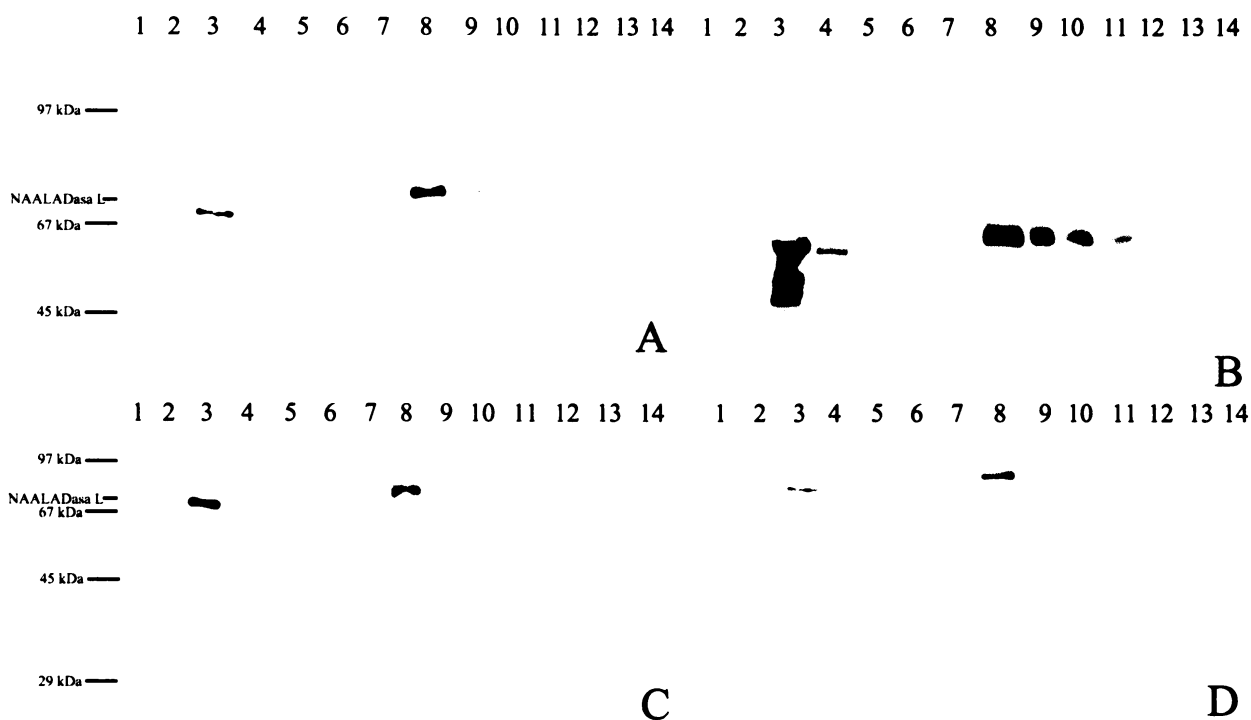
Příprava a selekce hybridomů byla provedena Pavlou Angelisovou v laboratoři Václava Hořejšího na ÚMG AV ČR.

3.3.5.3. Charakterizace monoklonální protilátky proti HisNAALADaseL(28-740)

Byla získána média ze 4 klonů hybridomů, které prošly testováním specifity vazby na NAALADaseL(28-740) produkovanou stabilně transfekovanými S2 buňkami. V dalším textu budou monoklonální protilátky produkované příslušnými hybridomy označovány α NaalL1-4.

Každý klon pravděpodobně produkuje jiný typ protilátky (proti jinému epitopu). Umístění epitopu na molekule proteinu, přesněji jeho přístupnost pro protilátku, do značné míry určuje schopnost protilátky vázat se na příslušný protein. Bylo proto nutné stanovit detekční limity všech čtyř monoklonálních protilátek a určit, která z nich vykazuje největší citlivost proti NAALADaseL(28-740). Výsledky pokusu jsou znázorněny na obr. 16, str. 50.

Pokusem bylo zjištěno, že monoklonální protilátka α NaalL2 má největší citlivost vůči NAALADaseL(28-740). Množství proteinu v drahách 3-7 bylo pouze orientační (kap. 4) a nebylo tudíž možné s jistotou říci, jaký je detekční limit testovaných monoklonálních protilátek. K jeho určení bude zapotřebí provést účinnější purifikaci NAALADaseL(28-740), aby množství ostatních proteinů v jejím roztoku bylo zanedbatelné. Z obr. 16, str. 50 byla patrná značná specifita monoklonálních protilátek k NAALADaseL(28-740) v porovnání s extracelulárními částmi proteinů GCPII (1. dráha) a GCPIII (2. dráha u membrán B a D).



Obr. 16: Imunochemická analýza citlivosti 4 různých monoklonálních protilátek (α NaalL1-4) proti NAALADaseL(28-740). Všechny vzorky byly rozděleny na SDS-PAGE (kap. 3.2.10) a následně přeneseny na membránu a detekovány příslušnou monoklonální protilátkou proti HisNAALADaseL(28-740) (kap. 3.2.13). Membrána A byla inkubována s monoklonální protilátkou α NaalL1, membrána B s α NaalL2, C s α NaalL3 a D s α NaalL4. Dráhy: 1- přečištěná extracelulární část GCPII-1 μ g; 2-SDS marker, Serva (membrána A a C)-20 μ l nebo přečištěná extracelulární část GCP III (membrána B a D)-20ng; 3-7- HisNAALADaseL(28-740)-500ng(3), 100ng(4), 50ng(5), 25ng(6), 10ng(7); 8-médium z S2 buněk stabilně transfekovaných pMTBipNaalL(28-740)-5 μ l; 9-11-10x zředěné médium z S2 buněk stabilně transfekovaných pMTBipNaalL (28-740)-15 μ l(9), 10 μ l(10), 5 μ l(11); 12-14-100x zředěné médium z S2 buněk stabilně transfekovaných pMTBipNaalL(28-740)-15 μ l(12), 10 μ l(13), 5 μ l(14). Množství proteinu u vzorků HisNAALADaseL(28-740) je určeno podle Bradfordové (kap. 3.2.16.). Ta byla měřena z předialyzované frakce E5 z purifikace (kap. 3.2.17.). Příslušné proužky byly vizualizovány pomocí vyvolávací směsi WestFemto na CCD kameře (LAS 3000, FUJIFILM Corporation) - citlivost standard a doba exponování 1 min.

4. Diskuze

V teoretické části byly shrnuty, a kde to bylo možné i doplněny, informace o dvou homolozech GCPII, proteinech GCPIII a NAALADaseL. Cílem bylo porovnat co možná nejvíce známých faktů o těchto proteinech s informacemi již publikovanými o GCPII. Jelikož je GCPII mnohem detailněji prostudovaným proteinem, nezahrnuje rešerše úplné informace týkající se této proteasy, což ani není jejím záměrem. Za to by měla tato práce čtenáři předložit souhrn informací, podaných tak, aby co nejvíce vynikla příbuznost či rozdílnost všech tří proteinů. I když si lze jen těžko představit, že by bylo možné na základě pouhé přítomnosti či nepřítomnosti určitých motivů v molekule usuzovat na její vlastnosti či funkci v organismu, poskytne snad toto srovnání alespoň myšlenkový základ pro další a detailnější studování daných proteinů.

Z porovnání jak na genové tak proteinové úrovni vyplývá značná podobnost GCPII a GCPIII. Tuto skutečnost dokazuje velice podobná exon-intronová struktura genů FOLH1 a NAALAD2 (viz tab. 2, str. 8) a také podobná enzymová aktivita obou proteas. NAALADaseL se od obou proteinů výrazněji odlišuje jak na genové (exon-intronová struktura) tak na proteinové úrovni. Tento protein s největší pravděpodobností nemá ani jednu ze dvou enzymových aktivit GCPII a GCPIII. Z porovnání enzymaticky důležitých aminokyselin vyplývá, že NAALADaseL může být proteolyticky aktivní (obsahuje zbytky vázající zinkové atomy i katalytickou aminokyselinu). Vysoké rozdíly ve zbytcích rozeznávající substrát (S1 a S1` místo) však nasvědčují tomu, že její substrát by měl rozdílnou chemickou strukturu než je tomu u GCPII a GCPIII (viz tab. 11, str. 19).

Cílem praktické části této práce byla příprava rekombinantního proteinu HisNAALADaseL, jeho následná produkce, purifikace a ověření specifity a citlivosti protilátek získaných proti tomuto proteinu.

I přesto, že klonovací postup nebyl příliš jednoduchý, jeho správnost byla jasně ověřena pomocí osekvenování připraveného plazmidu pETHisNaalL(28-740).

Purifikace vyprodukovaného proteinu HisNAALADaseL(28-740) byla provedena na kolonce plněné Ni-NTA agarosou. Tato metoda čištění proteinu s histidinovou kotvou je značně rozšířená. V porovnání s protokolem, který byl k dispozici, bylo nutné provést několik změn (především přejít ze vsádkového způsobu dělení, na kontinuální kapalinovou chromatografii). Z analýzy vzorků jímaných v průběhu finální purifikace (viz obr.14,

str. 46) bylo zřejmé, že purifikace neproběhla se 100% účinností. Bylo nutné stanovit koncentraci purifikovaného proteinu ve frakcích E3-E7, aby se zjistilo, zda obsahují dostatek proteinu na provedení imunizace. Koncentrace proteinů v elučních frakcích byla nejprve určena podle Bradfordové. Stanovení však nebylo přesné, jelikož 8 M močovina, ve které probíhala celá purifikace a jejímž roztokem se i imunizovalo, interagovala s roztokem používaným při stanovení proteinů. Pro správné určení koncentrace proteinů bylo provedeno densitometrické stanovení koncentrace HisNAALADasyL(28-740) v elučních frakcích (jako standard byla použita vyčištěná extracelulární část GCPII). Zjištěné hodnoty koncentrací ukázaly, že v každé z 1,5 ml elučních frakcí je dostatečné množství proteinu pro provedení imunizace (navíc se ukázalo, že 8 M močovina zneprěsňuje měření koncentrace proteinů podle Bradfordové jen mírně; nepublikované výsledky).

Pomocí imunochemické detekce proteinů po přenesení na membránu byla ověřena účinnost vazby polyklonální protilátky proti HisNAALADaseL. Polyklonální protilátka obsahuje mnoho protilátek s různým epitopem a tudíž je pochopitelné, že reagovala velice silně s frakcí již se imunizovalo (viz obr. 15, dráha 1, str. 48). Spodní proužky na membráně mohou být buď jiné proteiny, které byly vyčištěny spolu s HisNAALADasyL(28-740), nebo degradační produkty tohoto proteinu. Každopádně byla zjištěna značná specifita polyklonální protilátky proti médiu ze stabilně transfekovaných hmyzích S2 buněk (viz obr. 15, dráha 4, 5, str. 48).

Z porovnání účinnosti vazby 4 různých monoklonálních protilátek vyplynulo, že nejcitlivější je protilátka α NaalL2 (viz obr. 16, str. 50). Množství proteinu uvedená u frakcí HisNAALADasyL(28-740) označují celkové množství proteinu, které bylo měřeno po dialýze jedné z elučních frakcí z purifikace proti 25mM Tris, pH 7,4 (kap. 3.2.17.). Vzhledem ke znečištění vzorku, nelze přesně určit detekční limit monoklonálních protilátek. Pravděpodobně však bude menší, než bylo množství nanoseného proteinu do jednotlivých drah. Tento předpoklad podporuje i fakt, že pokud se pokusíme z obr. 16, str. 50 odhadnout koncentraci NAALADasyL(28-740) v médiu ze stabilně transfekovaných S2 buněk, dostaneme příliš velké číslo. U nejcitlivější monoklonální protilátky α NaalL2 se dá očekávat detekční limit v jednotkách nanogramů případně stovkách pikogramů proteinu. Viditelná zkřížená reaktivita monoklonálních protilátek s frakcemi obsahujícími HisNAALADasyL(28-740) (viz obr. 16, str. 50) podporuje domněnku, že nižší proužky viditelné jak s polyklonální tak monoklonální protilátkou jsou degradační produkty tohoto proteinu.

Pomocí monoklonálních protilátek se dá protein stanovovat v tkáňových lyzátech (metodou Western blot) či v tkáňových řezech (imunohistochemicky). Při výběru a testování protilátek bylo nutné ověřit vysokou specifitu vazby protilátky k danému proteinu, abychom mohli s jistotou říci, že imunoreaktivní protein je NAALADasyL a ne jeden z jejích blízkých homologů. Tento problém je dnes aktuální především v otázce výskytu GCPII a GCPIII (kap. 2.2.4.2), ale NAALADasyL vykazuje také vysokou homologii s GCPII i GCPIII a reálná možnost zkřížené reaktivity zde existuje.

Monoklonální protilátky nerozpoznaly 1 µg čistého proteinu GCPII ani 20 ng čisté GCPIII (viz obr. 16, dráhy 1, 2b, str. 50). Množství proteinu GCPII, které bylo detekováno na membráně, téměř vylučuje možnou zkříženou reaktivitu. Množství GCPIII bylo sice mnohem menší, ale bylo dostatečné k tomu, aby ukázalo, že případná zkřížená reaktivita monoklonálních protilátek s GCPIII nebude příliš výrazná. V budoucnu bude nutné ověřit možnou zkříženou reaktivitu s větším množstvím proteinu GCPIII.

Příprava specifických monoklonálních protilátek představuje pouhý začátek při zkoumání NAALADasyL a ještě mnoho práce v tomto směru musí být uděláno. Dalším logickým krokem při zkoumání tohoto proteinu bude jeho nadprodukce v eukaryotním expresním systému a následná purifikace. Po získání čistého proteinu bude nutné ověřit jeho případnou enzymovou aktivitu (DPPIV) i neaktivitu (štěpení NAAGu a folylpoly- γ -L-glutamátu) a porovnat získané výsledky z dosud publikovanými informacemi.

Přesný a správný popis exprese GCPII, GCPIII a NAALADasyL v různých lidských tkáních by mohl pomoci k objasnění fyziologické role těchto proteinů v lidském organismu. K tomu je však zapotřebí nejprve získat vysoce citlivé a především specifické monoklonální protilátky proti všem třem proteinům.

5. Závěr

- byla vypracována rešerše porovnávající protein GCPII a jeho dva blízké homology GCPIII a NAALADasaL
- metodou molekulárního klonování byl připraven plazmid pET28bHisNaalL(28-740), který obsahuje DNA kódující protein HisNAALADasaL(28-740)
- byla provedena nadprodukce proteinu HisNAALADasaL(28-740) v prokaryotním expresním systému (*E. coli*, kmen BL21 RIL)
- vyprodukovaný protein byl vyčištěn na kolonce obsahující Ni-NTA agarosu
- byla provedena imunizace myši vyčištěným proteinem HisNAALADasaL(28-740) a byly získány jedna polyklonální a čtyři monoklonální protilátky proti tomuto proteinu
- ověřila se specifita a citlivost všech protilátek jak vůči HisNAALADaseL(28-740), produkované v prokaryotním systému, tak NAALADaseL(28-740) produkované eukaryotními buňkami

6. Seznam zkratek

α m-HRP	z angl. anti-mouse horseradish peroxidase
2-PMPA	2-fosfonomethylpentandiová kyselina
APS	peroxodisíran amonný (z angl. amonium persulphate)
BLAST	z angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	pár bází (z angl. base pair)
CCD	z angl. charge-coupled device
cDNA	kódující DNA (z angl. coding DNA)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty (z angl. deoxynucleosidtriphosphates)
DPPIV	dipeptidylpeptidasa IV (z angl. dipeptidyl peptidase IV)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESTs	z angl. expressed sequence tags
FOLH	folát hydrolasa (z angl. folate hydrolase)
GCPII	glutamátkarboxypeptidasaII (z angl. glutamate carboxypeptidaseII)
GCPIII	glutamátkarboxypeptidasaIII (z angl. glutamate carboxypeptidaseIII)
GPI-18431	zkratka pro sloučeninu se systematickým názvem (S)-2-(4-jodobenzylfosfonomethyl)-pentandiová kyselina
hnRNA	heteronukleární RNA (z angl. heterogeneous nuclear RNA)
IC ₅₀	inhibiční konstanta
IPTG	izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IUBMB	z angl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kbp	1000 párů bází (z angl. kilo base pair)
K _{cat}	katalytická konstanta
kDa	1000 Daltonů (z angl. kilo Daltons)
K _M	Michaelisova konstanta
LNCaP	z angl. Lymph-node carcinoma of the prostate
LB médium	z angl. Luria-Bertani medium
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky
mRNA	mediátorová RNA
MŠMT ČR	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky
NAA	N-acetyl-L-aspartát

NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
NAALADasa	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase
NAALADasaL	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase like
NAALADasaL2	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase like2
NEB	New England Biolabs
PBS	fyzilogický fosfátový pufr (z angl. phosphate buffer saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PGCP	z angl. plasma glutamate carboxypeptidase
PSMA	z angl. prostate specific membrane antigen
PSMAL	z angl. prostate specific membrane antigen like
Q(RT)-PCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce (z angl. quantitative (real time)-polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RT-PCR	z angl. reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr
TE pufr	Tris-EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České Republiky
ÚMG AV ČR	Ústav molekulární genetiky Akademie věd České Republiky
v/v	objem kapalné látky v konečném objemu roztoku (z angl. volume for volume)
w/v	hmotnost rozpuštěné látky v konečném objemu roztoku (z angl. weight for volume)

7. Literatura

1. Rawlings,N.D.,Morton,F.R., & Barrett,A.J.: **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Res.* **34**, D270-D272 (2006)
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-acetylatedalpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain.** *J. Biol. Chem.* **262**, 14498-14506 (1987)
3. 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.* **7**, 927-935 (1987)
4. Haslsted,CH.H.:**Jejunal brush-border folate hydrolase : A novel enzyme.** *West. J. Med.* **155**(6), 605-609 (1991)
5. 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.* **2**, 1445-1451 (1996)
6. Carter,R.E., Feldman,A.R., & 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.* **93**, 749-753 (1996)
7. Luthi-Carter,R., Berger,U.V., Barczak,A.K., Enna,M., & Coyle,J.T.: **Isolation and expression of a rat brain cDNA encoding glutamate carboxypeptidase II.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3215-3220 (1998)
8. Sacha,P., Zamecnik,J., Barinka,C., Hlouchova,K., Vicha,A.,Mlcochova,P., Hilgert,I., Eckschlager,T. and Konvalinka,J.: **Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain.** *Neuroscience* **144**, 1361-1372 (2007)
9. 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.* **69**, 174-181 (1997)
10. Valivullah,H.M., Lancaster,J., Sweetnam,P.M., & Neale,J.H.: **Interactions between N-acetylaspartylglutamate and AMPA, kainate, and NMDA binding sites.** *J. Neurochem.* **63**, 1714-1719 (1994)
11. 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.* **26**, 477-484 (2005)
12. Thomas,A.G., Wozniak,K.M., Tsukamoto,T., Calvin,D., Wu,Y., Rojas,C., Vornov,J., Slusher,B.S.: **Glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) inhibition as a novel therapeutic strategy.** *Adv. Exp. Med. Biol.* **576**, 327-337 (2006)
13. Halsted,C.H., Ling,E., Luthi-Carter R., Villanueva, Gardner,J., Coyle,J.T.: **Folypoly-gammaglutamate carboxypeptidase from pig jejunum.** *J. Biol. Chem.*, **273**: 20417-20424 (1998)

14. Christiansen,J.J., Rajasekaran,S.A., Moy,P., Butch,A., Goodlick,L., Gu,Z., Reiter,R.E., Bander,N.H., Rajasekaran,A.K.: **Polarity of prostate specific membrane antigen, prostate stem cell antigen, and prostate specific antigen in prostate tissue and in a cultured epithelial cell line.** *Prostate* **55**(1), 9-19 (2003)
15. Silver,D.A., Pellicer,I., Fair,W.R., Heston,W.D., & Cordon-Cardo,C.: **Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues.** *Clin. Cancer Res.* **3**, 81-85 (1997)
16. Ghosh,A. & Heston,W.D.: **Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer.** *J. Cell Biochem.* **91**, 528-539 (2004)
17. Yao,V., Bacich,D.J.: **Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression gives prostate cancer cells a growth advantage in a physiologically relevant folate environment in vitro.** *Prostate* **66**, 867-875 (2006)
18. Chang, S.S.: **Overview of prostate-specific membrane antigen.** *Rev. Urol.* **6** (Suppl. 10), 13-18 (2004)
19. Nargund, V., Hashmi, D.A., Kumar, P., Gordon, S., Otitie, U., Ellison, D., Carroll, M., Baithun, S., Britton, K.E.: **Imaging with radiolabelled monoclonal antibody (MUJ591) to prostate-specific membrane antigen in staging of clinically localized prostatic carcinoma : comparison with clinical, surgical and histological staging.** *BJU Int.* **95**, 1232-1236 (2005)
20. 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.* **57**, 3629-3634 (1997)
21. Conway,R.E., Petrovic,N., Li,Z., Heston,W.D.W., Wu,D., Shapiro,L.H.: **Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction.** *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5310-5324 (2006)
22. 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* **14**, 4835-4845 (2003)
23. 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.* **58**, 4055-4060 (1998)
24. 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.* **63**, 2645-2648 (2003)
25. Rajasekaran,A.K., Anilkumar,G., & Christiansen,J.J.: **Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?** *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **288**, C975-C981 (2005)
26. O'Keefe,D.S., Su, S.L., Bacich,D.J., Horiguchi,Y., Luo,Y., Powell,C.T., Zandvliet,D., Russell,P.J., Molloy,P.L., Nowak,N.J., Shows,T.B., Mullins,C., Vonder Haar,R.A., Fair,W.R., Heston,W.D.W.: **Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene.** *Biochim. Biophys. Acta* **1443**: 113-127 (1998)

27. Rinker-Schaeffer,C.W., Hawkins,A.L., Su,S.L., Israeli,R.S., Griffin,C.A., Isaacs,J.T., Heston,W.D.W.: **Localization and physical mapping of the prostate-specific membrane antigen (PSM) gene to human chromosome 11.** *Genomics* **30**, 105-108 (1995)
28. 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.* **83**, 20-29 (2002)
29. 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* **50**(4), 285-292 (2003)
30. Shneider,B.L., Thevananther,S., Moyer,M.S., Walters,H.C., Rinaldo,P., Devarajan,P., Sun,A.Q., Dawson,P.A., Ananthanarayanan,M.: **Cloning and characterization of a novel peptidase from rat and human ileum.** *J. Biol. Chem.* **272**(49), 31006-31015 (1997)
31. Pangalos,M.N., Neefs,J.M., Somers,M., Verhasselt,P., Bekkers,M., van der,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.* **274**, 8470-8483 (1999)
32. Bzdega,T., Crowe,S.L., Ramadan,E.R., Sciarretta,K.H., Olszewski,R.T., Ojeifo,O.A., Rafalski,V.A., Wroblewska,B., Neale,J.H.: **The cloning and characterization of a second brain enzyme with NAAG peptidase activity.** *J. Neurochem.* **89**, 627-635.(2004)
33. O'Keefe,D.S.,Bacich,D.J., D.W. Heston,W.D.W.: **Comparative analysis of prostate-specific membrane antigen (PSMA) versus a prostate-specific membrane antigen-like gene.** *Prostate* **58**, 200-210 (2004)
34. Gingras,R., Richard,C., El-Alfy,M., Morales,C.R., Potier,M., Pshezhetsky,A.V.: **Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase / prostate-specific membrane antigen.** *J. Biol. Chem.* **274**(17), 11742-11750 (1999)
35. Tonkin,E.T., Smith,M., Eichhorn,P., Jones,S., Imamwerdi,B., Lindsay,S., Jackson,M., Wang,T.J., Ireland,M., Burn,J., Krantz,I.D., Carr,P., Strachan,T.: **A giant novel gene undergoing extensive alternative splicing is severed by a Cornelia de Lange-associated translocation breakpoint at 3q26.3.** *Hum. Genet.* **115**(2):139-148 (2004)
36. Mesters,J.R., Barinka,C., Li,W., Tsukamoto,T., Majer,P., Slusher,B.S., Konvalinka,J., & Hilgenfeld,R.: **Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer.** *EMBO J.* (2006)
37. Good, D., Schwarzenberger,P., Eastham,J.A., Rhoads, R.E., Hunt,J.D., Collins,M., Batzer,M., Theodossiou,C., Kolls,J.K., Grimes,S.R.: **J. Cloning and characterization of the prostate specific membrane antigen promoter.** *J. Cell. Biochem.* **74**, 395-405 (1999)
38. Watt,F., Martorana,A., Brookes,D.E., Ho,T., Kingsley,E., O'Keefe,D.S., Russel,P.J., Heston,W.D.W., Molloy,P.L.: **A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1.** *Genomics* **73**, 243-254 (2001)
39. Israeli,R.S., Powell,C.T., Corr,J.G., Fair,W.R., & Heston,W.D.: **Expression of the prostatespecific membrane antigen.** *Cancer Res.* **54**, 1807-1811 (1994)

40. Renneberg,H., Friedetzky,A., Konrad,L., Kurek,R., Weingartner,K., Wennemuth,G., Tunn,U.W., & Aumuller,G.: **Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissues: implication for the use of PSM reverse transcription polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread.** *Urol. Res.* **27**, 23-27 (1999)
41. Pontius,J.U., Wagner,L., Schuler,G.D.: **UniGene: A unified view of the transcriptome.** v knize The NCBI Handbook, National center of biotechnology information, USA, 21/1-21/12 (2002)
42. 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.* **55**, 1441-1443 (1995)
43. Schmittgen,T.D., Teske,S., Vessella,R.L., True,L.D., Zakrajsek,B.A. : **Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients.** *Int. J. Cancer* **107**, 323-329 (2003)
44. Rawlings,N.D. & Barrett,A.J.: **Structure of membrane glutamate carboxypeptidase.** *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 247-252 (1997)
45. 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.* **102**, 5981-5986. (2005)
46. Barinka,C., Starkova,J., Konvalinka,J., Lubkowski,J.: **A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II.** *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 150-153. (2007)
47. Hlouchova,K., Barinka,C., Klusak,V., Sacha,P., Mlcochova,P., Majer,P, Rulisek,L., Konvalinka,J.: **Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III.** *J. Neurochem.***101**, 682-696 (2007)
48. 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.* **53**, 227-230 (1993)
49. Speno,H.S., Luthi-Carter,R., Macias,W.L., Valentine,S.L., Joshi,A.R., & Coyle,J.T.: **Sitedirected mutagenesis of predicted active site residues in glutamate carboxypeptidase II.** *Mol. Pharmacol.* **55**, 179-185 (1999)
50. Helenius,A., Aebi,M.: **Intracellular functions of N-linked glycans.** *Science* **291**(5512), 2364-2369 (2001)
51. Barinka,C., Sacha,P., Sklenar,J., Man,P., Bezouska,K., Slusher,B.S., & Konvalinka,J.: **Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity.** *Protein Sci.* **13**, 1627-1635 (2004)
52. Barinka,C., Rinnova,M., Sacha,P., Rojas,C., Majer,P., Slusher,B.S., & Konvalinka,J.: **Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II.** *J. Neurochem.* **80**, 477-487 (2002)
53. 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.* **39**, 619-622 (1996)

54. Slusher,B.S., Vornov,J.J., Thomas,A.G., Hurn,P.D., Harukuni,I., Bhardwaj,A., Traystman,R.J., Robinson,M.B., Britton,P., Lu,X.C., Tortella,F.C., Wozniak,K.M., Yudkoff,M., Potter,B.M., & Jackson,P.F.: **Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury.** *Nat. Med.* **5**, 1396-1402 (1999)
55. Majer,P., Jackson,P.F., Delahanty,G., Grella,B.S., Ko,Y.S., Li,W., Liu,Q., Maclin,K.M., Polakova,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.* **46**, 1989-1996 (2003)
56. Majer,P., Hin,B., Stoermer,D., Adams,J., Xu,W., Duvall,B.R., Delahanty,G., Liu,Q., Stathis,M.J., Wozniak,K.M., Slusher,B.S., Tsukamoto,T.: **Structural optimization of thiol-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II by modification of the P1' side chain.** *J. Med. Chem.* **49**(10), 2876-2885 (2006)
57. Kozikowski,A.P., Zhang,J., Nan,F., Petukhov,P.A., Grajkowska,E., Wroblewski,J.T., Yamamoto,T., Bzdega,T., Wroblewska,B., & Neale,J.H.: **Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents.** *J. Med. Chem.* **47**, 1729-1738 (2004)
58. Kinoshita.Y., Kuratsukuri,K., Landas,S., Imaida,K., Rovito,P.M.Jr., Wang,C.Y., Haas,G.P.: **Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues.** *World J. Surg.* **30**(4), 628-636 (2006)
59. Mhaweche-Fauceglia,P., Zhang,S., Terracciano,L., Sauter,G., Chadhuri,A., Herrmann,F.R., Penetrante,R.: **Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using mutiple tumour tissue microarray technique.** *Histopathology* **50**(4), 472-483 (2007)
60. Kohoutová,L.: **Glutamát karboxypeptidasa II jako marker karcinomu prostaty:** Bakalářská práce. Katedra Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita Praha (2006)
61. Hlouchová,K.: **Cloning, expression and biochemical characterization of glutamate carboxypeptidase III, a homolog of a metallopeptidase from the central nervous system:** Diploma Thesis. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague (2005)
62. <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB074.pdf> - platné k 11.5.2007
63. Bradford,M.M.: **A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254 (1976)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka