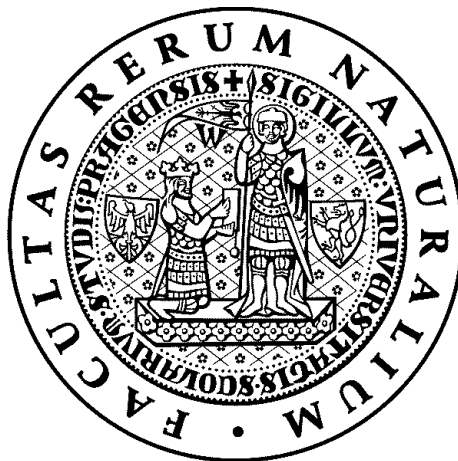


Prírodovedecká fakulta Univerzity Karlovi v Prahe

Katedra biochémie



Príprava, expresia a charakterizácia myšacej GCPIII

Adriana Bäumlová

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce:

Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2010

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

V Praze dne 2. 6. 2010

.....

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi Janu Konvalinkovi a Janu Tykvartovi za cenné rady a pripomienky k mojej práci. Janu Tykvartovi tiež za trpezlivosť a ochotu, s ktorou sa mi venoval po celú dobu práce, a za pomoc, ktorú mi poskytoval.

Ďalej tiež ďakujem všetkým ostatným členom laboratória za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Taktiež ďakujem Jane Starkové a Pavlovi Šáchovi za prípravu hmyzích a cicavčích buniek, Františkovi Sedlákovovi za prípravu bakteriálnych buniek, Janu Tykvartovi a Vaškovi Navrátilovi za pomoc pri tvorbe a úprave obrázkov.

V neposlednej rade by som poďakovala svojej rodine, ktorá ma podporovala po celú dobu štúdia.

Obsah

ENGLISH ABSTRACT	6
SLOVENSKÝ ABSTRAKT	7
1 PREDHOVOR.....	8
2 ÚVOD.....	9
2.1 GÉN PRE ĽUDSKÚ GCPII :	9
2.2 ZOSTRIHOVÉ VARIANTY GCPII.....	9
2.3 GCPII NA ÚROVNI PROTEÍNU:	10
2.3.1 Štruktúra GCPII.....	10
2.4 ENZÝMOVÁ AKTIVITA GCPII	12
2.4.1 α -glutamátkarboxypeptidázová aktivita:.....	12
2.4.2 γ -glutamátkarboxypeptidázová aktivita:	13
2.4.3 Inhibítory GCPII.....	14
2.5 FUNKCIE GCPII V ORGANIZME.	16
2.5.1 GCPII v nervovom systéme	16
2.5.1.1 Glutamát ako neurotransmitter	16
2.5.1.2 Glutamátová excitotoxicita.....	17
2.5.1.3 NAAG ako neurotransmitter	18
2.5.2 GCP II v prostate	19
2.6 HOMOLÓGY ĽUDSKEJ GLUTAMÁTKARBOXYPEPTIDÁZY II (hGCPII)	20
2.6.1 Paralógy ľudskej GCPII:	20
2.6.1.1 Ľudská glutamátkarboxypeptidáza III (hGCPIII).....	21
2.6.1.1.1 Štruktúra hGCPIII v porovnaní s hGCPII.....	22
2.6.1.1.2 Enzýmová aktivita hGCPIII.....	23
2.6.1.2 Prostate-Specific Membrane Antigen-like (PSMA-like).....	24
2.6.1.3 N-acetylated α -linked acidic dipeptidase-like (NAALADáza L)	24
2.6.2 Orthológy ľudskej GCPII.....	27
2.6.2.1 Potkania GCPII	27
2.6.2.2 Prasacia GCPII.....	27
2.6.2.3 Myšacia GCPII.....	28
3 CIELE PRÁCE.....	31
4 MATERIÁL A METÓDY	32
4.1 CHEMIKÁLIE, MÉDIA, ENZÝMY A ĎALŠÍ MATERIÁL.....	32
4.2 PRÍSTROJE	33
4.3 METÓDY.....	34
4.3.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR).....	34
4.3.2 Polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou (RT-PCR).....	35
4.3.3 Horizontálna agarózová elektroforéza.....	36
4.3.4 Extrakcia DNA z agarózového gélu	36

4.3.5	<i>TOPO TA-klonovanie</i>	36
4.3.6	<i>Štiepenie a ligácia DNA</i>	37
4.3.7	<i>Transformácia kompetentných baktérií E. coli TOP10</i>	37
4.3.8	<i>Minipreparácia plazmidovej DNA</i>	37
4.3.9	<i>Sekvenovanie plazmidovej DNA</i>	37
4.3.10	<i>Transfekcia hmyzích buniek a selekcia stabilnej bunecnej línie</i>	38
4.3.11	<i>Stanovenie počtu živých buniek užitím trypanovej modrej</i>	39
4.3.12	<i>Expresia rekombinantnej myšacej GCPIII(36-740)</i>	39
4.3.13	<i>Purifikácia rekombinantnej myšacej GCPIII afinitnou chromatografiou</i>	39
4.3.14	<i>Diskontinuálna elektroforéza v polyakrylamidovom géle za denaturujúcich a redukujúcich podmienok (SDS-PAGE)</i>	40
4.3.15	<i>Elektroprenos proteínov na nitrocelulóзовú membránu (western blot)</i>	41
4.3.16	<i>Farbenie polyakrylamidového gélu</i>	42
4.3.17	<i>Stanovenie koncentrácie proteínov podľa Bradfordovej</i>	42
4.3.18	<i>Radiometrické meranie NAAG-hydrolytickej aktivity</i>	42
4.3.19	<i>Tranzientná transfekcia cicavčích buniek HEH293offA2</i>	43
4.3.20	<i>Homogenizácia cicavčích buniek (príprava bunecného lyzátu)</i>	44
4.3.21	<i>Homogenizácia tkaniva a izolácia mRNA</i>	44
5	VÝSLEDKY	45
5.1	<i>IZOLÁCIA DNA MYŠACEJ GCPIII(1-740) Z TKANIVA</i>	45
5.2	<i>KLONOVANIE mGCPIII(1-740) DO VEKTORU pCRII-TOPO®</i>	46
5.3	<i>KLONOVANIE cDNA mGCPIII(36-740) DO VEKTORU pMT/Bip/Avi/TEV/hSR</i>	49
5.4	<i>KLONOVANIE DNA mGCPIII(1-740) DO VEKTORU pTRE-Tight</i>	51
5.5	<i>STANOVENIE ŠPECIFITY MONOKLONÁLNYCH PROTILÁTKOK PROTI MYŠACEJ GCPIII(1-740)</i>	53
5.6	<i>AFINITNÁ PURIFIKÁCIA REKOMBINANTNEJ MYŠACEJ GCPIII(36-740)</i>	55
5.7	<i>MERANIE ENZÝMOVEJ AKTIVITY mGCPIII</i>	55
6	DISKUSIA	57
7	ZÁVER	60
	ZOZNAM SKRATIEK	61
	PRÍLOHA	63
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	64
	ZOZNAM OBRÁZKOV	69
	ZOZNAM TABULIEK	70

English abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII, EC 3.4.17.21) is a type II transmembrane glycoprotein which has been discovered in nervous system as an enzyme responsible for the hydrolysis of neuropeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate to N-acetyl-L-aspartate and L-glutamate and that has been hypothesized to influence glutamatergic signaling processes. Except for brain, GCPII was mainly found in prostate, kidney, and small intestine. In small intestine, GCPII cleaves terminal glutamates from polyglutamylated folates facilitating thus absorption of dietary folates. In prostate, this enzyme is known as prostate-specific membrane antigen and is used as a cancer marker.

Mus musculus is an important model for studying GCPII and its homologs as a therapeutic target. While human GCPII and its paralog GCPIII are relatively well characterized, no biochemical study of their mouse orthologs is available. That is why mouse glutamate carboxypeptidase III (mGCPIII) was cloned, prepared by recombinant expression in insect cells and characterized.

We show that pure mouse GCPIII possesses α -glutamate carboxypeptidase activity which is effectively inhibited by specific inhibitor GCPII, 2-PMPA. We also analyzed sensitivity and specificity of monoclonal antibodies against mouse GCPIII. Immunoblots demonstrate that antibody GCP-04 recognizes human GCPII as well as human GCPIII and mouse GCPIII, but antibody GCP-3-02 recognizes only human GCPIII.

Key words: GCPII, GCPIII, 2-PMPA, glutamate, homologs

Slovenský abstrakt

Glutamátkarboxypeptidáza II (GCPII, EC 3.4.17.21) je transmembránovým glykoproteínom II typu, ktorý bol objavený v nervovom systéme na základe degradácie N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu na N-acetyl-L-aspartát a L-glutamát, a preto sa predpokladá jeho účasť na nervovej signalizácii. Okrem mozgu, GCPII bola objavená vo väčšej miere taktiež v prostate, obličkách a tenkom čreve. V tenkom čreve GCPII napomáha vstrebávaniu folátov z potravy tým, že odštiepuje koncové glutamáty z polyglutamylovaných folátov. V prostate nie je funkcia tohto proteínu doposiaľ známa, avšak využíva sa ako márkér rakoviny.

Mus musculus je dôležitým modelom pre štúdium GCPII a jej homológov ako terapeutického cieľa. Ľudská GCPII a jej paralóg GCPIII sú pomerne dobre charakterizované, zatiaľ čo žiadna biochemická štúdia o ich myších ortológoch nie je dostupná. Preto sme myšiaciu glutamátkarboxypeptidázu III (mGCPIII) naklonovali, pripravili rekombinantnou expresiou v hmyzích bunkách a charakterizovali.

Ukázali sme, že mGCPIII vykazuje α -glutamátkarboxypeptidázovú aktivitu, ktorá je inhibovateľná špecifickým inhibítorom GCPII, 2-PMPA. Taktiež sme testovali citlivosť a špecifitu monoklonálnych protilátok voči myšacej GCPIII. Imunochemická detekcia odhalila, že protilátka GCP-04 rozpoznáva ľudskú GCPII rovnako dobre ako myšiaciu GCPIII, na druhú stranu protilátka GCP-3-04 rozpoznáva iba ľudskú GCPIII.

Kľúčové slová: GCPII, GCPIII, 2-PMPA, glutamát, homológy

1 Predhovor

Glutamátkarboxypeptidáza II (GCPII, EC 3.4.17.21) je transmembránovým proteínom II. typu. Expresia tohto proteínu bola zaznamenaná predovšetkým v mozgu, prostate a v tenkom čreve. Na základe charakteristických vlastností glutamát karboxypeptidázy II v týchto tkanivách dostal tento proteín trojaké označenie. V mozgu je známy ako NAALA dipeptidáza (neskôr názov upravený na NAALADaza, z angl. N-Acetylated- α -Linked Acidic Dipeptidase), v prostate ako PSMA (z angl. Prostate-Specific Membrane Antigen) a v tenkom čreve ako folát hydroláza.

V centrálnej nervovej sústave GCPII hydrolyzuje neuropeptid N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) za uvoľňovania L-glutamátu, čím prispieva k zvýšeniu hladiny voľného glutamátu v synaptickej štrbine. Zvýšená koncentrácia tohto excitačného neurotransmiteru pôsobí na nervové bunky toxicky. Inhibícia GCPII sa ukázala byť neuroprotektívna v zvieracích modeloch. V tenkom čreve GCPII napomáha vstrebávaniu folátov získaných z potravy tým, že odštiepuje koncové glutamáty z polyglutamátového „chvosta“. V prostate funkcia GCPII je zatiaľ neznáma. Avšak výrazný nárast tohto proteínu bol pozorovaný v súvislosti s karcinómom prostaty, a preto je využívaný ako marker tohto ochorenia.

So vzrastajúcou dôležitosťou GCPII v liečbe a diagnostike nádorových aj neurodegeneratívnych ochorení sa stále viacej pozornosti upriamuje na homológy GCPII. Z paralogov sa do popredia dostávajú predovšetkým tie, ktoré vykazujú α -glutamátkarboxypeptidázovú aktivitu. Dôvodom je ich schopnosť kompenzovať túto aktivitu u organizmov, u ktorých je funkcia GCPII inhibovaná, prípadne u organizmov s vyradeným génom pre GCPII. Nielen táto skutočnosť, ale i ďalšie, doposiaľ neodhalené, charakteristiky paralogov GCPII by mohli výrazne pozmeniť princíp liečebno-diagnostických metód, a tým zároveň prispieť i k zlepšeniu vývoja nových liečiv.

Keďže jedným z najčastejších modelových organizmov na testovanie nových liečiv je myš, rozhodli sme sa naklonovať a charakterizovať myšací paralog GCPII, proteín glutamátkarboxypeptidázy III (GCPIII).

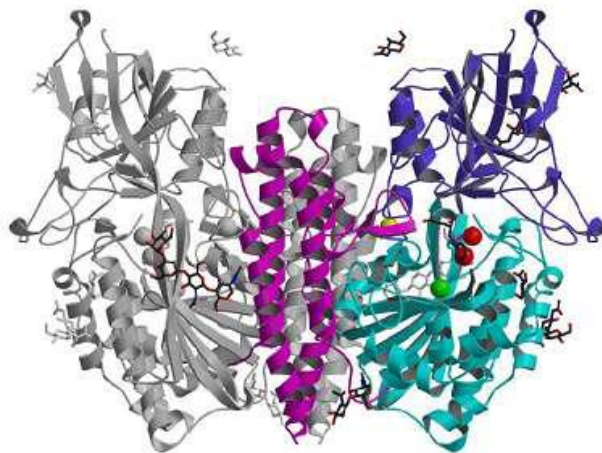
2.3 GCPII na úrovni proteínu:

GCPII je transmembránový glykoproteín II. typu o dĺžke 750 aminokyselín, patriacej do rodiny di-zinočnatých metalopeptidáz M28. Transmembránové proteíny II typu sú definované ako proteíny ktorých N-koniec je situovaný do cytosolu a C-koniec vyčnieva do extracelulárneho priestoru. Proteín GCPII je prítomný na povrchu buniek vo forme nekovalentného homodiméru o zdanlivej molekulovej hmotnosti 200 kDa [6,7,8].

2.3.1 Štruktúra GCPII

GCPII je tvorená krátkym N-terminálnym cytoplazmatickým regiónom (aminokyseliny 1-18), jedným transmembránovým regiónom bohatým na hydrofóbne aminokyselinové zvyšky (aminokyseliny 19-43) a veľkým extracelulárnym regiónom na C-konci (aminokyseliny 44-750) [6]. Cytoplazmatický región obsahuje motív rozpoznávaný pri endocytóze-¹MXXXL⁵ (kde X je akákoľvek aminokyselina) [9] a väzbové miesto pre filamín A, ktorý stabilizuje GCPII v membráne [10].

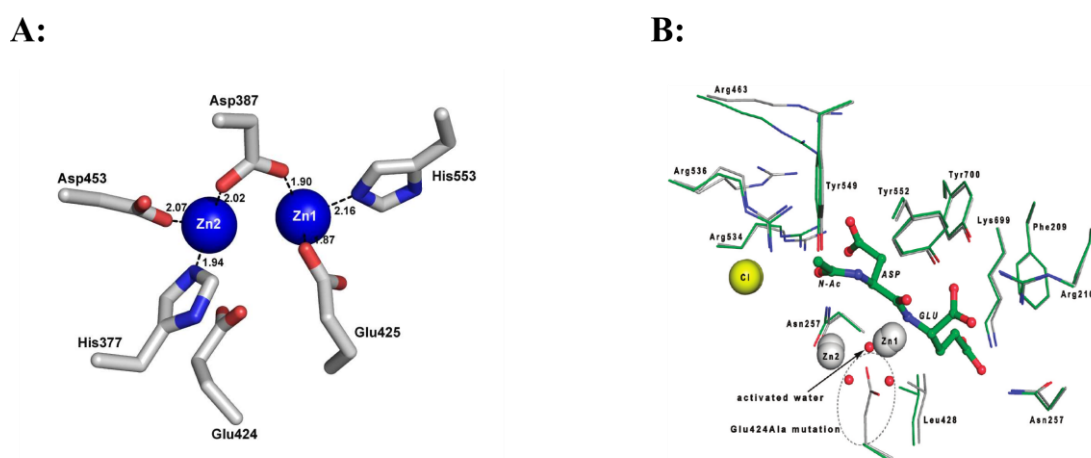
V roku 2005 skupina Dr. Bjorkmanovej rozlúštila kryštálovú štruktúru GCPII. Zistili, že GCPII je tvorená tromi doménami v extracelulárnom regióne, a to: proteázovú doménu (doména I, aminokyseliny 57-116, 352-590), apikálnu doménu (doména II, aminokyseliny 117-351) a C-koncovú doménu (doména III, aminokyseliny 591-750) (obr. 2) [11]. Trojrozmerná štruktúra GCPII ako voľného enzýmu, tak i v komplexe so substrátom, inhibítorom alebo produktom štiepenia bola následne preštudovaná v sérii prác Bařinkou *et al.* [12,13,14]. Výsledky je možné zhrnúť tak, že všetky tri domény sa podieľajú na rozpoznaní substrátu a sú preto nutné pre enzýmovú aktivitu proteínu.[11,12].



Obr. 2: Kryštálová štruktúra extracelulárnej časti homodiméru GCPII.

Jeden monomér je zobrazený šedo a druhý je farebne rozlíšený na jednotlivé domény -apikálna doména silno modrá, proteázová doména slabomodrá a C-koncová doména fialová. Zinočnaté ióny v aktívnom mieste enzýmu sú znázornené červenými guľôčkami, chloridový anión zelený a vápenatý kation žltý. Na obrázku sú zobrazené i glykozilácie v tyčinkovom prevedení. Prevzaté z [15].

Kedže GCPII je metaloproteín, je potrebné zmieniť, že v aktívnom mieste obsahuje dva Zn^{2+} ióny, ktoré sú nevyhnutné pre enzýmovú aktivitu. Tieto ióny sú od seba vzdialené 3,3 Å a stabilizované voľnými elektrónovými párami hydroxidového aniónu, ktorý je umiestnený asymetricky voči obom zinočnatým iónom (v prípade nenaviazaného substrátu). Zn1 ión, koordinovaný postrannými reťazcami Asp387, Glu425 a His553, slúži ako katalytický kov podieľajúci sa na polarizácii väzby uhlík-kyslík, resp. karbonylovej skupiny prislúchajúcej substrátu. Zn2 ión, koordinovaný postrannými reťazcami His377, Asp387, a Asp453 je označovaný ako ko-katalytický kov podieľajúci sa na stabilizácii prechodového stavu komplexu GCPII-substrát (obr. 3, panel A). [16]



Obr. 3: Panel A: Aminokyseliny koordinujúce zinky v aktívnom mieste GCPII. Atómy zinku, zobrazené modro, sú koordinované histidínmi a kyslými aminokyselinami. Na obrázku je znázornený tiež katalytický glutamát 424. Aminokyseliny sú v „tyčinkovom“ zobrazení a atómy uhlíku sú šedé, atómy kyslíku červené a atómy dusíku modré. Prevzaté z [17].

Panel B: Štruktúrne porovnanie aktívneho miesta nemutovaného proteínu GCPII a mutantu GCPII (E424A) v komplexe s prirodzeným substrátom NAAG. Štruktúra komplexu GCPII (E424A)-NAAG (uhlíkové atómy znázornené zeleno) bola využitá pre predikciu aktívneho miesta nemutovaného proteínu GCPII (uhlíkové atómy znázornené šedo). Prerušovaná čiara predstavuje dôležité nekovalentné interakcie. Atómy zinku sú zobrazené ako šedé guľôčky, atómy chlóru žlté guľôčky a molekula vody ako červené guľôčky. Aminokyseliny podieľajúce sa na koordinácii substrátu sú znázornené ako „tyčinky“ a samotný substrát je v „tyčinkovo-guľôčkovom prevedení“, v ktorom sú atómy kyslíka zobrazené červeno a atómy dusíka modro Prevzaté z [16].

Okrem zinočnatých iónov, štruktúra GCPII ukrýva aj ďalšie dva ióny dôležité pre jej enzýmovú aktivitu, a to chloridový a vápenatý (obr. 2, str. 10). Tieto ióny sa podieľajú na stabilite proteínu [12].

Zásadnú úlohu v štruktúre GCPII zohráva katalytický glutamát 424, ktorého substitúcia za alanín úplne odstránila hydrolytickú aktivitu tohto enzýmu. Nenahraditeľnosť Glu424 spočíva v tom, že slúži ako donor-akceptor vodíkového iónu pri hydrolýze peptidovej väzby (obr. 3, panel B) [16].

S1' väzbové miesto GCPII je definované aminokyselinovými zvyškami Phe209, Arg210, Asn257, Gly427, Leu428, Gly518, Lys699 a Tyr700. Posledné dve aminokyseliny sú súčasťou glutarátového senzoru. Pomenovanie glutarátový senzor dostal na základe interakcie lysínu a tyrosínu s C-koncom substrátu, ktorým je ako inak glutarát alebo glutamát. Glutarátový senzor predstavuje pohyblivú slučku, ktorá sa môže vyskytovať v rôznych konformáciách v závislosti na priestorovej štruktúre viazaného substrátu [12, 14].

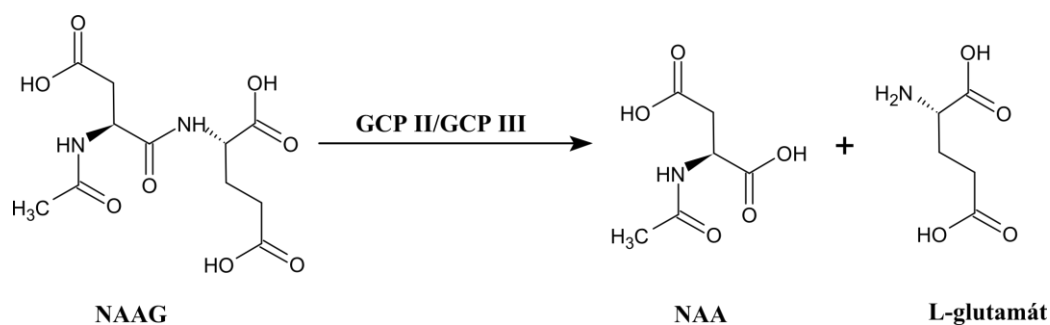
S1 väzbové miesto GCPII je definované aminokyselinovými zvyškami Ser454, Glu 457, Asp465, Asn519, Gly548, Tyr459 a Tyr552. Charakteristickou črtou tohto väzbového miesta je skupina troch kladne nabitých arginínov: Arg463, Arg543 a Arg536, ktoré určujú selektívnosť enzýmu voči negatívne nabitým zvyškom umiestneným v predposlednej pozícii substrátu [12,14].

GCPII je silno glykozilovaná a jej extracelulárny región obsahuje 10 N-glykozilačných miest: N51, N76, N121, N140, N153, N195, N336, N459, N476, N638, pričom N336, N459 a N476 sú súčasťou katalytickej domény. Glykozilácia je nevyhnutná pre správne zbalenie proteínu, sekreciu a enzýmovú aktivitu GCPII [12,18,19]. Schopnosť GCPII hydrolyzovať peptidovú väzbu pravdepodobne ovplyvňuje i skutočnosť, či sa tento proteín vyskytuje vo forme monoméru alebo diméru [8]. Procesu dimerizácie sa zúčastňuje C-terminálna doména jedného monoméru, proteázová a apikálna doména druhého monoméru a napokon i Ca^{2+} kation [12]. Ión Ca^{2+} stabilizuje slučku jedného monoméru pozostávajúcu z troch tyrosínových zvyškov, ktoré utvárajú hydrofóbnu kapsu. Táto slučka interaguje s tyrosínovým zvyškom druhého monoméru a stabilizuje tak spojenie oboch monomérov [12].

2.4 Enzýmová aktivita GCPII

2.4.1 *α -glutamátkarboxypeptidázová aktivita:*

Prvou známou aktivitou GCPII je hydrolýza NAAG, pri ktorej dochádza k štiepeniu α -peptidovej väzby v neurotransmitere N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) za vzniku L-glutamátu a N-acetyl-L-aspartátu (obr. 4, str. 13) [20].



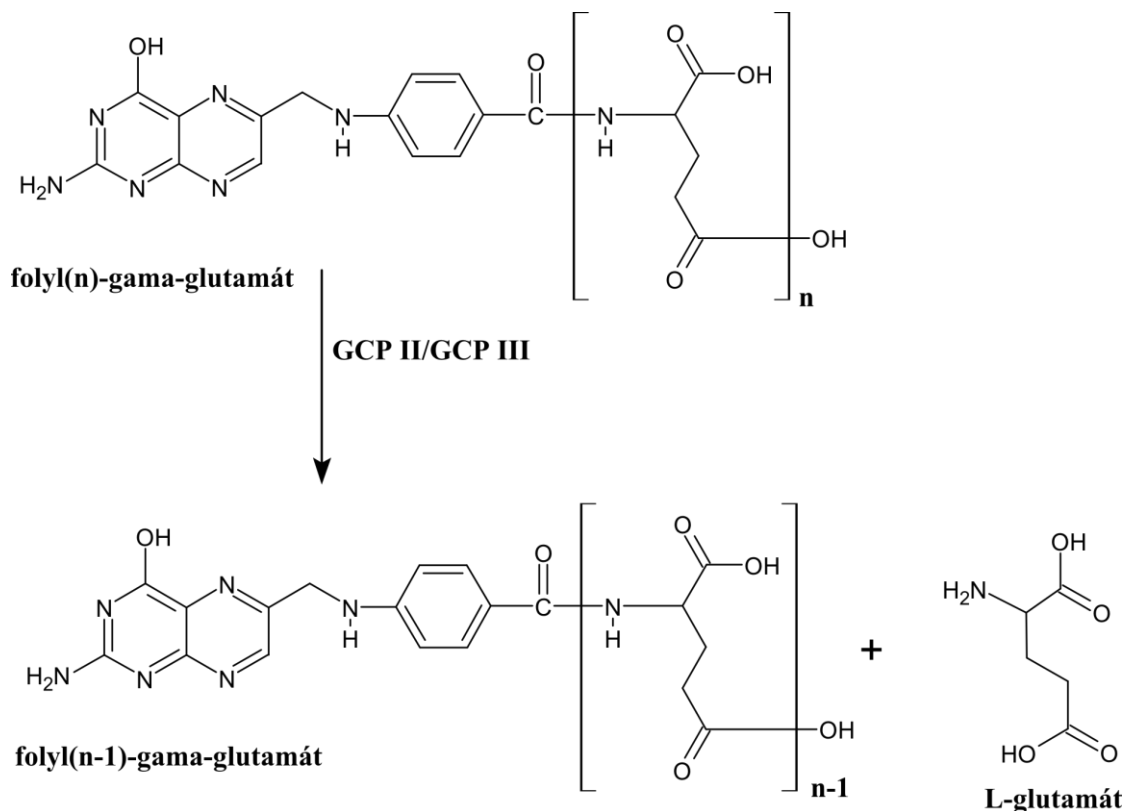
Obr. 4: Štepenie N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG)

Štepením N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG) vzniká N-acetyl-L-aspartát (NAA) a L-glutamát

NAAG predstavuje najrozšírenejší peptidový neurotransmitter v centrálnej nervovej sústave (CNS) cicavcov [21], ktorý sprostredkováva prenos nervového vzruchu medzi jednotlivými neurónmi a GCPII sa svojou enzymatickou aktivitou podieľa na jeho odbúravaní v synaptickej štrbine [22].

2.4.2 γ -glutamátkarboxypeptidázová aktivita:

Okrem α -glutamátkarboxypeptidázovej aktivity vykazuje GCPII aj folát hydrolázovú aktivitu. Folát hydrolázová aktivita spočíva v schopnosti odštiepenia terminálneho glutamátu z poly- γ -glutamylovaného folátu či methotrexátu (obr. 5) [20,23].



Obr. 5: Štepenie folyl(n)- γ -L-glutamátu.

Štepením folyl(n)- γ -L-glutamátu vzniká folyl(n-1)- γ -L-glutamát a L-glutamát.

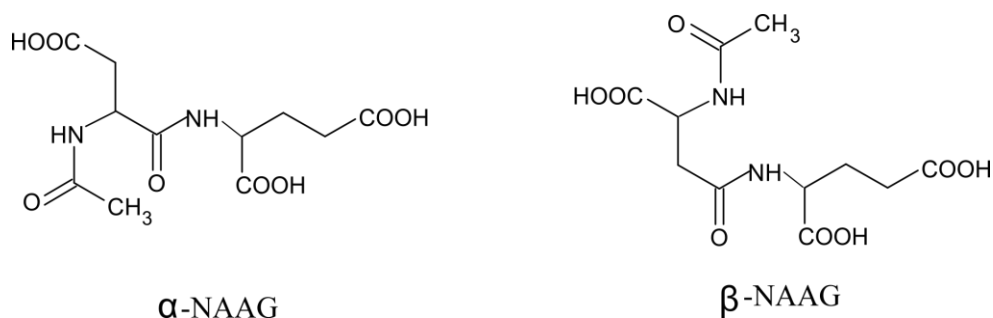
Folát, uvoľnený postupným odštepovaním glutamátu z polyglutamátového reťazca, je prostredníctvom špecifických receptorov prenášaný cez membránu buniek črevného epitelu, kde dochádza k resyntetizovaniu polyglutamátového reťazca [23]. Folát, známy tiež ako vitamín B9, zohráva v bunke dôležitú úlohu pri syntéze aminokyselín a purínových báz nukleových kyselín, pretože slúži ako koenzým mnohých enzýmov a ako donor jednohlíkatých zvyškov [24]. GCPII sa týmto spôsobom podieľa na vstrebávaní folátov z potravy.

V súčasnosti sa mnoho výskumných tímov sústreďuje na analýzu substrátovej špecificity GCPII. Barinka *et al.* testovali enzýmovú aktivitu GCPII za použitia knižnice dipeptidov Ac-Asp-Xxx, Ac-Xxx-Glu a Ac-Xxx-Met a objavili 4 nové substráty: Ac-Glu-Met, Ac-Asp-Met, Ac-Ala-Gly a Ac-Ala-Met. Pozoruhodné na tomto objave je, že C-terminálnou aminokyselinou nemusí byť vždy glutamát. V tomto prípade je treba tiež podotknúť, že substráty s C-koncovým methionínom sú štepené s menšou efektivitou [25]. Na základe analógie so známymi substrátmi GCPII mohli byť navrhnuté a testované rôzne druhy inhibítorov, ktoré sa ukazujú byť zaujímavé [26].

2.4.3 Inhibitory GCPII

Fyziologická a potenciálna patologická funkcia GCPII v mozgu (kap. 2.6.1) a jej výskyt pri rakovine prostaty (kap. 2.6.2) boli hlavné motivácie výskumníkov pre intenzívny vývoj potentných a farmako-kineticky vhodných inhibítorov GCPII [27].

Prvé cesty pri hľadaní a syntéze nových inhibítorov viedli k analógom substrátu GCPII, NAAG (N-acetyl- α -aspartyl-glutamát). Mnohé tímy zistili, že β -NAAG (N-acetyl- β -aspartyl-glutamát) nepodlieha hydrolýze, čo naznačuje, že môže slúžiť ako inhibítor GCPII (obr. 6).



Obr. 6: N-acetyl- α -aspartyl-glutamát a N-acetyl- β -aspartyl-glutamát. Hodnota K_i pre β -NAAG je 700nM. Prevzaté a upravené podľa [17].

Prvý účinný inhibítor GCPII bol navrhnutý v roku 1996 Jacksonom *et al.*, ktorí pri svojom návrhu inhibítora zamerali svoju pozornosť na menšie molekuly s takými funkčnými skupinami, o ktorých sa vedelo, že inhibujú metalopeptidázy. Syntézou

a testovaním rôznych hydroxyfosfínylových derivátov, zistil, že práve 2-PMPA {[2-(fosfonomethyl)pentándiová] kyselina} má najväčšiu schopnosť inhibície (obr. 7, panel A, str. 16,) [26]. Fosfonátová skupina 2-PMPA silno chelatuje zinočnaté ióny v aktívnom mieste enzýmu a pentándiová kyselina je stabilizovaná interakciou s miestom v GCPII rozpoznávajúce C-koncový glutamát [28]. Ďalšou prednosťou molekuly 2-PMPA je vysoká selektivita voči GCPII [27]. Neskoršie štúdie tohto inhibítora ukázali, že jeho dva enantioméry nemajú rovnakú inhibičnú schopnosť. S-enantiomér (zhodná konfigurácia s L-glutamátom), ktorý je v aktívnom mieste enzýmu viazaný pevnejšie ako R-enantiomér, bol hodnotený ako účinnejší inhibítor [29].

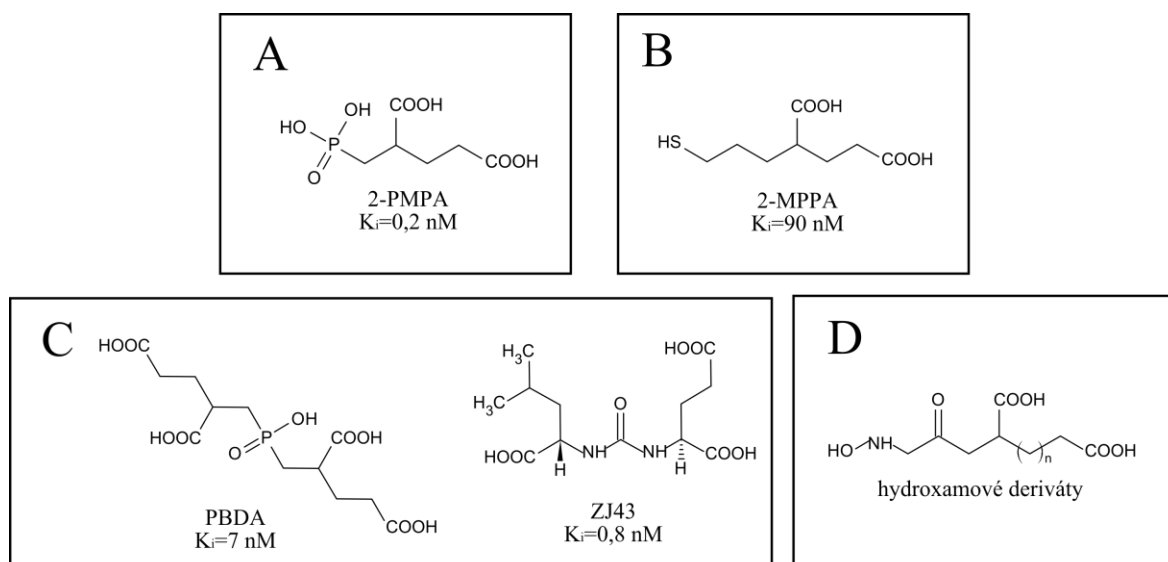
Na druhú stranu však farmako-kinetické vlastnosti 2-PMPA boli nepostačujúce, a preto rástla snaha výskumných tímov i farmaceutických firiem o objavenie ďalších efektívnejších inhibítrov. Na základe tejto snahy sa vznikla druhá generácia inhibítrov. Túto generáciu možno rozdeliť do niekoľkých skupín a to:

1. thiolové a indol-thiolové deriváty
2. PBDA a inhibítory ako deriváty močoviny
3. hydroxamátové deriváty

Hlavným predstaviteľom prvej skupiny je 2-MPPA [2-(3-merkaptopropyl)pentándiová kyselina] (obr. 7, panel B, str. 16) známa tiež ako GPI5693. Táto molekula predstavuje vylepšenie doposiaľ navrhnutých inhibítrov, pretože obsahuje menej polárnu thioalkylovú skupinu, ktorá zvyšuje orálnu dostupnosť [30].

Druhá skupina derivátov, zahŕňa analógy NAAG, v ktorých je odstránená amidová väzba medzi asparagovou kyselinou a glutamátom a taktiež N-acetylová skupina. Z mnohých syntetizovaných zlúčenín bola najúčinnější zlučenina 4,4'-fosfiniková(bután-1,3-dikarboxylová)kyselina (PBDA). Jej modifikáciou, nahradením skupiny $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2$ molekulou močoviny, vznikli ďalšie inhibítory, ako napríklad ZJ43 (obr. 7, panel C, str. 16) [31,32].

Tretia skupina derivátov bola navrhnutá na základe analógie s 2-PMPA. Hydroxymatová skupina v molekule týchto derivátov, podobne ako fosfonátová skupina u 2-PMPA, chelatuje Zn^{2+} v aktívnom mieste enzýmu (obr. 7, panel D, str. 16) [33].



Obr. 7: Prehľad inhibítorov GCPII.

Panel A: 2-PMPA {[2-(fosfonometyl)pentándiová] kyselina}, $K_i = 0,2$ nM;

Panel B: Inhibítor patriaci do prvej skupiny derivátov: 2-MPPA, [2-(3-merkaptopropyl)pentándiová kyselina], jeden z účinných inhibítorov GCPII, $K_i = 90$ nM. Prevzaté a upravené podľa [30].

Panel C: Inhibítory patriace do druhej skupiny derivátov: PBDA [4,4'-fosfiniková(bután-1,3-dikarboxylová kyselina)], $K_i = 7$ nM; ZJ43 {(S)-2-[3-[(S)-1-karboxy-3-methylbutyl]ureo]pentándiová kyselina}, $K_i = 0,8$ nM. Prevzaté a upravené podľa [32].

Panel D: Hydroxymatové deriváty. Účinnosť inhibície závisí na počte metylových skupín medzi hydroxymátovou skupinou a pentándiovou kyselinou, $n=1$ $IC_{50} = 220$ nM, $n=3$ $IC_{50} = 940$ nM. Prevzaté a upravené podľa [33].

2.5 Funkcie GCPII v organizme.

2.5.1 GCPII v nervovom systéme

GCPII, ako α -glutamátkarboxypeptidáza, zohráva dôležitú úlohu v CNS, kde vystupuje ako faktor ovplyvňujúci rovnováhu medzi neurotransmitermi NAAG a glutamátom [34].

2.5.1.1 Glutamát ako neurotransmitter

Glutamát, hlavný excitačný neurotransmitter v CNS, je zodpovedný za signalizáciu medzi neurónmi, schopnosť učenia sa a vývoj pamäti [35]. Molekuly glutamátu sú lokalizované v sekrečných váčkoch v presynaptických neurónoch, pripravené na svoje uvoľnenie po príslušnom nervovom stimule. Po exocytóze týchto váčkov, molekuly glutamátu difundujú cez synaptickú štrbinu a viažu sa na glutamátové receptory v postsynaptickej i presynaptickej membráne neurónov a v membráne gliových buniek. Molekuly glutamátu uvoľnené do synaptickej štrbiny, sú taktiež spätne odčerpávané transportérmi na neurónoch a astrocytoch do vnútrobunkového priestoru [35].

Glutamátové receptory sú reprezentované dvomi triedami receptorov, a to ionotropnými a metabotropnými.

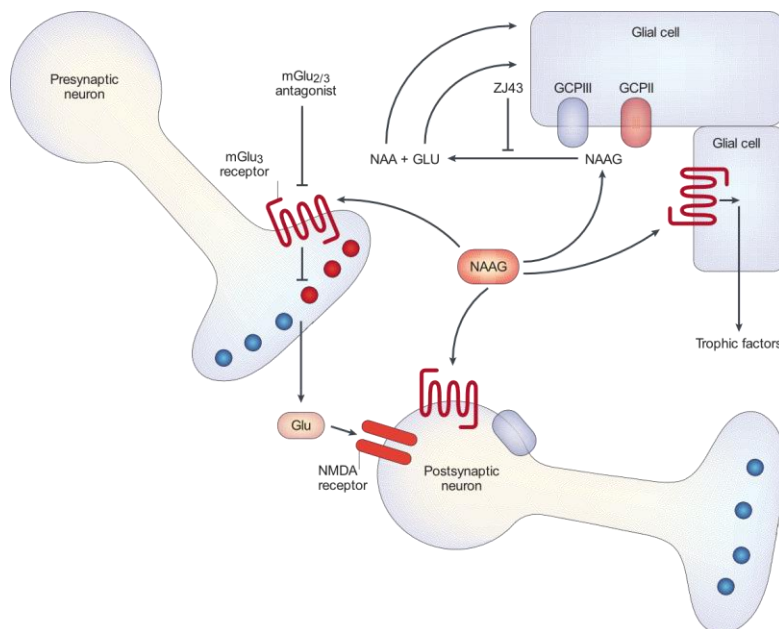
Ionotropné receptory, vyskytujúce sa iba na postsynaptických neurónoch, možno ďalej deliť na AMPA, NMDA a kainátové receptory. Väzba glutamátu na AMPA a kainátové receptory vyvoláva transport Na^+ iónov do bunky a K^+ iónov z bunky. V prípade NMDA receptorov dochádza k transportu vápenatých a sodných iónov do postsynaptického neurónu [36]. Avšak pre maximálne otvorenie iónového kanálu NMDA receptoru nestačí len väzba glutamátu, ale súčasne sú vyžadované ďalšie dva podnety, a to väzba L-glycínu alebo D-serínu (pôsobia ako ko-agonistia glutamátu) a čiastočná depolarizácia membrány. Depolarizácia membrány je potrebná na uvoľnenie katiónu horčíka, ktorý pri pokojovom membránovom potenciály blokuje iónový kanál NMDA receptora. Aktivácia všetkých troch kanálov vedie k depolarizácii postsynaptického neurónu [37].

Metabotropné receptory (mGluR), asociované s G-proteínmi, regulujú produkciu druhých poslov. mGluR možno rozdeliť do troch skupín. I. skupinu receptorov (mGluR1 a mGluR5), ktoré stimulujú produkciu inositol-1,4,5-trifosfátu a diacylglycerolu, čo aktivuje proteínkinázu C a následné uvoľnenie Ca^{2+} do cytozolu. Táto skupina receptorov súčasne aktivuje i draselné kanály, v dôsledku čoho dochádza k uvoľneniu draselných iónov z bunky, zvýšeniu napätia a depolarizácii membrány. Jedná sa teda o excitačné receptory. Naopak II. a III. skupina mGluR sú inhibičné receptory (napr. mGluR2, mGluR3), prevažne presynaptické, ktoré znižujú napätie na membráne a spôsobujú tak hyprepolarizáciu, tým, že svojou aktiváciou inhibujú činnosť adenylátcyklázy [31].

2.5.1.2 Glutamátová excitotoxicita

Za normálnych fyziologických podmienok sa pri prenose nervového vzruchu medzi neurónmi koncentrácia glutamátu uvoľneného do synaptickej štrbiny náhle zvýši, ale v priebehu niekoľkých milisekúnd opäť klesne na základnú úroveň. V prípade, že abnormálna hladina glutamátu zotrvá v synaptickej štrbine po dlhšiu dobu, dochádza k nadmernej aktivácii ionotropných receptorov, čo podnecuje proces vedúci k odumieraniu neurónov. Tento proces je často označovaný ako glutamátová excitotoxicita (obr. 8, str. 18) [35]. Väzba glutamátu na NMDA receptory vyvolá nadmerný prenos vápenatých a sodných iónov do postsynaptickej bunky. Vstup sodných iónov do bunky vyvolá zmenu membránového potenciálu a spôsobí tak jej depolarizáciu. Prebytočný vápnik v cytozole zasa spôsobuje apoptózu, na ktorej sa podieľajú proteázy, lipázy, NO syntáza a rôzne ďalšie enzýmy [38].

Množstvo Ca^{2+} v postsynaptickej kompartimente sa okrem otvárania NMDA receptorov väzbou glutamátu môže zvýšiť aj aktiváciou I. skupiny mGluR, ktoré uvoľňujú vápenaté ióny z vnútorných zdrojov cez fosfatidyl-inozitolovú kaskádu [36].



Obr. 8: Glutamátová excitotoxicita.

N-acetyl-aspartyl-glutamát (NAAG) uvoľnený z presynaptickej bunky je v synaptickej štrbine štiepený GCPII a GCPIII za vzniku glutamátu (Glu). Glutamát sa viaže na NMDA receptory v postsynaptickej bunke a aktivácia týchto receptorov vyvolá tok vápenatých iónov do bunky. V prípade zvýšenej hladiny glutamátu dochádza k nadmernej aktivácii NMDA receptorov, čo vedie k apoptóze. Inhibícia GCPII a GCPIII inhibítorom ZJ43 s javí ako neuroprotektívna. NAAG sa okrem NMDA receptorov môže viazať i na mGluR3 receptory na presynaptickej i postsynaptickej neurónoch či na gliových bunkách. Väzba NAAG na mGluR3 receptory na gliových bunkách spôsobuje uvoľnenie neuroprotektívneho rastového faktoru. Väzba NAAG na mGluR3 receptory na presynaptickej neuróne zasa inhibuje uvoľňovanie glutamátu. Prevzaté z [31].

2.5.1.3 NAAG ako neurotransmitter

NAAG je dipeptid nájdený v centrálnej i periférnej nervovej sústave cicavcov v milimolárnej koncentrácii [21]. Pomocou imunohistochemie bol lokalizovaný v neurónoch a gliových bunkách, kde dochádza k jeho syntéze z N-acetylaspartátu a glutamátu, ktorú katalyzuje N-acetylaspartát-L-glutamát ligáza [34]. Naopak, v synaptickej štrbine je NAAG odbúravaný enzýmom GCPII, ktorý je exprimovaný na povrchu astrocytov [20,39]. NAAG môže však vystupovať nielen ako neuropeptid, ale aj ako glutamátový prekurzor, pretože glutamát uvoľnený hydrolýzou NAAG sa viaže na glutamátové receptory a aktivuje ich [34]. Ako už bolo spomenuté, príliš veľké uvoľňovanie glutamátu pôsobí na nervové bunky toxicky [35].

NAAG je uvoľňovaný do synaptickej štrbiny, kde vystupuje ako špecifický a selektívny agonista mGluR3 receptorov [40]. Pri ďalšom skúmaní NAAG sa zistilo, že vystupuje aj ako čiastočný agonista (nízka koncentrácia NAAG) a antagonist (vysoká koncentrácia NAAG) NMDA receptorov [41].

Pri výskume akútnych či chronických neurodegeneratívnych ochorení sa mGluR2 a mGluR3 receptory stali potenciálnym cieľom výskumu, pretože ich aktivácia poskytuje bunkám nervového systému ochranu voči excitotoxickej smrti (kap. 2.5.1.2) [42]. Hlavným mechanizmom neuroprotektie je inhibícia NAAG hydrolytickej aktivity GCPII, pričom dochádza k zvýšeniu koncentrácie NAAG v nervovom tkanive a následnej aktivácii mGlu3 presynaptických receptorov a blokácii NMDA receptorov [27]. Nadmerné množstvo NAAG nielenže vyvolá inhibíciu uvoľnenia neurotransmiteru (glutamát, GABA), ale dokonca spôsobuje i uvoľnenie neuroprotektívneho rastového a trofického faktoru aktiváciou mGluR3 receptorov na gliových bunkách (obr. 8, str.18) [31].

2.5.2 GCP II v prostate

Okrem neurodegeneratívnych ochorení sú v popredí záujmu výskumných tímov aj farmaceutických firiem i onkologické ochorenia. V prípade rakoviny prostaty predstavuje viac ako 95 % všetkých nádorov adenokarcinómy, produkujúce GCPII vo zvýšenej miere [43,44].

Výskyt GCPII v bunkách prostaty je mapovaný prostredníctvom protilátky 7E11-C5.3. Táto protilátka rozpoznáva intracelulárny epitop GCPII (aminokyseliny 1-6) [45], ktorý je však nedostupný až do chvíle, kým nepríde k rozrušeniu bunkovej steny. To znamená, že 7E11-C5.3 nerozpoznáva živé bunky, ale iba bunky mŕtve [46]. I napriek tejto skutočnosti, ktorá by sa mohla na prvý pohľad javiť ako prekážka, sa táto protilátka stala základom novej zobrazovacej techniky ProstaScint Scan [44]. Jedná sa o protilátku 7E11-C5.3 značenú indiom (In)111 s polčasom života 2,8 dní, ktorú je možné detegovať gama fotoaparátom. Tento imunokonjugát, ¹¹¹In-CYT-356, je známy pod komerčným názvom ProstaScint®. Účinnosť tejto protilátky pri zobrazovaní nádorov spočíva v tom, že podstatná časť nádorových buniek po svojom odumretí podlieha lýze, a tým dochádza k sprístupneniu intracelulárneho epitopu [46].

Lopes *et. al* vo svojich šúdiach odhalili, že CYT-356 len veľmi slabo interaguje so zdravými bunkami prostaty, zatiaľ čo s ostatnými zdravými bunkami v tele neinteraguje takmer vôbec [47]. Imunohistologická analýza nádorových tkanív zasa prezradila vysokú selektivitu imunokonjugátu voči adenokarcinómu prostaty, hoci žiadna reaktivita nebola zaznamenaná pre nádorové bunky iných tkanív. Táto selektivita bola využitá pre primárnu aplikáciu imunokonjugátu pri diagnóze výskytu adenokarcinómu prostaty [44, 47]. Včasná detekcia umožňuje odhaliť karcinóm, ktorý sa vo forme metastáz ešte nerozšíril do okolitých tkanív a je možné ho úspešne liečiť [44].

Laboratórium prof. Bandera z New Yorku pripravilo druhú generáciu monoklonálnych protilátok J591, J553, J415 a E99, ktoré už rozpoznávajú extracelulárny epitop GCPII, čo umožňuje týmto protilátkam väzbu na živé bunky [48,49]. Modifikácia protilátky J591 bola využitá ako ďalšia stratégia pri detekcii nádorov. Deimunizovaná J591 je dostatočne citlivá a špecifická na to, aby okrem metastáz v mäkkých tkanivách rozpoznala i metastázy v kostiach [49]. Jej výhodou je, že po jej vstupe do organizmu nevzniká imunitná odpoveď, pretože myšacie aminokyselinové sekvencie Fc fragmentu boli nahradené ľudskými. Štúdie ďalej ukazujú, že J591 možno použiť i pre cieleňú terapiu, kedy J591 dopraví do nádorových buniek cytotoxický izotop, a to bez vedľajších účinkov na zdravé bunky [49]. Aby táto protilátka bola schopná chelatovať radionuklidy, bola k nej kovalentne naviazaná kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová (DOTA). Takto modifikovaná protilátka sa nachádza v prvej fáze klinických testov [50].

Vo vývoji protilátok rozpoznávajúce extracelulárnu časť proteínu GCPII pokračoval i Murphy *et al.*, ktorí pripravili tieto protilátky 3F5.4G6, 3E11, 3C2, 4E10-1.14, 3C9 a 1G3 [51].

Predpokladá sa, že protilátky viažuce sa na extracelulárny epitop GCPII dramaticky zosilnia citlivosť zobrazovania nádorov v prostate, pretože rozpoznajú väčší počet buniek. Na druhú stranu, by však mala zostať zachovaná ich špecifita voči karcinómu prostaty, tzn. že by sa nemali viazať na bunky iných tkanív, obsahujúce GCPII.

2.6 Homológy ľudskej glutamátcarboxypeptidázy II (hGCPII)

Na úvod tejto časti je nutné presne definovať niektoré pojmy týkajúce sa homológie proteínov. Podľa Fitcha je

Homológia - príbuznosť dvoch znakov, ktoré pochádzajú zo spoločného predchádzajúceho znaku.

Paralógia - príbuznosť dvoch homológnych znakov pochádzajúcich z duplikácie génu.

Ortológia - príbuznosť dvoch znakov, ktorá vznikla oddelením dvoch biologických druhov zo spoločného predka [52].

2.6.1 Paralógy ľudskej GCPII

S ohľadom na výskyt ochorení, v ktorých sa uplatňuje GCPII, je zrejmé, že adekvátna diagnostika a liečba je zásadným zdravotníckym problémom. Základným krokom k ďalšiemu vývoji v tejto oblasti je dokonale porozumieť ochoreniu, správne ho

stanoviť a lokalizovať. Doposiaľ používané metódy často zlyhávajú alebo sú natoľko nepresné, že ich možno použiť len na orientačné stanovenie. Po dlhú dobu sa nepoznala príčina ich nízkej účinnosti, ale s hľadaním nových markerov pre jednotlivé ochorenia, prišlo k objasneniu tejto príčiny. Pri hľadaní konkrétnych „indikátorov“ ochorení boli odhalené i ďalšie proteíny, často paralógy príslušného „indikátoru“. Ukázalo sa, že skúmanie paralógov zvoleného markeru na biochemickej úrovni má svoje opodstatnenie, pretože tieto paralógy môžu disponovať rovnakými vlastnosťami ako sú vlastnosti markeru, čo ruší jeho funkciu v diagnostike a vedie k falošným pozitívnym výsledkom. Konkrétnym príkladom je pokles špecificity protilátky používanej na rozlíšenie a lokalizáciu markera v tkanive. S týmto problémom sa stretávame aj u GCPII pri hodnotení jej výskytu v nádorových bunkách pomocou protilátok. Nízka špecificita protilátky vnáša chybu do meraní, ktorá sa v konečnom dôsledku prejaví chybnou diagnózou a napokon i nesprávnou liečbou pacienta.

2.6.1.1 Ľudská glutamátcarboxypeptidáza III (hGCPIII)

Gén, NAALAD2, kódujúci hGCPIII, je lokalizovaný na 11 chromozóme rovnako ako gén pre hGCPII, presnejšie v oblasti 11q14.3-q21 [53]. hGCPIII je 740 aminokyselín dlhý transmembránový glykoproteín. Predikovaná molekulová hmotnosť proteínu bez postranslačných modifikácií je 83 kDa [53]. Tento proteín patrí do rodiny metalopeptidáz rovnako ako hGCPII, transferínový receptor či acetyltransferáza. Obsahuje sedem potenciálnych N-glykozylačných miest a má 67 % identitu a 81 % podobnosť s hGCPII (obr.12, str. 26) [54].

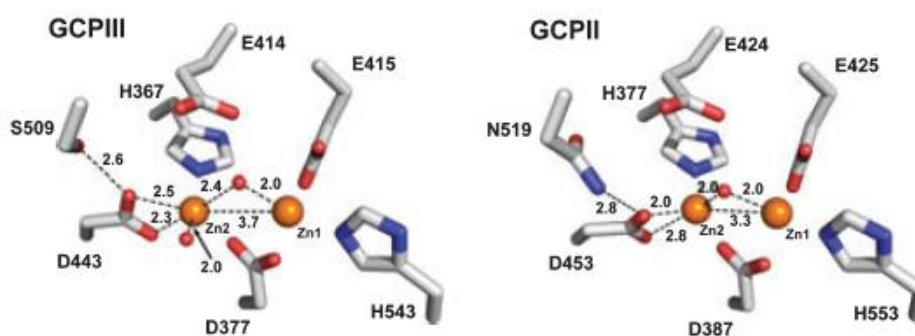
Expresia hGCPIII na proteínovej úrovni nebola doposiaľ objasnená z dôvodu nedostatku špecifických protilátok voči tomuto proteínu. Bežným javom, ktorý ruší stanovenie hGCPIII v jednotlivých tkanivách je kros-reaktivita protilátok s hGCPII. Touto sa vyznačuje i protilátka GCP-04, ktorá rozpoznáva extracelulárny epitop hGCPII tvorený aminokyselinami 100-104, ale i epitop hGCPIII, i keď asi s desaťkrát nižšou afinitou. Príčinou tejto kros-reaktivity je vysoká podobnosť aminokyselinových úsekov rozpoznávaných touto protilátkou. Z obr. 9 na str. 22 je zrejmé, že v epitope rozpoznávanom GCP-04 je v hGCPIII v porovnaní hGCPII iba jedna aminokyselinová substitúcia Glu102→Lys92, ktorá pravdepodobne spôsobuje pokles afinity protilátky GCP-04 voči hGCPIII [39,54].



Obr. 9: Porovnanie epitopov u Ľudskej GCPII a GCPIII, rozpoznávaných monoklonálnou protilátkou GCP-04. V epitope hGCPII je viditeľná jedno aminokyselinová zámena kyseliny glutámovej za lyzín, ktorá ovplyvňuje afinitu protilátky GCP-04 voči hGCPIII. Nepublikované dáta (František Sedlák)

2.6.1.1.1 Štruktúra hGCPIII v porovnaní s hGCPII

Čo sa týka štruktúrnych vlastností, v roku 2009 Hlouchová *et al.* rozriešili štruktúru extracelulárneho regiónu hGCPIII(36-740). Tento región je tvorený proteázovou (aminokyseliny 46-106 a 342-580), apikálnou (aminokyseliny 107-341) a helikálnou doménou (aminokyseliny 581-740). Mapa elektrónových hustôt prezradila prítomnosť dvoch zinočnatých kovov aktívnom mieste hGCPIII [56]. Rovnako ako v prípade hGCPII je Zn1 ión koordinovaný aminokyselinovými zvyškami Asp377, His543, Glu415 a ko-katalytický Zn2 ión je koordinovaný Asp377, His367, Asp443. Koordinačnú sféru zinočnatých iónov dopĺňa aj hydroxidový anión (alebo molekula vody), ktorý je umiestnený asymetricky voči obom iónom. Navyše, druhá molekula vody, prítomná v štruktúre, prispieva k stabilizácii Zn2. Podobné usporiadanie týchto iónov nájdeme aj v štruktúre hGCPII, avšak s tým rozdielom, že vzájomná vzdialenosť iónov zinku v hGCPII (3,3 Å) je kratšia ako v hGCPIII (3,7 Å) (obr. 10) [12,56].



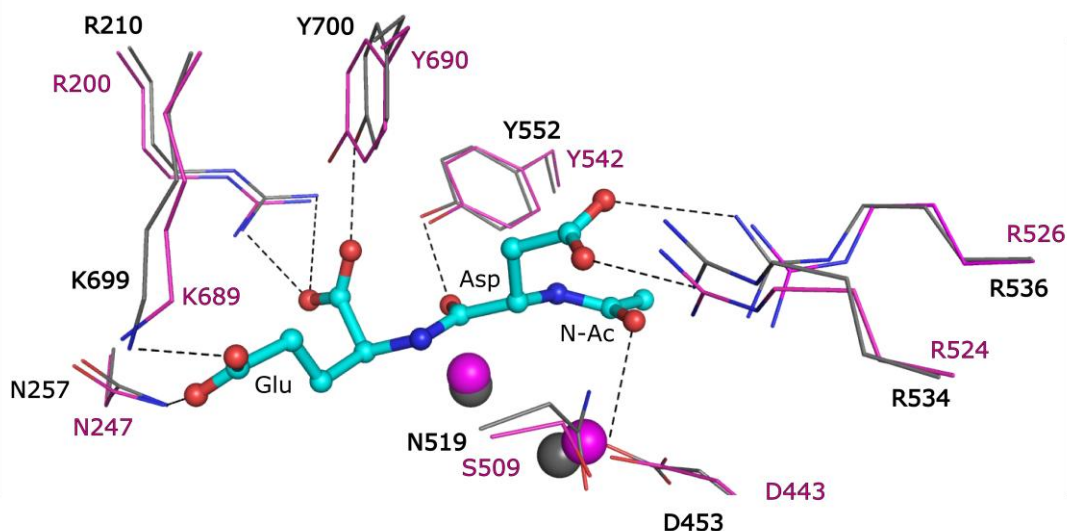
Obr. 10: Koordinačná sféra zinočnatých iónov v hGCPIII a hGCPII.

Aminokyseliny podieľajúce sa na stabilizácii atómov zinku v štruktúre hGCPII a hGCPIII sú úplne totožné. Zinočnaté atómy sú zobrazené ako pomarančové guľôčky, atómy uhlíka sú zobrazené šedou farbou, atómy kyslíka červenou a atómy dusíka modrou. Jednotlivé aminokyseliny sú v tyčinkovom prevedení a medziatómové vzdialenosti sú zakreslené prerušovanou čiarou. Čísla udávajú vzdialenosti v angstrémoch. Prevzaté z [56].

S1 a S1' väzbové miesto enzýmu hGCPIII je formované rovnakými aminokyselinami ako väzbové miesto hGCPII až na zámenu Asp519 za Ser509 (obr. 11, str. 23). Táto zámena čiastočne ovplyvňuje i výsledný náboj väzbovej dutiny. Spodná časť

väzbovej kapsy sa vyznačuje prítomnosťou pohyblivého „glutamátového senzoru“, ktorý zahŕňa Ile681 až Ser694 [56].

Na základe získaných poznatkov o priestorovej štruktúre hGCPII a hGCPIII možno povedať, že sú si tieto proteíny na štruktúrnej úrovni veľmi podobné.



Obr. 11: Superpozícia aminokyselín tvoriacich väzbovú dutinu hGCPII a hGCPIII.

Ružovou farbou je znázornená väzbová dutina hGCPIII, (pdb kód 3FEC GCPIII). Šedou farbou je znázornená väzbová dutina inaktívneho mutantu hGCPII Glu424Ala (pdb kód 3BXM GCPII, klusák). Z pozície aminokyselín je zrejmé, že väzbová dutina oboch proteínov je takmer totožná, až na zmenu Ser509 (štruktúra hGCPIII) za Asp519 (štruktúra hGCPII). Substrát NAAG je v „tyčinkovo-guľôčkovom“ prevedení, jednotlivé aminokyselinové zvyšky sú zobrazené ako „tyčinky“, atómy zinku prislúchajúce hGCPIII sú zobrazené ako ružové guľôčky a zinky prislúchajúce hGCPII sú zobrazené ako šedé guľôčky. Atómy dusíku sú zobrazené silno modrou farbou, atómy uhlíku slabou modrou a atómy kyslíku farbou červenou. Prevzaté a upravené z [16,56].

2.6.1.1.2 Enzymová aktivita hGCPIII

Už v roku 1987 Robinson *et al.* zistili, že GCPII vlastní α -glutamát karboxypeptidázovú aktivitu [20]. S cieľom potvrdiť, či vyvrátiť túto aktivitu aj pre iné enzýmy ako len pre GCPII, rozhodli sa dva odlišné tímy skonštruovať model GCPII knocked-out (KO) myši [57,58]. Tsai *et al.* publikovali, že delécia GCPII génu je u myši smrteľná už v embryonálnom štádiu, zatiaľ čo Bacich *et al.* ukázali, že GCPII KO myš sa vyvíjala normálne až do dospelosti a prejavovala základné známky neurologických odpovedí a správania sa. Tento výsledok bol dostatočne zaujímavý na to, aby sa pokračovalo v ďalšom testovaní KO myši, ktoré odhalilo prítomnosť nového enzýmu GCPIII, kompenzujúceho chýbajúcu aktivitu GCPII [57].

Z prirodzene sa vyskytujúcich substrátov v tele: N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát a foyl-poly- γ -glutamát, hGCPIII odštiepuje C-terminálny L-glutamát, ale s menšou efektivitou ako hGCPII [54]. K rozdielnosti v enzymovej aktivite môže taktiež prispievať

zmenšenie substrátovej dutiny a zmena jej povrchového náboja v dôsledku zámény dvoch aminokyselinových zvyškov tvoriacich túto dutinu a prípadne taktiež aminokyselinová záměna Asn519 u GCPII za Ser509 u GCPIII [54].

Pre rozšírenie informácií o substrátovej špecifite hGCPIII, boli navrhnuté panely dipeptidov o všeobecnom vzorci Ac-X-Glu-OH a Ac-Asp-X-OH. hGCPII silno preferovala Ac-Asp-Glu-OH a Ac-Glu-Glu-OH, naproti tomu hGCPIII sa pri hydrolýze substrátu javila menej účinná. Zvláštne taktiež je, že hGCPIII na rozdiel od hGCPII neštíepi Ac-Asp-Ala-OH ani Ac-Asp-Met-OH [54].

2.6.1.2 Prostate-Specific Membrane Antigen-like (PSMA-like)

Gén pre PSMA-like je lokalizovaný na chromozóme 11q14.3 [1,63]. Najdlhší otvorený čítací rámec mRNA PSMA-like začína v oblasti ôsmeho intrónu génu GCPII a jeho transláciou vzniká proteín o 422 aminokyselinách a relatívnej molekulovej hmotnosti 46 kDa, ktorý zdieľa 97 % identity a 98 % podobnosti s proteínom hGCPII (obr. 12, str.26) [59].

Skúmanie PSMA-like na nukleotidovej úrovni odhalilo deléciu v oblasti odpovedajúcej promóteru, exónu 1 a 371 nukleotidom intrónu 1, génu FOLH1. Táto oblasť FOLH1 obsahuje štart kodón a celú intracelulárnu a transmembránovú doménu, a preto strata tejto oblasti v géne PSMA-like naznačuje, že PSMA-like proteín je lokalizovaný v cytozole. Ba čo viac, odstránenie dlhšieho aminokyselinového úseku z N-konca GCPII by malo viesť k strate enzýmovej aktivity PSMA-like proteínu. Funkcia tohto génu nie je doposiaľ známa a mRNA bola nájdená v obličkách a pečeni [59].

2.6.1.3 N-acetylated α -linked acidic dipeptidase-like (NAALADáza L)

Gén, kódujúci ľudskú NAALADázu L, sa nazýva NAALADL1. Je dlhý približne 14 kbp a lokalizovaný na chromozóme 11q12 [53].

Proteín NAALADáza L, o relatívnej molekulovej hmotnosti 100 kDa, je tvorený 740 aminokyselinami, vlastní sedem možných glykozylačných miest a patrí medzi transmembránové proteíny typu II. Proteínová sekvencia je 35 % identická a 54 % podobná s hGCPII (obr. 12, str. 26) [53,60].

Na základe porovnania aminokyselinových sekvencií je väzbová dutina NAALADazy L tvorená z väčšej časti odlišnými aminokyselinami ako väzbová dutina hGCPII, ale na druhej strane katalytický glutamát 424 a aminokyseliny koordinujúce zinky zostali pre oba enzýmy identické (obr.12, str.26).

COS bunky transfekované DNA kódujúcou NAALADázu L a taktiež imunoprecipitovaná NAALADáza z myšacieho ilea nevykazovali žiadnu α -glutamátcarboxypeptidázovú aktivitu. Okrem myšacieho ilea bola preukázaná prítomnosť mRNA i v ľudskom tenkom čreve, slezine a semenníkoch [53].

hPSMAL (1)	-----
hGCPII (1)	MWNLLHETDSAVATAR RPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHN--MKAFLLD
hGCPIII (1)	-----MAES RGRLLYLWMC LAAA LASFLMGFMV GWFIK PLKETTT TSVRY HQSI RWKLVS
hNaalL (1)	-----M QWTKV L GLGLG AAA LLGLGI IL LGHFAI PKKAN S LAPQDLDLE ILLET VMG
hPSMAL (1)	-----
hGCPII (64)	ELKAENIKKFLYNFTQIP HLAGTEQ NFQLAKQIQSQWKE--FGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPN
hGCPIII (54)	EMKAENIKSFLRSFTKLP HLAGTEQ NFLAKKIQTQWKK--FGLDSA KL VHYDVLLSYPNETNAN
hNaalL (51)	QLDAHRI REN LRELSRE PHLAS SPRDEDLVQLL LQRW KDPESGLDSAEASTYEVLLS FPS SQE QPN
hPSMAL (1)	-----
hGCPII (127)	YISITIN EDG NEIFNTSLF EPPPP GYENVSDIVPPFSAF SPQ GMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERD
hGCPIII (117)	YISIVDEHETE IFK TSYLEPPPDGYENV TIN IVPPYNAFSAQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERE
hNaalL (116)	VVDIV GP TGGIIH SCHRTE ENVTGEQGGPDVVQPYAAYAPSGTPQGLLVYANRGAEEDFKELQ TQ
hPSMAL (1)	-----
hGCPII (192)	MKINCS GK IVIARYGKVF RGNK VKNAQLAGAKGVILYSDPADY---FAPGVKSYP DGWN LPGGGV
hGCPIII (182)	MGINCTGK IVIARY GKIFRGNK VKN AMLAGAIGIILYSDPADY---FAPEVQPPYK GWNL PGTAA
hNaalL (181)	G -IKLEGTIAL TRY GGVGRGAKAV NA AKHG VAG VLVY TDPAD INDGLSSPDETF PNS WYLPP SGV
hPSMAL (1)	-----
hGCPII (254)	QRGNILN LNGAGD PLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHP IGY YDAQLLEKMGGSAPDSS
hGCPIII (244)	QRGNV LNLNGAGD PLTPGYP AK EYFRLDVEEGVGIPRIPVHP IGY NDAEILLR Y LGGIAPD DKS
hNaalL (245)	ERG--SYYEY FGD PLTPYLP AV SSFRV DLAN VSGFPPIPTQPIG FQDARD LLCN LNG T LAP -AT
hPSMAL (11)	WRGSLK VSY NVGP FTGN ---FSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDS
hGCPII (319)	WRGSLK V YPNVGP FTGN ---FSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDS
hGCPIII (309)	WKGALN VSY SI GP FTGS--D SFR KVRMHVYNINKITRIYNVVG TI RG SV EPDRYVILGGHRDS
hNaalL (307)	WQGAL GCHY R L GP GR PD GD FPA DS QVNVSVY NR LELRN SS NVLGIIRGAVEPDRYVILYGNHRDS
hPSMAL (73)	WVFGGIDPQSGAAV V HEIV RS FTL KK EG-WRPRRTILFASWDAAEFGLLGSTEWAE DN SRL LQ E
hGCPII (381)	WVFGGIDPQSGAAV V HEIV RS FTL KK EG-WRPRRTILFASWDAAEFGLLGSTEWAE EN SRL LQ E
hGCPIII (371)	WVFGAIDP TSG VAVLQEI ARS FGK LM SKG-WRPRRTILFASWDAAEFGLLGSTEWAE EN VKIL LQ E
hNaalL (372)	WVHGAVDPSSGTAVL LE LSR VL GT LL KKGTWRPRRSIVFASWGAAEFGLIGSTEFTEEFFNK LQ E
hPSMAL (137)	RGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYNLTKE LK SPDEGFEGKSLYESWTKKS--PSPEFS
hGCPII (445)	RGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKS--PSPEFS
hGCPIII (435)	RSIAYINSDSSIEGNYTLRVDCTPLLYQLVYKLTKEIPSPDDGFEGKSLYESWLEKD--PSPENK
hNaalL (437)	RTVAYINVDISVFANATLRVQGTTPVQSVVFSATKEIRSPGPGD--LSIYDNWIRYFNRS SP VY G
hPSMAL (200)	GMPRISKLGSGNDFEVFFQRLG IAS GRARYTKN WET NKFSGYPL YH SVYET YEL VEK FY DP MF KY
hGCPII (508)	GMPRISKLGSGNDFEVFFQRLG IAS GRARYTKN WET NKFSGYPL YH SVYET YEL VEK FY DP MF KY
hGCPIII (498)	NLPRINKLGSGSDFEAYFQRLG IAS GRARYTKN K TDKYSSYPVYHTIYET FEL VEK FY DP TF KK
hNaalL (500)	LVP SL GLG AG SDY AP FVHFLG IS SMDIAYTYDRSK TS SARIYPT Y HTAFD TFD YVDKFLDP GF SS
hPSMAL (265)	HLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYNI SMK HPQEMK TY SL S FDS L S AV K
hGCPII (573)	HLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFS AV K
hGCPIII (563)	QLSVAQLRGALVYELVD SK IIP NI QDYAEAL K NYAAS I YNLS KK HDQQL TD HGV S FDS L S AV K
hNaalL (565)	HQAVARTAGSVILRLSDSFFLPLK V SDYSE TL RS FL QAAQ--- QDL GALLEQHSISL GL P L V T A V E
hPSMAL (330)	NFTEIASKFSE RL QDFD KS N--PILLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKY
hGCPII (638)	NFTEIASKFSE RL QDFD KS N--PIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKY
hGCPIII (628)	NFSEASDFHKRLIQVDLNN--PIAVRMMNDQMLLERAFIDPLGLPGKLFYRHIIFAPSSHNKY
hNaalL (627)	KFEAEAAALGQRI ST LQK GS PDPLQVRMLNDQMLLER TF LNP RA FPEERYYS H V L W AP RT G ---
hPSMAL (393)	AGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGDV KR QISVAAFTVQAAAETLSEVA--
hGCPII (701)	AGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEV KR QIYVAAFTVQAAAETLSEVA--
hGCPIII (691)	AGESFPGIYDAIFDIENKANSRLAWKEV KK HISIAAFTIQAAGTLKEV L --
hNaalL (689)	SVVTFPGLSNA CS RARD TAS GEAWAEVQRQLSIVVTAL E GAAATLR P VADL

Obr. 12 : Porovnanie primárnej sekvencie ľudskej GCPII, GCPIII, NAALADazy L a PSMA-like.

Žltou farbou sú zobrazené identické sekvencie, zelenou a modrou sú zobrazené podobné sekvencie, bielou sú zobrazené odlišné sekvencie. Červeným kruhom sú označené aminokyseliny koordinujúce zinky, ružovou je znázornený katalytický glutamát a silno modrou farbou sú zobrazené aminokyseliny tvoriace S1 väzbovú dutinu a zelenou S1' väzbovú dutinu. Každý riadok porovnania obsahuje 65 aminokyselín. hPSMAL-ľudská PSMA-like, hGCPII-ľudská GCPII, hGCPIII-ľudská GCPIII, hNaalL-ľudská NAALADáza L.

2.6.2 Orthológy ľudskej GCPII

Hoci sa s diagnostikou a liečbou neurodegeneratívnych ochorení a rakovinou prostaty stretávame takmer každodenne, je potrebné pravidelne aktualizovať diagnostické a terapeutické postupy v svetle nových liečiv a liečebných poznatkov. Avšak, ešte predtým ako tieto liečivá budú slúžiť pacientom, musia sa podrobiť klinickému testovaniu, ktorého jedným z krokov je i testovanie na zvieratách. Preto výber správneho zvieracieho modelu, resp. zvieracieho orthológu GCPII, je nesmierne dôležitý. Pri výbere modelového organizmu je potrebné overiť ako sa orthológ daného proteínu líši od GCPII najmä v enzýmovej aktivite, expresii v tkanivách, možnostiach inhibície a prípadne väzbou proteínových partnerov.

2.6.2.1 Potkania GCPII

U potkana je gén *Folh1* lokalizovaný na chromozóme 1q32 a kóduje 752 aminokyselín dlhý proteín, ktorého extracelulárny región obsahuje 9 N-glykozilačných miest. Aminokyselínová sekvencia tohto proteínu zdieľa 85 % identitu a 89 % podobnosť s hGCPII (obr. 13, str. 29). Relatívna molekulová hmotnosť denaturovaného proteínu je 94 kDa [61,62]. Potkania GCPII je transmembránovým proteínom typu II, ktorého hydrofóbny reťazec začlenený do membrány je o jednu aminokyselinu dlhší ako transmembránová oblasť hGCPII. Extracelulárna oblasť tohto proteínu obsahuje katalytický glutamát a sú v nej zachované všetky dôležité aminokyseliny (obr. 13, str. 29).

Prvý krát bol tento proteín spomenutý Robinsonom *et al.* v súvislosti so štiepením neurotransmiteru NAAG v mozgu potkana [20]. Účinnosťou štiepenia je potkania GCPII podobná ľudskej GCPII (tab.1, str. 28) [55]. Výrazná odlišnosť expresie GCPII v ľudskej, potkanej a prasacej prostate obmedzuje ich použitie ako modelového organizmu pre liečbu rakoviny prostaty [55].

2.6.2.2 Prasacia GCPII

Folh1 je gén prasacej GCPII kódujúci 751 aminokyselín dlhý glykoproteín, o molekulovej hmotnosti 120 kDa, patriaci medzi transmembránové proteíny typu II [23]. Prasacia GCPII si zachováva 92 % podobnosť a 91 % identitu s ľudskou GCPII (obr. 13, str. 29). Zatiaľ čo ľudská a potkania GCPII vlastnia 10 a 9 N-glykozilačných miest, prasacia GCPII ich má 12 [55].

Keďže prasacia GCPII bola izolovaná zo strednej časti tenkého čreva-lačníka, je zrejmé, že disponuje γ -glutamát karboxypeptidázovou aktivitou. Okrem tejto aktivity bola

potvrdená aj α -glutamát karboxypeptidázová aktivita [23]. Účinnosťou štiepenia je prasačia GCPII podobná ľudskej GCPII (tab.1) [55].

2.6.2.3 Myšacia GCPII

Folh1 je gén kódujúci GCPII predovšetkým v myšacích obličkách a mozgu. Tento gén je lokalizovaný na chromozóme 7D1-2 a jeho prepisom vzniká 752 aminokyselín dlhý proteín. Relatívna molekulová hmotnosť mGCPII sa pohybuje okolo 94 kDa. Sekvencia tohto proteínu zahŕňa 10 potenciálnych N-glykozylačných miest a zdieľa 86% identity a 91% podobnosti s hGCPII (obr.13, str.29) [63].

Tak ako všetky predchádzajúce homológy, tak i myšací GCPII, patrí medzi membránové proteíny typu II. Jej N-terminálna intracelulárna oblasť pozostáva z 19 aminokyselín, transmembránová oblasť je tvorená 25 aminokyselinami a posledná extracelulárna oblasť obsahuje 708 aminokyselín [55].

Myšací glutamát karboxypeptidáza vykazuje dve enzýmové aktivity, a to α -glutamátkarboxypeptidázovú a γ -glutamátkarboxypeptidázovú aktivitu (tab. 1). α -glutamátkarboxypeptidázová aktivita však nebola zaznamenaná v prostate myši. Príčinou je rozdielna expresia GCPII v myšacích a ľudských tkanivách. Zatiaľ čo prostata u človeka je orgán s najvyššou expresiou GCPII, u myši nebola v tomto orgáne zaznamenaná žiadna expresia, a preto nemohla byť pozorovaná ani žiadna enzýmová aktivita [63].

Tab. 1: Prehľad kinetických parametrov hydrolýzy NAAG pre ortológy ľudskej GCPII

rekombinantný proteín	K_M (nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\times 10^5 s^{-1} M^{-1}$)
ľudská GCPII	$1,200 \pm 500$	$1,1 \pm 0,2$	$9,3 \pm 4,9$
myšacia GCPII	1300 ± 190	$0,30 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,3$
potkania GCPII	180 ± 50	$0,2 \pm 0,1$	$10,0 \pm 3,8$
prasacia GCPII	370 ± 80	$0,5 \pm 0,1$	$13,3 \pm 2,9$

V tabuľke sú zobrazené hodnoty Michalisovej konštanty, katalytickej konštanty a hodnoty pomeru katalytickej a Michalisovej konštanty pre jednotlivé ortológy GCPII. Prevzaté a upravené podľa [55,65].

Okrem myšacej GCPII bola klonovaná i myšacia GCPIII, ktorá je lokalizovaná na chromozóme 9 a obsahuje 740 aminokyselín [64]. Tento proteín, o predikovanej molekulovej hmotnosti 82 kDa, je transmembránovým proteínom typu II. Jeho extracelulárna doména obsahuje 7 potenciálnych glykozylačných miest a celkový proteín vykazuje 85 % identitu s hGCPIII a 70 % identitu s mGCPII. Podobne ako mGCPII a hGCPIII, tak i mGCPIII vykazovala α -glutamátkarboxypeptidázovú aktivitu [54,64].

hGCPII (1)	MWNLLEHETDSAVATARPRWLCAGALVLAG-GFLLGLFGLFGWFIKSSNEATNITPKHNMK-AFLD
pGCPII (1)	MWNLLEHETDSTVAVRRPRWLCAGALVLAAGLFLVGLFGLFGWFIKSPNEAANISPOHNVKKAFLD
rGCPII (1)	MWNAQQDSDSAEALGRQRWFCAGTLVLAFTGTFTIIGFLFGLFGWFIKPSNDSTSSVSYPGMKKAFLQ
mGCPII (1)	MWNALQDRDSAEVLGHRQRWLRVGTLLVLAALTGTFLIIGFLFGLFGWFIKPSNEATGNVSHSGMKKEFLH
hGCPII (64)	ELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQOLAKQIQSQWKEFGLDSEVELAHYDVLLSYPNKTHPNYI
pGCPII (65)	ELKAENIKKFLYNFTRIIPHLAGTEQNFQOLAKQIQSQWKEFGLDSEVELAHYDVLLSYPNKTRPNYI
rGCPII (66)	ELKAENIKKFLYNFTRTIPHLAGTQHNFELAKQIHAQWKEFGLDLVELSDYDVLLSYPNKTHPNYI
mGCPII (66)	ELKAENIKKFLYNFTRTIPHLAGTQNFELAKQIHDQWKEFGLDLVELSHYDVLLSYPNKTHPNYI
hGCPII (129)	SIINEDGNEIFNTSLFEPFPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMK
pGCPII (130)	SIIDEDGNEIFNTSLFEPFPPPGYENVSDVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMK
rGCPII (131)	SIINEDGNEIFKTSIAELSPPGYENISDVVPPYSAFSPQGTPEGDLVYVNYARTEDFFKLERVMK
mGCPII (131)	SIINEDGNEISKTSISEQPPPGYENISDVVPPYSAFSPQGTPEGDLVYVNYARTEDFFKLEREMK
hGCPII (194)	INCSGKIVIARYGKVFVRGNKVKNAQLAGAKGVIILYSDPADYFAPGVKSYDPDGNLPGGGVQRGNI
pGCPII (195)	INCSGKILVIARYGKIFVRGNKVKNAQLAGAKGIILYSDPADYFAPGVQSYDPDGNLPGGGVQRGNI
rGCPII (196)	INCSGKIVIARYGQVFRGNKVKNAQLAGAKGIILYSDPADYFVPGVKSYPDGNLPGGGVQRGNV
mGCPII (196)	ISCSGKIVIARYGKVFVRGNMVKNAQLAGAKGMILYSDPADYFVPAVKSYPDGNLPGGGVQRGNV
hGCPII (259)	LNLNGAGDPLTPGYPANERYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSL
pGCPII (260)	LNLNGAGDPLTPGYPANERYAYRLQIAEAVGLPRIPVHPIGYDAQKLEKMGGSAPPDSSWKGS
rGCPII (261)	LNLNGAGDPLTPGYPANERYAYRHEFTAEAVGLPSIPVHPIGYDDAQKLEHMGGSAPPDSSWKGG
mGCPII (261)	LNLNGAGDPLTPGYPANEHAYRHELTNAVGLPSIPVHPIGYDDAQKLEHMGGPAPPDSSWKGG
hGCPII (324)	KVPYNVGGPFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDP
pGCPII (325)	HVPYNVGGPFTGNFSTQKVKMHIHSDNKVKRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDP
rGCPII (326)	KVPYNVGGPFTGNFSTQKVKLHIHSYNKVTRIYNVIGTLKGAVEPDRYVILGGHRDAWVFGGIDP
mGCPII (326)	KVPYNVGGPFTGNFSTQKVKMHIHSYTKVTRIYNVIGTLKGALEPDRYVILGGHRDAWVFGGIDP
hGCPII (389)	QSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINAD
pGCPII (390)	QSGAAVVHEIVRSFGKLKKEGWRPRRTVLFASWDAEEYGLFGSTEWAEENSRLQERGVAYINAD
rGCPII (391)	QSGAAVVHEIVRTFTGLTKKKGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINAD
mGCPII (391)	QSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINAD
hGCPII (454)	SSIIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPFEFSGMPRISKLGSG
pGCPII (455)	SSIIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYNLTKEQLSPDEGFEGKSLFESWNEKSPSPFEFSGLPRISKLGSG
rGCPII (456)	SSIIEGNYTLRVDCTPLMHSLVYNLTKELPSPDEGFEGKSLYDSWKEKSPSTEFIGMPRISKLGSG
mGCPII (456)	SSIIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYNLTKEQLSPDEGFEGKSLYDSWKEKSPSPFEFISMPRISKLGSG
hGCPII (519)	NDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWE TNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFDYDPMFKYHLTVAQVRGGM
pGCPII (520)	NDFEVFFQRLGIASGRARYTKDWVTNKFSYPLYHSVYETYELVEKFDYDPTFKYHLTVAQVRGGI
rGCPII (521)	NDFEVFFQRLGIASGRARYTKNKNKVSYPPLYHSVYETYELVEKFDYDPTFKYHLTVAQVRGAM
mGCPII (521)	NDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWKTNKVSYPPLYHSVYETYELVVKFDYDPTFKYHLTVAQVRGAM
hGCPII (584)	VFELANSIVLPPDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSLFSAVKNFTEIASKFSE
pGCPII (585)	VFELANSVVRPPDCRDYAVVLRNYADKLYNISMNHPQEMKAYSVSFDLSLFSAVKNFTEIASNFSE
rGCPII (586)	VFELANSIVLPPDCQSYAVALKKHAETIYNISMNHPQEMKAYMISFDLSLFSAVNNFTDVASKFNQ
mGCPII (586)	VFELANSIVLPPDCQSYAVALKKYADTIYNISMKHPQEMKAYMISFDLSLFSAVNNFTDVASKFNQ
hGCPII (649)	RLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALF
pGCPII (650)	RVQDLDKNNPILRLIMNDQLMFLERAFIVPLGLPDRAFYRHVIYAPSSHNKYMGESFPGIYDALF
rGCPII (651)	RLQDLKSNPILRLILNDQLMFLERAFIDPLGLPGRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALF
mGCPII (651)	RLQELDKSNPILRLIMNDQLMFLERAFIDPLGLPGRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALF
hGCPII (714)	DIESKVDPSKAWGEVVKRQIYVAFTVQAAAETLSEVA
pGCPII (715)	DIENKVDPSKAWGEVVKRQISIAFTVQAAAETLREVA
rGCPII (716)	DINNKVDTSKAWREVVKRQISIAFTVQAAAETLREVD
mGCPII (716)	DISSKVNASKAWNEVVKRQISIAFTVQAAAETLREVA

Obr. 13: Porovnanie aminokyselínovej sekvencie ľudskej, myšacej, potkanej a prasacej GCPII.

Žltou farbou sú zobrazené identické sekvencie, zelenou a modrou sú zobrazené podobné sekvencie, bielou sú zobrazené odlišné sekvencie. Červeným kruhom sú označené aminokyseliny koordinujúce zinky, ružovou je znázornený katalytický glutamát a silno modrou farbou sú zobrazené aminokyseliny tvoriace S1' väzbovú dutinu a zelenou S1' väzbovú dutinu. Každý riadok porovnania obsahuje 65 aminokyselín. hGCPII-ľudská GCPII, pGCPII-prasačia GCPII, rGCPII-potkania GCPII, mGCPII-myšacia GCPII.

Voľba vhodného zvieracieho modelu spomedzi známych orthológov GCPII, nie je jednoduchá, pretože charakterizácia ich biochemického profilu nie je pre klinické testovania dostatočná a vyžaduje jeho doplnenie a rozšírenie. Napriek tomu, sa ako najvhodnejší model javí myš. Pre správnu interpretáciu výsledkov, získaných na myšacích modeloch, je nutné poznať nielen rozdiely medzi ľudskou a myšacou GCPII, ale taktiež si byť istý, že myš neobsahuje žiadny iný proteín, ktorý by tieto výsledky ovplyvňoval a skresľoval. Kandidátom pre takýto interferujúci proteín by v tomto prípade bola myšacia GCPIII, čo nás viedlo k jej nakloňovaniu a podrobnejšej charakteristike proteínu.

3 Ciele práce

- Získať cDNA kódujúcu myšaciu GCPIII(1-740) z vybraného myšacieho tkaniva
- Danú cDNA klonovať do vektoru umožňujúci expresiu celého proteínu myšacej GCPIII(1-740) v cicavčích bunkách a extracelulárnu časť myšacej GCPIII(36-740) v hmyzom expresnom systéme
- Overiť či protilátka GCP-04 proti ľudskej GCPII a protilátka GCP-3-02 proti ľudskej GCPIII rozpoznáva myšaciu GCPIII(1-740) získanú z cicavčích buniek
- Vyčistiť myšaciu GCPIII(36-740) pomocou afinitnej chromatografie
- Porovnať aktivitu myšacej GCPIII(36-740) s ľudskou GCPIII(36-740) a ľudskou GCPII(44-750)

4 Materiál a metódy

4.1 Chemikálie, média, enzýmy a ďalší materiál

Bio-Rad (Hercules, USA)

5×Bio-Rad protein Assay

Biotum (Kalifornia, USA)

GelRed

Duchefa Biochemie (Haarlem, Holandsko)

MOPS

Finnzymes (Espoo, Fínsko)

Phusion DNA Polymerasa

Fluka (Buchs, Švajčiarsko)

TEMED, N,N'-metylenbisakrylamid

Gibco (Kalifornia, USA)

SF900II médium; 10 % fetálne hovädzie sérum (FBS)

Hirschmann Geräte (Eberstadt, SRN)

Pasteurove pipety

Invitrogen (Kalifornia, USA)

TOPO-TA Cloning Kit; TOP10 kompetentné bunky; *Drosophila* S2 Schneiderové bunky;

SuperScript[®] III

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

96-jamková priehľadná mikrodosťička s plochým dnom

Lach-Ner (Neratovice, ČR)

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

Millipore (Massachusetts, USA)

0,22 µm filtračná nitrocelulózoová membrána

New England BioLabs (Ipswich, USA)

reštrikčné endonukleázy; T4 DNA-ligáza

Penta (Praha, ČR)

methanol; kyselina octová; acetón; formaldehyd; isopropanol; ethanol; kyselina mravenčia

Pierce (Illinois, USA)

D-biotín; neutravidín konjugovaný chrenovou peroxidázou (Neu-HRP); SuperSignal West Dura Chemoluminescence substrate; kozí anti-myšací-IgG protilátka konjugovaná s HRP

Promega (Madison, USA)

Pfu DNA Polymeráza

Qiagen (Kalifornia, USA)

QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAquick Gel Extraction Kit; 500 bp marker; X-Gal, RNeasy Mini Kit

ROCHE s.r.o. (Praha, ČR)

Streptavidin Mutein Matrix; Fugene HD

ROTH (Karlshure, SRN)

Rotiszint Eco Coctail

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

Vivaspin 6 centricon

Serva (Heidelberg, SRN)

Coomassie Brilliant Blue G-250); brómfenolová modrá; BSA

Sigma-Aldrich (Buchs, Švajčiarsko)

EDTA; SDS; LB-médium; LB-agar; 2-merkaptóethanol; glycín; Tris; akrylamid; RNAsa H; sacharóza; hemacytometer

Top-Bio (Praha, ČR)

PPP Master Mix; deoxyribonukleotidy;

4.2 Prístroje

- pH-meter: 9450 pH meter, Unicam (USA)
- prístroj pre PCR: T-Gradient Thermocycler, Biometra (SRN)
- spektrofotometer: NanoDrop 1000, Thermo Scientific (USA)
- spektrofotometrická čítačka: Tecan (Švajčiarsko)
- autokláv: MLS-3020U Sanyo Labo Autoclave, Sanyo (Japonsko)
- transiluminátor: Electronic Dualwave Transilluminator, Ultra-Lūm (USA)
- laboratórne váhy: HL-400, A&D Engineering, Inc. (USA)
EK-400H, A&D Engineering, Inc. (USA)
- vodná kúpeľ: Grant Instruments Ltd.(UK)
Thermomix BU B.Braun (SRN)
- rotačný inkubátor: Gallenkamp, Sanyo (UK)
- horizontálna agarózová elektroforéza:
zdroj MP-500P, Major Science (Taiwan)
aparátúra B1A Owl Separation Systems, Inc. (USA)

- vertikálna polyakrylamidová elektroforéza: Sigma (USA)
- blotovací prístroj: aparátúra: Trans-Blot SD, Bio-Rad (USA)
zdroj: PowerPac HC, Bio-Rad (USA)
- inkubátory: TCH 100, Laboratórne prístroje Praha (CZ)
MCO-17AI CO₂ Incubator, Sanyo (Japonsko)
- centrifúgy: Biofuge Pico, Heraeus Instruments (SRN)
Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments (SRN)
Megafuge 2,0R, Heraeus Instruments (SRN)
Centifuge 5415R, Eppendorf (SRN)
- mikroskopy: fluorescenčný mikroskop Olympus IX81, Tokio (Japonsko)
svetelný mikroskop Nikon TMS (Japonsko)
- fotoaparát: SP-5000UZ, Olympus (Japonsko)
- CCD kamera: LAS-3000 CCD Camera, Fujifilm (Japonsko)
- laminárny box: BSB4A Laminar Flow Box, Gelaire (Austrália)
- scintilačný kvapalinový počítač: Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Waltham (USA)
- sonikátor: Soniprep 150, Sanyo (Japonsko)
- Tissue Lyser: Qiagen (Kalifornia, USA)

4.3 Metódy

4.3.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Podmienky pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) boli zvolené podľa pokynov výrobcu DNA polymerázy (Finnzymes) [66]. Podmienky pre PCR sú uvedené v tab. 2 a 3 (str. 35), sekvencie použitých primerov potom v prílohe, na str. 63.

Tab. 2: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre amplifikáciu extracelulárnej časti myšacej GCPIII

komponenta PCR	množstvo
templátová DNA (pCRII-TOPOmGCPIII)	10 ng
primer FmNAIIXST (20 μM)	1 μl
primer M13F (10 μM)	2 μl
zmes deoxyribonukleotidov (10 mM)	1 μl
Phusion™ HF pufr (5×)	10 μl
Phusion® HF DNA Polymerase (2 U/μl)	0,4 μl
HPLC-H ₂ O	do 50 μl

Tab. 3: Podmienky priebehu PCR

počet cyklov	teplota [°C]	dĺžka trvania cyklu [s]
1	98	60
36	98	10
	56	20
	72	80
1	72	600

Produkty PCR boli následne elektroforeticky rozdelené na horizontálnej agarózovej elektroforéze (kap. 4.3.3).

4.3.2 Polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou (RT-PCR)

Bola pripravená zmes pozostávajúca z 1 μ l oligo(dT)₂₀ (50 μ M), 1 μ l deoxyribonukleotidov (10 mM) a 8 μ l vyizolovanej RNA z príslušného tkaniva (približne 900 ng). Táto zmes bola zahriata na 65°C a následne schladená na ľade. Po ochladení bolo k tejto zmesi pridaných 10 μ l „Master mix“ (tab. č. 4).

Výsledná zmes bola zahriata na 50°C po dobu 5 min. Po tomto čase bola teplota zvýšená na 85°C po dobu 5 min. Následne bola výsledná zmes schladená na ľade. Po schladení bol k zmesi pridaný 1 μ l RNAázy H (2 U/ μ l) a všetko bolo inkubované pri 37°C po dobu 20 min.

Tab. 4: Zloženie master mix použitého pre RT-PCR

komponenta RT-PCR	množstvo
MgCl ₂ (25mM)	4 μ l
DDT (0,1 M)	2 μ l
RNAáza out (40 U/ μ l)	1 μ l
RT pufr (10x)	2 μ l
SuperScript® III reverzná transkriptáza (200 U/ μ l)	1 μ l

Po vytvorení knižnice cDNA bolo uskutočnené PCR. Podmienky PCR procesu sú uvedené v tab. 5 a 6 (str. 36). Sekvencie použitých primerov potom v prílohe, na str. 63.

Tab. 5: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre amplifikáciu myšacej GCPIII

komponenta RT-PCR	množstvo
templátová DNA	1 μ l
primer F _{mus/ratGCPIIIstEII} (20 μ M)	1 μ l
primer R _{mus/ratGCPIIIstEII} (20 μ M)	1 μ l
Phusion™ HF pufr (5×)	10 μ l
Phusion® HF DNA Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l
HPLC-H ₂ O	35,5 μ l

Tab. 6: Podmienky priebehu PCR

počet cyklov	teplota [°C]	dĺžka trvania cyklu [s]
1	98	30
36	98	10
	60	20
	72	30
1	72	300

4.3.3 Horizontálna agarózová elektroforéza

Roztoky:

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

vzorkový pufr: 40 % (w/v) sacharóza; 0,1% (w/v) brómfenolová modrá;
0,02 % NaN₃

DNA bola analyzovaná pomocou horizontálnej gélovej elektroforézy s použitím 1 % (w/v) agarózy rozpustenej v TAE pufré a obsahujúcej fluorescenčné farbivo GelRed (Biotium) v riedení 1:100 000.

Pre odhad dĺžky fragmentov DNA bol použitý ako štandard λ -DNA márker (tj. DNA bakteriofága- λ štepená reštrikčnou endonukleázou *BstEII*). Fragменты DNA boli separované 20-30 min pri 125 V pomocou elektroforézy. Potom boli vizualizované prostredníctvom transiluminátora Electronic Dualwave Transilluminator a výsledky zdokumentované fotoaparátom SP-5000UZ s etídium bromidovým filtrom(Olympus).

4.3.4 Extrakcia DNA z agarózového gélu

DNA, rozdelená pomocou agarózovej elektroforézy, bola vyrezaná z agarózového gélu a následne bola extrahovaná z gélu podľa protokolu, QIAquick Gel Extraction Kit[®] (QIAGEN) [67].

4.3.5 TOPO TA-klonovanie

TOPO TA-klonovanie využíva koncových adenzinových presahov na fragmentoch DNA vytvorených činnosťou napr. Taq DNA polymerázy pri PCR. TOPO TA-klonovanie bolo uskutočnené podľa návodu výrobcu pomocou kitu „TOPO TA-Cloning“ (Invitrogen) [68].

cDNA, získaná pomocou RT-PCR bola adenylovaná Taq DNA polymerázou užitím PPP Master Mix (Top-Bio). Reakčná zmes obsahovala 20 μ l DNA; 20 μ l PPP Master Mix; a prebiehala 30 min pri 72°C.

4.3.6 Štiepenie a ligácia DNA

Štiepenie DNA odpovedajúcimi reštrikčnými endonukleázami bolo prevedené v reakčnom objeme 50 μ l podľa návodu výrobcu reštrikčných enzýmov (New England BioLabs). Množstvo DNA, doba štiepenia a reakčná teplota boli závislé na účele štiepenia (zvyčajne 50 ng -4 μ g DNA; 1-8 h).

Fragmenty DNA štepené tými istými reštrikčnými endonukleázami boli spolu ligované v celkovom objeme 10 μ l, pri 16°C a po dobu najmenej 10 h. Množstvo T4 DNA-ligázy v reakcii bolo 1 μ l (\equiv 400 U). Molárny pomer množstva vektor: fragment bol približne 1:3.

4.3.7 Transformácia kompetentných baktérií *E. coli* TOP10

Pre transformáciu boli použité kompetentné bunky *E. coli* TOP10 pripravené pomocou protokolu s použitím chloridu rubídneho Františkom Sedlákom v našom laboratóriu.

10 μ l ligačnej reakcie bolo zmiešané s 25 μ l kompetentných buniek *E. coli* TOP10 a inkubované na ľade 30 min. Potom bol uskutočnený tepelný šok: 42°C, 90 sek. a následne 4°C, po dobu 1 min. Ku vzorkám bolo pridané 200 μ l studeného LB-média (Sigma) a potom boli inkubované 1 h pri 37°C.

Po inkubácii bolo 180 μ l buniek natrených na Petriho misku s LB-agarom (Sigma) obsahujúcim ampicilín (o koncentrácii 100 μ g/ml, Biotika). Misky boli inkubované v termostate pri 37°C cez noc.

4.3.8 Minipreparácia plazmidovej DNA

12 ml (plazmidová DNA použitá pre transformáciu) popri prípade 2 ml LB-média (Sigma) s ampicilínom (v koncentrácii 100 μ g/ml, Biotika) boli inokulované 1 kolóniou transformovaných buniek *E. coli* a inkubované pri 37°C v rotačný inkubátor (Sanyo) po dobu 15 h. Bakteriálna kultúra bola potom centrifugovaná (3362 \times g, 10 min, 4°C) a supernatant dekantovaný. Izolácia plazmidovej DNA z pelety obsahujúca bakteriálne bunky bola uskutočnená podľa protokolu „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) [69].

4.3.9 Sekvenovanie plazmidovej DNA

Koncentrácia a čistota DNA bola určená meraním absorbancie pri 230, 260 a 280 nm na spektrofotometre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Pre sekvenovanie plazmidovej DNA bolo do 200 µl mikroskúmavky pipetované požadované množstvo DNA (100 ng DNA/1000 bp plazmidu), pridané 3,2 pmol daného primeru a doplnené destilovanou vodou do celkového objemu 14 µl. Sekvencia použitých primerov je uvedená v prílohe na str. 63.

Vlastné sekvenovanie DNA bolo uskutočnené RNDr. Štěpánkou Hrdou v Laboratóriu pre sekvenácie DNA (PřF UK).

4.3.10 Transfekcia hmyzích buniek a selekcia stabilnej bunečnej línie

Bunečná línia Schmeiderových S2 hmyzích buniek obsahujúca biotín ligázu z *E. coli* (*BirA*) v endoplazmatickom retikule, ktorá je schopná *in vivo* biotinylovať peptidovú sekvenciu obsiahnutú v Avi-kotve, bola pripravená už skôr v našom laboratóriu [70]. Tieto bunky boli kultivované na 35 mm miske v SF900II médiu (Gibco) obohatenom o 10 % fetálne hovädzie sérum (Gibco) pri teplote 25°C pokiaľ nedosiahli koncentrácie 2×10^6 buniek/ml. Transfekcia buniek bola urobená pomocou kitu „Calcium Phosphate Transfection Kit“ (Invitrogen) Janou Starkovou.

<u>Roztok A:</u>	2 M CaCl ₂	36 µl
	pMT/Bip/Avi/TEV/mGCPIII(36-740)	9 µg
	pCoBlast	0,5 µg
	sterilná voda pre tkanivové kultúry	do finálneho objemu 300 µl

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

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

Roztok A bol po kvapkách pridávaný k roztoku B za jeho súčasného vortexovania a výsledný roztok bol inkubovaný 40 min pri 25°C. Roztok bol premiešaný a po kvapkách pridávaný k bunkám, ktoré boli potom inkubované 24 h pri 25°C. Následne bola bunečná suspenzia centrifugovaná (500×g, 3 min) a médium dekantované. Bunky boli resuspendované v 3 ml čerstvého kompletného média (SF900II, 10 % FBS) a inkubované ďalších 24 h pri 25°C. Potom bolo médium odobrané a pridané čerstvé kompletné médium obsahujúce selekčné antibiotikum hygromycin-B (o koncentrácii 300 µg/ml) a blasticidin (o koncentrácii 5 µg/ml). Toto selekčné médium bolo menené po 4–5 dňoch, dovtedy, kým nezačali rásť bunky rezistentné na hygromycin-B/blasticidin (obvykle po 3–4 týždňoch).

4.3.11 Stanovenie počtu živých buniek užitím trypanovej modrej

Roztoky:

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

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

Stanovenie je založené na fakte, že mŕtve bunky sa farbia trypanovou modrou, zatiaľ čo živé bunky dokážu „prepumpovať“ toto farbivo cez svoju plazmatickú membránu a zostávajú tak nezafarbené.

20 µl bunečnej suspenzie bolo zmiešané s 880 µl PBS. Po pridaní 100 µl trypanovej modrej bol roztok premiešaný a ponechaný stáť 5–10 min pri izbovej teplote. Po premiešaní bolo 11 µl roztoku pipetované pod sklíčko hemacytometra (Sigma). Za použitia mikroskopu (Nikon) so 100-násobným zväčšením boli sčítané živé bunky v piatich poliach hemacytometra (Sigma) o objeme 0,1 µl. Zo získaných hodnôt bol urobený aritmetický priemer a výsledná hodnota bola prepočítaná z jednotky bunky/0,1µl na bunky/1ml vynásobením 10 000 a faktorom riedení (v našom prípade 50), čím bola vypočítaná koncentrácia buniek v pôvodnej bunečnej kultúre.

4.3.12 Expresia rekombinantnej myšacej GCPIII(36-740)

Expresia extracelulárnej časti rekombinantnej myšacej GCPIII(36-740) bola urobená Janou Starkovou následovne.

Pripravené stabilne transfekované Schneiderove S2 bunky rezistentné na hygromycin-B a blasticidin (o koncentrácii minimálne 1×10^7 buniek/ml) boli premiestnené do dvoch 100 mm misiek v SF900II médiu (Gibco) pri teplote 25°C kým nedosiahli koncentráciu 2×10^6 buniek/ml.

Potom bola zahájená produkcia rekombinantného proteínu prídavkom 100 mM CuSO₄ (o výslednej koncentrácii 1 mM). Bunečná kultúra bola ponechaná v inkubátore pri 25°C sedem dní. Bunková kultúra bola centrifugovaná (500×g, 3 min, 25°C); a získané médium obsahujúce rekombinantný proteín bolo ďalej centrifugované (3360×g, 30 min, 4°C) a sfiltrované cez 0,22 µm nitrocelulózový filter (Millipore). Filtrované médium bolo ďalej použité pre afinitnú purifikáciu (kap. 4.3.13).

4.3.13 Purifikácia rekombinantnej myšacej GCPIII afinitnou chromatografiou

Roztoky:

Ekvilibračný purf: 300 mM Tris-HCl, 450 mM NaCl; pH 7,2

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

Elučný pufr: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; 2 mM D-biotín; pH 7,2

Regeneračný pufr: 100 mM glycín-HCl; pH 2,8

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

Nosič: Streptavidin Mutein Matrix (ROCHE)

Zmrazené médium obsahujúce rekombinantnú myšaciu GCPIII bolo roztopené v 4°C. Potom bolo médium centrifugované (3360×g, 60 min, 4°C) a získaný supernatant bol filtrovaný cez 0,22 µm nitrocelulóзовý filter (Millipore). Filtrované médium (20 ml) bolo potom zmiešané s 10 ml ekvilibračného pufru a celkový objem bol rozdelený do dvoch falkoniiek o objeme 15 ml. Ku každej falkone bolo pridané 250 µl nosiča. Roztok bol s nosičom inkubovaný pri 4°C po dobu 12 h (za stáleho miešania). Kolónka pre afinitu chromatografiu (Pierce) bola ekvilibrovaná a následne bol na ňu aplikovaný inkubovaný roztok. Nosič bol separovaný filtráciou na frite a premytý 12-násobkom objemu nosiča (CV) premývacím roztokom, v krokoch po 2 CV (W1), 5 CV (W2) a 5 CV (W3). Biotinylované proteíny boli z nosiča eluované elučným pufrom v krokoch po 1 CV (E1), 2 CV (E2), 2 CV (E3) a 5 CV (E4), pričom v priebehu prvého kroku bol nosič inkubovaný s elučným pufrom po dobu 1 h. V našom prípade CV odpovedalo 250 µl.

Nosič bol nakoniec regenerovaný podľa návodu výrobcu (ROCHE), prevedený do uchovávajúceho roztoku a uskladnený pri teplote 4°C pre ďalšie použitie.

Jednotlivé frakcie boli potom analyzované pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géle za prítomnosti SDS (SDS-PAGE) (kap. 4.3.14) a následným zafarbením gélu striebrom (kap. 4.3.16).

4.3.14 Diskontinuálna elektroforéza v polyakrylamidovom géle za denaturujúcich a redukujúcich podmienok (SDS-PAGE)

Roztoky:

Zaostrovaný gél (6 %): 250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 5,5 % (w/w) akrylamid, 0,15 % (w/w) N,N'-metylen-bis(akrylamid); 0,1 % (w/v) SDS; 0,005 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) peroxidisíran amónny (APS)

Separovaný gél (10 %): 313 mM Tris-HCl (pH 8,8); 9,25 % (w/w) akrylamid, 0,25 % (w/w) N,N'-metylen-bis(akrylamid); 0,1 % (w/v) SDS; 0,001 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) peroxidisíran amónny (APS)

Vzorkový pufr (6×): 350 mM Tris-HCl (pH 6,8); 30 % (v/v) glycerol; 10 % (w/v) SDS; 6 % (v/v) 2-merkptoethanol; 0,012 % (w/v) brómfenolová modrá

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

Proteíny boli rozdelené podľa svojich elektroforetických pohyblivostí pomocou diskontinuálnej elektroforézy v redukujúcom polyakrylamidovom géle (SDS-PAGE). Po príprave a zatuhnutí boli gély pripevnené do prístroja pre vertikálnu SDS-PAGE (Sigma) a horná i dolná komora bola naplnená elektrodovým pufrom.

Pred nanesením do gélu boli vzorky zmiešané s vzorkovým pufrom a varom denaturované. Separácia prebiehala pri konštantnom napätí 150 V po dobu približne 1 h. Proteíny v gélu boli potom detekované buď pomocou farbenia striebrom (kap. 4.3.16) alebo prenosom na nitrocelulózovú membránu a následnou imunodetekciou (kap. 4.3.15).

4.3.15 Elektroprenos proteínov na nitrocelulózovú membránu (western blot)

Roztoky:

Transferový pufr: 192 mM glycín; 25 mM Tris-HCl; 10 % (v/v) CH₃OH; 0,1 % (w/v) SDS; (pH neupravované)

Gél z SDS-PAGE bol 1 min ekvilibrovaný spolu s nitrocelulózovou membránou v transferovom pufri. Vlastný prenos proteínov z gélu na membránu bol prevedený použitím napätia 15 V po dobu 13 min na zdroji PowerPac HC (Bio-Rad).

Membrána bola potom premytá PBS + 0,05 % Tween-20 a inkubovaná v 5 ml Casein Blockeru pre blokovanie nešpecifickej väzby protilátky (1 h, 4°C). Následne bola membrána inkubovaná so supernatantom z hybridómu GCP-04 alebo s koncentrovaným supernatantom GCP-3-02 (16 h, 4°C).

Membrána bola potom premytá 3×5 min PBS + 0,05 % Tween-20 a po jej prenesení do 5 ml Casein Blockeru bola pridaná sekundárna kozia anti-myšacia protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou (320 ng/ml v Casein Blockeru, 1 h, 25°C). Po inkubácii bola membrána opätovne premytá 3×5 min PBS + 0,05 % Tween-20 a 5 min inkubovaná v roztoku chemiluminiscenčného činidla SuperSignal West Dura Chemiluminescence Substrate (Pierce). Po osušení membrány bola zmeraná luminiscencia na prístroji LAS-3000 CCD Camera (Fujifilm).

4.3.16 *Farbenie polyakrylamidového gélu*

Pre zviditeľnenie elektroforeticky rozdelených proteínov bolo použité farbenie gélov striebrom.

Roztoky:

1. fixácia:	12 % (v/v) CH ₃ COOH; 50 % (v/v) CH ₃ OH; 0,02 % (v/v) HCHO	30 min
2. premytie:	50 % (v/v) CH ₃ OH	3 × 15 min
3. exponácia:	0,02 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
4. premytie:	destilovaná voda	3 × 20 s
5. impregnácia:	0,2 % (w/v) AgNO ₃ ; 0,02 % (v/v) HCHO	20 min
6. premytie:	destilovaná voda	3 × 20 s
7. vyvolanie:	566 mM Na ₂ CO ₃ , 16 μM Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O; 0,02 % (v/v) HCHO	10 s až 5 min
8. premytie:	destilovaná voda	3 × 20 s
9. zastavenie:	12 % (v/v) CH ₃ COOH; 50 % (v/v) CH ₃ OH	10 min
10. uchovanie:	50 % (v/v) CH ₃ OH	∞

4.3.17 *Stanovenie koncentrácie proteínov podľa Bradfordovej*

Stanovenie koncentrácie proteínov bolo uskutočnené metódou podľa Bradfordovej pomocou kitu „5×Bio-Rad protein Assay Kit“ (Bio-Rad) [71].

Pre kalibráciu bola použitá koncentračná rada štandardov BSA. Každá vzorka bola meraná v duplikátoch.

Do 96-jamkovej priehľadnej mikrodostičky (Koh-i-noor) bolo napipetované 40 μl činidla Bradfordovej (Bio-Rad), k nemu bolo pridané 160 μl HPLC vody a následne určité množstvo roztoku proteínu (0,5-50 μl). Absorbancia bola meraná pri 595 nm na spektrofotometrickej čítačke GENios (Tecan).

4.3.18 *Radiometrické meranie NAAG-hydrolytickej aktivity*

Roztoky:

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

Stopovací roztok: 200 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 2 mM 2-merkptoethanol

Substrát: ³H-NAAG (finálna koncentrácia 100mM)

Nosič: AG 1-X8 Resin (formate form, Bio-Rad)

V mikroskúmavke bol v celkovom objeme 90 μ l zmiešaný reakčný pufr, vzorka enzýmu a roztok inhibítora (v prípade inhibovaných reakcií) a vytvorený roztok bol preinkubovaný 5 min pri 37°C. Reakcia bola iniciovaná pridaním 10 μ l substrátu a nechaná prebiehať 60 min pri teplote 37°C. Potom bola reakcia zastavená pridaním 100 μ l stopovacieho roztoku.

Separácia odštiepeného rádioaktívneho glutamátu bola uskutočnená ionexovou chromatografiou na nosiči AG 1-X8 (Bio-Rad). Sklenené Pasteurové pipety (Hirschmann Laborgeräte) boli naplnené 2 ml nosiča rozsuspendovaného v destilovanej vode (1:1). Potom bola kolónka premytá 2x1 ml destilovanej vody. Do premytej kolónky bolo nanesené 180 μ l vzorky a naviazaný glutamát bol následne eluovaný 2x1 ml 1 M HCOOH do scintilačných fľaštičiek, do ktorých bolo pridaných 6 ml scintilačného roztoku Rotiszint[®]Eco-Plus (Roth). Vzorky boli dôkladne vortexované. Scintilácia bola zmeraná na kvapalinovom scintilačnom spektrometri Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer).

Proteíny hGCPII(44-750) a mGCPIII(36-740) boli použité priamo z afinitnej purifikácie a preto ich zloženie odpovedá elučnému pufru z tejto purifikácie (kap. 4.3.13).

Proteín hGCPIII(36-740) bol vyčistený klasickou purifikáciou Klárou Hlouchovou [54] jeho zloženie odpovedalo reakčnému pufru, použitému pri tomto meraní.

4.3.19 Tranzientná transfekcia cicavčích buniek HEK293offA2

Pre transfekciu boli použité bunky HEK293offA2 (bunková línia odvodená z ľudských embryonálnych ľadvinových buniek; exprimujúce regulačný proteín rtTA), ktorá bola pripravená v našom laboratóriu Pavlom Šáchom a Janou Starkovou.

Tranzientná transfekcia cicavčích buniek HEK293offA2 bola uskutočnená Janou Starkovou nasledovne.

Bunky boli ponechané rásť v 24-jamkovej doštičke tak, aby boli v deň transfekcie konfluentné na 60-70 %. Ďalej boli pripravené jednotlivé zmesi obsahujúce príslušnú plazmidovú DNA zriedenú do 25 μ l Optimemu (Invitrogen) a k týmto roztokom bolo následne pridané 1,5 μ l Fugene HD (ROCHE). Celkom bolo pripravených 10 transfekčných zmesí, ktoré boli ponechané stáť pri izbovej teplote 15 min do vytvorenia komplexov lipid : DNA. Päť transfekčných zmesí obsahovalo vždy plazmid pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) (2x), pTRE-Tight/hGCPIII(1-740) ,pTRE-Tight/hGCPII (1-750) alebo pTRE-Tight/EGFP. Každý z proteínov bol následne pridaný k bunkám, ktoré boli alebo neboli kultivované v prítomnosti doxycyklínu (výsledná koncentrácia 100 ng/ml).

Tieto zmesi boli opatrne pridané k bunkám, ktoré boli jemným pohybom doštičky premiešané. Bunky boli inkubované 40 h pri 37°C a 5 % CO₂ a potom boli pozbierané a ďalej spracované (kap. 4.3.20).

4.3.20 Homogenizácia cicavčích buniek (príprava bunečného lyzátu)

Bunky boli na miske rozsuspendované a vytvorená bunečná suspenzia bola centrifugovaná (500×g, 3 min, 4°C). Supernatant bol odobraný, peleta premytá v PBS, resuspendovaná a opäť centrifugovaná (500×g, 3 min, 4°C). Supernatant bol odstránený a peleta bola rozsuspendovaná v 50 µl Ripa pufru (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % sódiu deoxycholát; 0,1 % SDS). Táto zmes bola ponechaná stáť jednu hodinu pri teplote 4°C. Suspenzia bola opäť centrifugovaná (13 000×g, 10 min, 4°C) a vytvorený supernatant bol odobraný od pelety a použitý ako lyzáat buniek pre ďalšie pokusy (kap. 5.5).

4.3.21 Homogenizácia tkaniva a izolácia RNA

Tkanivá použité na izoláciu RNA boli uchovávané v RNA lateru a uskladnené pri -80°C. Pre samotnú izoláciu bolo odobraných 20-30 ng z každého príslušného tkaniva. K vzorke tkaniva bolo pridané 350 µl roztoku RLT (súčasť RNeasy Mini Kit) a 3,5 µl 2-merkptoethanolu. Do skúmaviek s jednotlivými vzorkami bola pridaná 5mm oceľová guľôčka a tkanivá boli následne homogenizované na prístroji Tissue Lyser (QIAGEN) 2x1 min pri frekvencii 30 Hz. Izolácia RNA z homogenizovaného tkaniva bola ďalej uskutočnená podľa protokolu RNeasy Mini Kit [72].

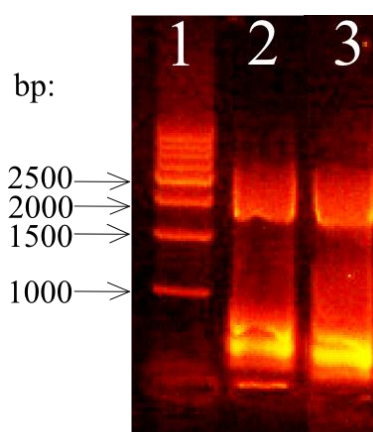
5 Výsledky

Cieľom tejto práce bolo pripraviť myšaciu rekombinantnú GCPIII (mGCPIII) a overiť jej prípadnú aktivitu. Na základe EST (z angl. expressed sequence tags) profilu [73] boli vybrané tkanivá (jazyk, semenníky) s najväčšou expresiou mGCPIII. ESTs sú krátke osekvenované úseky cDNA, klonovanej do plazmidu, získané reverznou transkripciou všetkej RNA z daného tkaniva. Počet ESTs porovnaný s celkovým počtom cDNA z určitého tkaniva umožňuje predpovedať v akom tkanive je expresia príslušného proteínu najväčšia.

Z týchto tkanív bolo potrebné najprv vyizolovať všetku RNA a tú následne prepísať pomocou reverznej transkriptázy na cDNA. Z cDNA sa pomocou PCR amplifikovala mGCPIII, ktorá sa potom klonovala do príslušných vektorov, exprimovala v hmyzích a cicavčích bunkách a získaný proteín sa ďalej charakterizoval.

5.1 Izolácia DNA myšacej GCPIII(1-740) z tkaniva

Zvolené tkanivá (jazyk, semenníky) boli homogenizované pomocou prístroja Tissue Lyser a z homogenizátov bola vyizolovaná celková RNA (kap. 4.3.21). Táto RNA slúžila ako templát pre RT-PCR za účelom získania knižnice cDNA, z ktorej sa následne pomocou PCR amplifikovala DNA kódujúca mGCPIII(1-740) (kap. 4.3.2). Úspešnosť získania DNA o dĺžke 2,2 kbp bola overená horizontálnou agarózovou elektroforézou (kap. 4.3.3) (obr. 14).



Obr. 14: cDNA mGCPIII(1-740) získaná reverznou transkripciou.

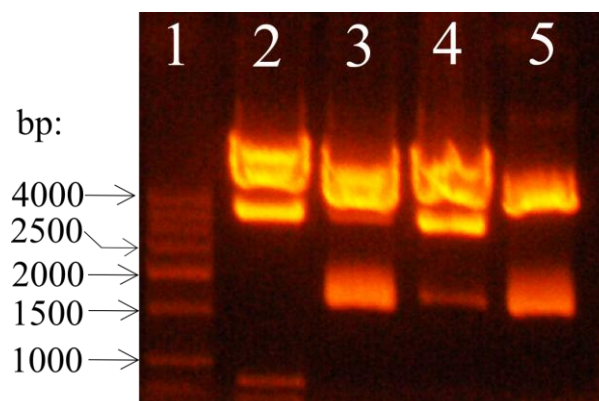
Dráha 1: 500bp marker (2 μ l); dráha 2: zmes po PCR s cDNA získanej zo semenníkov (1 μ l); dráha 3: zmes po PCR cDNA získanej z jazyka (1 μ l).

5.2 Klonovanie mGCPIII(1-740) do vektoru pCRII-TOPO[®]

Z polôh zón na obr. 14 je zrejme, že mGCPIII(1-740) sa podarilo úspešne vyizolovať nielen z jazyka, ale tiež zo semenníkov. Pre ďalšiu prácu bola zvolená len jedna DNA kódujúca mGCPIII(1-740) z jazyka.

Táto DNA, vyizolovaná z gélu (kap. 4.3.4), bola najprv adenylovaná použitím Taq DNA polymerázy a pomocou TOPO TA-klonovania bola ligovaná do pCRII-TOPO[®] vektoru (kap. 4.3.5). Touto ligačnou zmesou boli transformované kompetentné baktérie *E.coli* TOP10 (kap. 4.3.7). Po transformácii a minipreparácii plazmidovej DNA zo štyroch kolónií (označených A, B, C, D) bola správnosť ligácie a orientácie cDNA mGCPIII(1-740) v pCRII-TOPO vektore overená štiepením reštrikčnou endonukleázou *HindIII* (obr. 15) (kap. 4.3.6 a 4.3.8).

Reštrikčná analýza ukázala, že k ligácii inzertu mGCPIII(1-740) do pCRII-TOPO prišlo iba v prípade kolónie B a D, pretože len u týchto kolónií bol na agarózovom géle viditeľný produkt štiepenia o veľkosti 1,5 kbp a 4,8 kbp.

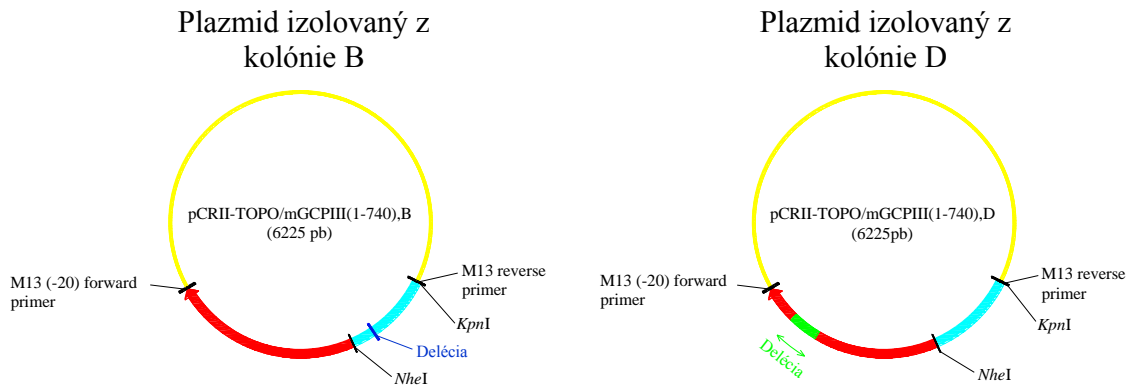


Obr. 15: Elektroforeogram vzoriek po štiepení reštrikčnou endonukleázou *HindIII*.

Správna orientácia cDNA mGCPIII(1-740) v pCRII-TOPO vektore je na géle dokumentovaná prítomnosťou fragmentov o približnej veľkosti 1,5 kbp a 4,8 kbp. Tieto fragmenty sú viditeľné len pre dráhu 3 a 5.

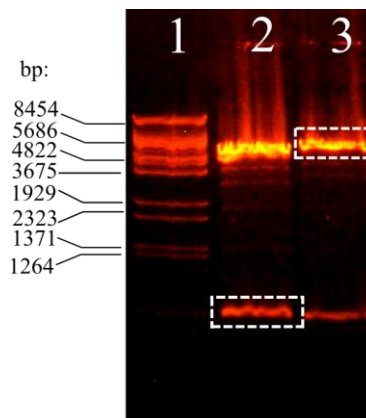
Dráha 1: 500bp marker (3 μ l); dráha 2: reštrikčne štiepený plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740) získaný z kolónie A (pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),A); dráha 3: (pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),B); dráha 4: (pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),C); dráha 5: (pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),D) Objemy nanášané na gél sú 6 μ l.

Následná sekvenácia týchto plazmidov (kap. 4.3.9) odhalila prítomnosť delécie jedného páru báz pre DNA mGCPIII(1-740) získanú z kolónie B a delécie o veľkosti približne 347 bp pre DNA mGCPIII(1-740) získanú z kolónie D (obr. 16, str. 47).



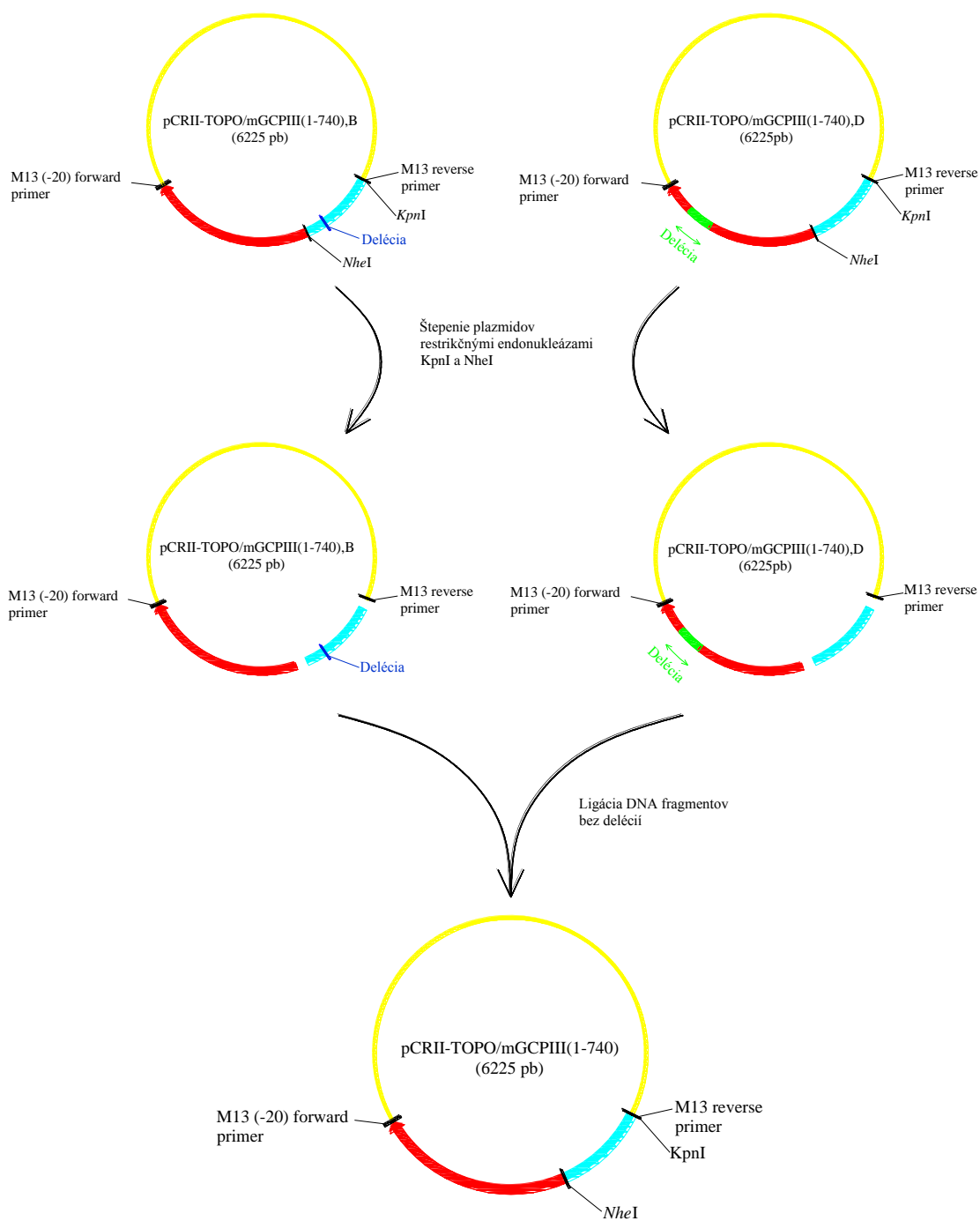
Obr. 16: Plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740) spolu so zakreslenými deléciami.

Na základe polohy jednotlivých delécií v plazmidoch bolo navrhnuté štiepenie reštrikčnými endonukleázami *NheI* a *KpnI* za účelom následného spojenia fragmentov bez delécie (obr. 17, obr. 18, str. 48) (kap. 4.3.6). Agarózovou elektroforézou boli oddelené jednotlivé fragmenty štiepenia, pričom z gélu bol extrahovaný len fragment o veľkosti 700 bp klonu D a fragment o veľkosti 5,5 kbp klonu B (kap. 4.3.3 a 4.3.4). Tieto fragmenty vo svojej sekvencii nezahŕňali žiadnu delécIU, a preto sa použili pre ligáciu.



Obr. 17: Štiepenie plazmidov pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),D a pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),B reštrikčnými endonukleázami *NheI* a *KpnI*.

Dráha 1: λ márker (3 μ l); dráha 2: reštrikčne štiepený plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),D (25 μ l); dráha 3: reštrikčne štiepený plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),B (25 μ l).



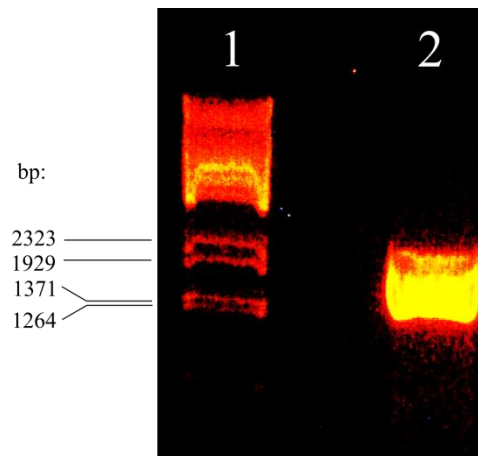
Obr. 18: Schematické znázornenie prípravy cDNA myšacej GCPIII.

Klony B a D boli štiepané reštrikčnými endonukleázami *KpnI* a *NheI*, čím došlo k vyštiepeniu úseku o veľkosti 700 bp medzi týmito dvomi reštrikčnými miestami (modrý úsek). Pomocou agarózovej elektroforézy boli od seba oddelené jednotlivé fragmenty o veľkosti 700 bp (modrý úsek) a 5,5 kbp (žltý a červený úsek). Pre vytvorenie plazmidu bez delécie bol vybraný 700 bp dlhý fragment z klonu D a 5,5 kbp dlhý fragment z klonu B. Následnou ligáciou týchto úsekov vznikol výsledný plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740).

5.3 Klonovanie cDNA mGCPIII(36-740) do vektoru pMT/Bip/Avi/TEV/hSR

Novovytvoreným plazmidom pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740) boli transformované kompetentné baktérie *E. coli* TOP10 (kap. 4.3.7). Minipreparáciou plazmidovej DNA z týchto baktérií (kap. 4.3.8) bol získaný templát pre PCR. Pomocou PCR bola amplifikovaná extracelulárna časť mGCPIII (mGCPIII(36-740)) obsahujúce restričné miesta *Bam*HI a *Xho*I (kap. 4.3.1).

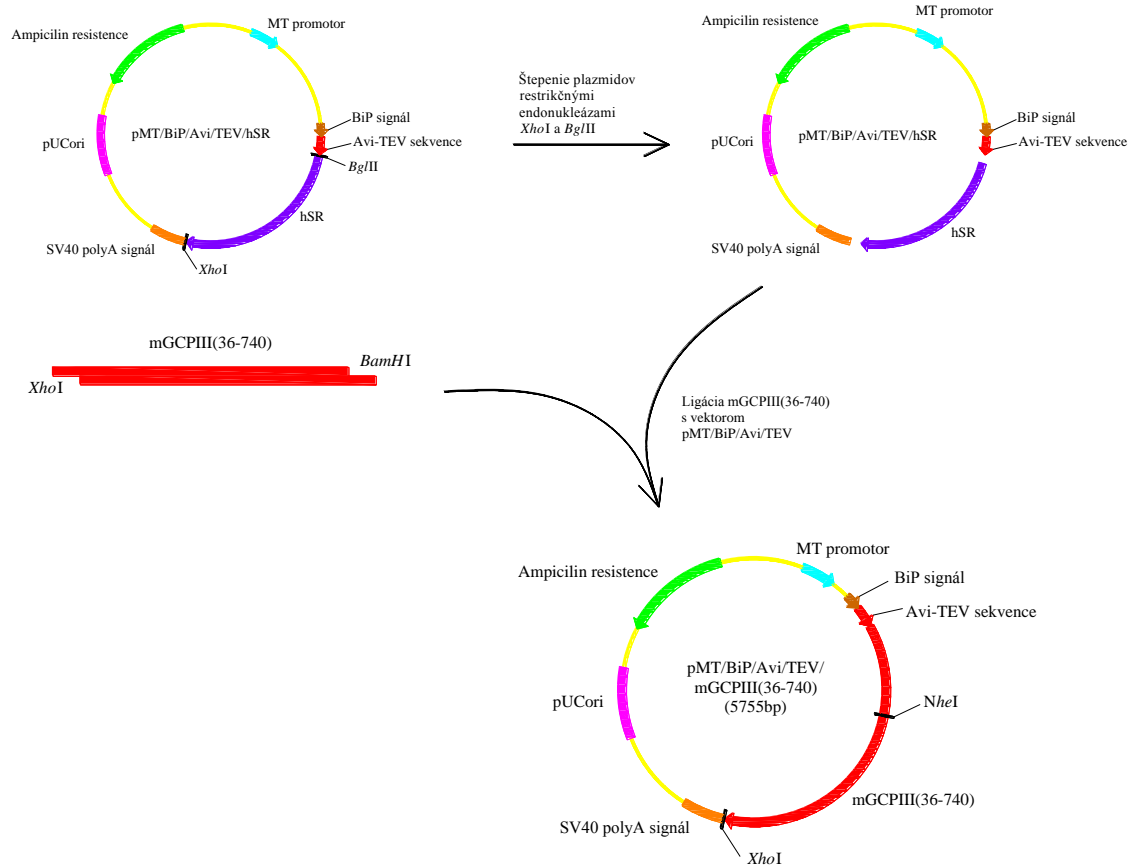
Amplifikovaná DNA bola štepená restričnými endonukleázami *Xho*I a *Bam*HI (kap. 4.3.6) a jej veľkosť bola potvrdená agarózovou elektroforézou (obr. 19).



Obr. 19: Štepenie DNA kódujúcej mGCPIII(36-740) restričnými endonukleázami *Bam*HI a *Xho*I. Dráha 1: λ-márker; dráha 2: DNA kódujúca extracelulárny región mGCPIII (25 µl), (očakávaná veľkosť fragmentu je 2 kbp)

Fragment o veľkosti približne 2 kbp bol vyizolovaný z gélu (kap. 4.3.4) a následne ligovaný do vektoru pMT/BiP/Avi/TEV/hSR štepeného endonukleázami *Bgl*II a *Xho*I, čím bola vyštiepená ľudská serínová racemáza (hSR) (restričné miesta *Bgl*II a *Bam*HI sú kompatibilné) (obr. 20, str. 50).

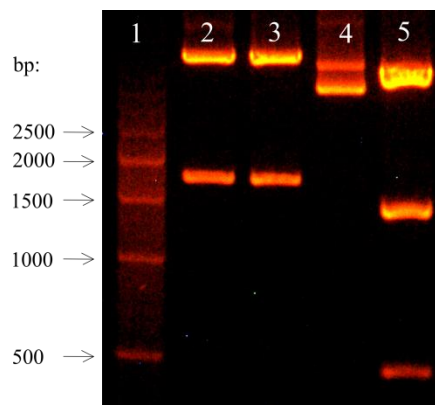
Po transformácii bakteriálnych *E.coli* buniek (kap. 4.3.7) bola uskutočnená minipreparácia plazmidovej DNA zo štyroch klonov (kap. 4.3.8). Získané plazmidy boli štiepené endonukleázami *Xho*I a *Nhe*I s cieľom overiť prítomnosť inzertu mGCPIII(36-740) (kap. 4.3.6) (obr. 21, str. 50). Správnosť sekvencie amplifikovanej DNA bola overená sekvenáciou plazmidu z klonu 1 (kap. 4.3.9).



Obr. 20: Klonovanie mGCPIII(36-740) do vektoru pMT/BiP/Avi/TEV/hSR.

Plazmid pMT/BiP/Avi/TEV/hSR bol štepený reštrikčnými endonukleázami *XhoI* a *BglII* a získaný vektor bol ligovaný s mGCPIII(36-740) štepenou reštrikčnou endonukleázou *XhoI* a *BamHI*.

Výsledný plazmid pMT/BiP/Avi/TEV/mGCPIII(36-740) slúži na expresiu proteínov v hmyzích S2 Shneiderových bunkách. Plazmid vo svojej sekvencii zahŕňa gén pre β -laktamázu, ktorá zaisťuje rezistenciu na ampicilín; miesto pre počiatok replikácie u baktérií (pUC ori); SV40 polyA signál potrebný na ukončenie transkripcie; metalothioneínový promotor; BiP signálnu sekvenciu potrebnú pre sekréciu proteínov do média; Avi-TEV sekvenciu potrebnú pre purifikáciu proteínu .



Obr.21: Štepenie plazmidu pMT/BiP/Avi/TEV/mGCPIII(36-740) reštrikčnými endonukleázami *XhoI*, *NheI*.

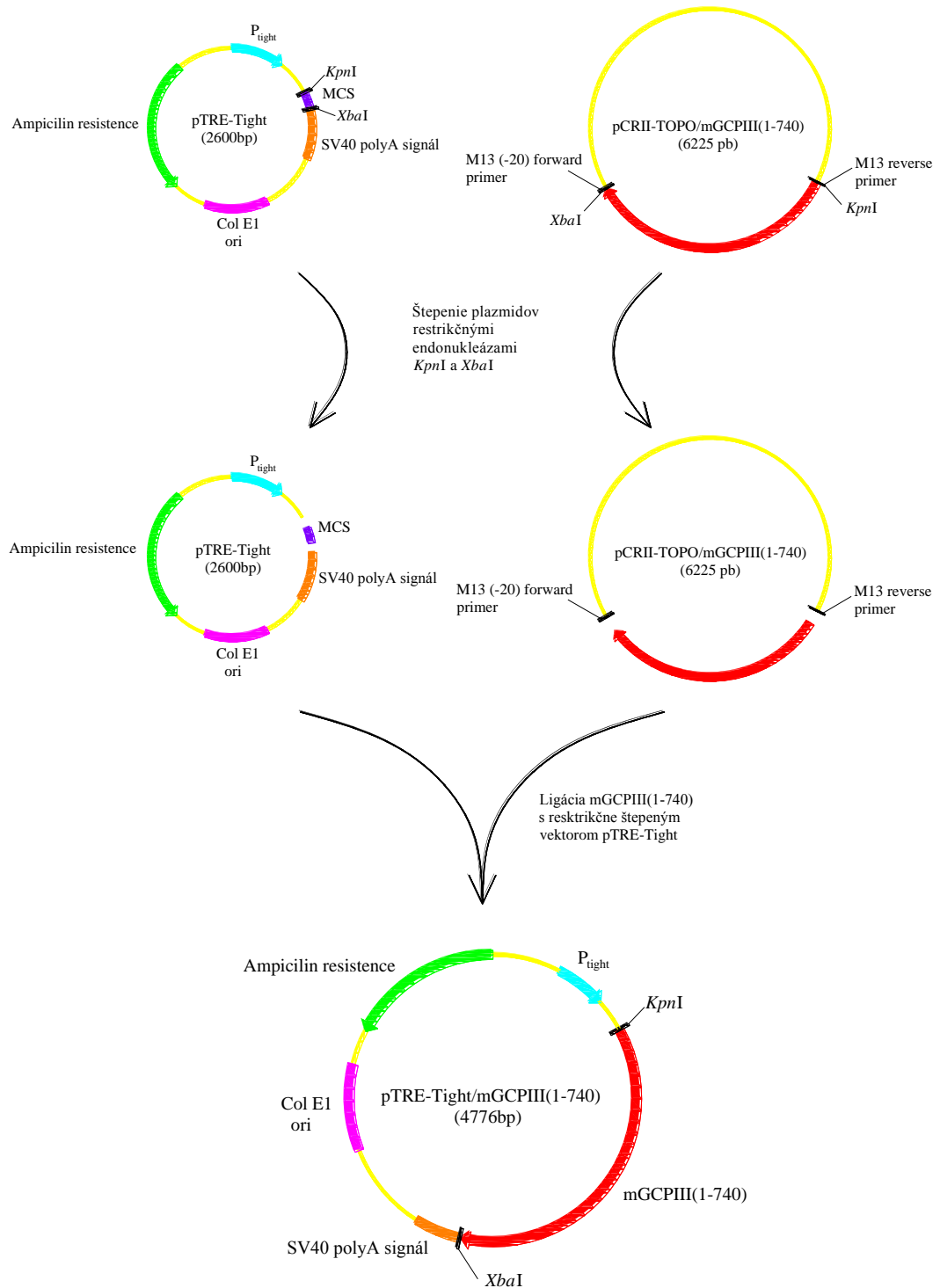
Dráha 1: 500 bp marker (3 μ l); dráha 2-5: reštrikčne štepené plazmidy pMT/BiP/Avi/TEV/mGCPIII(36-740) z jednotlivých klonov (10 μ l). Správne plazmidy sa nachádzajú v dráhach 2 a 3.

5.4 Klonovanie DNA mGCPIII(1-740) do vektoru pTRE-Tight

Po získaní DNA mGCPIII(1-740) bola táto DNA klonovaná z plazmidu pCRII-TOPO/ mGCPIII(1-740) (kap. 5.2) do plazmidu pTRE-Tight (obr. 22, str. 52). Tento plazmid je určený na expresiu cieľového génu v Tet-On/Tet-Off expresnom systéme, v ktorom je možné regulovať expresiu pomocou tetracyklínu alebo jeho derivátu doxycyklínu [74].

Plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740) bol najprv štepený endonukleázami *XbaI* a *KpnI* (kap. 4.3.6) a následne rozštiepené fragmenty boli odseparované agarózovou elektroforézou (kap. 4.3.3).

Fragment o veľkosti 2 kbp bol vyizolovaný z gélu (kap. 4.3.4) a ligovaný do plazmidu pTRE-Tight, ktorý bol predtým štepený enzýmom *XbaI* a *KpnI* (kap. 4.3.6). Po transformácii (kap. 4.3.7) a minipreparácii plazmidovej cDNA z troch klonov (kap. 4.3.8) bola správnosť ligácie overená štiepením reštrikčnými endonukleázami *XbaI* a *KpnI*. Produkty štiepenia o veľkosti 2,2 kbp a 2,6 kbp boli prítomné na agarózovom géle, čím bola dosvedčená správnosť ligácie u všetkých troch klonov. Ďalej sme pracovali už iba s jedným klonom.



Obr. 22: Klonovanie mGCPIII(1-740) z vektoru pCRII-TOPO do vektoru pTRE-Tight.

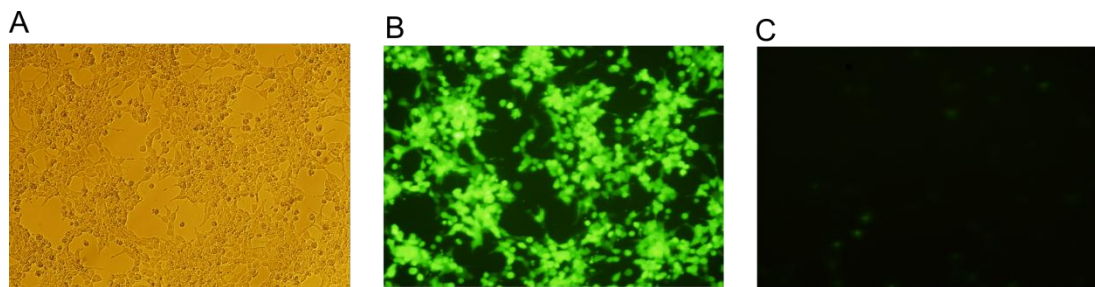
Plazmid a vektor boli štepené príslušnými restriknými endonukleázami a k vytvoreniu výsledného plazmidu bol použitý fragment mGCPIII(1-740) a restrikné štepený vektor pTRE-Tight.

Výsledný plazmid pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) je určený na expresiu proteínov v cicavčích bunkách. Plazmid vo svojej sekvencii obsahuje gén, kódujúci β -laktamázu, ktorá zaisťuje rezistenciu na ampicilín; miesto počiatku replikácie (Col E1 ori); SV40 polyA signál pre ukončenie transkripcie; P_{tight} je promotor umožňujúci reguláciu expresie mGCPIII(1-740).

5.5 Stanovenie špecificity monoklonálnych protilátok proti myšacej GCPIII(1-740)

Najprv sme pripravili celkový proteín mGCPIII(1-740). Ako expresný systém sme zvolili cicavčí bunkovú líniu HEK293.

Pre tranzientnú transfekciu cicavčích buniek HEK293offA2, ktoré boli pripravené v našom laboratóriu Janou Starkovou a Pavlom Šáchom, bol použitý plazmid pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) (boli uskutočnené dve paralelné transfekcie) (kap. 4.3.19). Ako kontrola bola urobená i transfekcia HEK293offA2 buniek plazmidmi kódujúcimi ľudskú GCP II, ľudskú GCPIII a EGFP. Expresia týchto proteínov bola regulovaná prostredníctvom doxycyklínu (dox). V prítomnosti doxycyklínu nedochádza k expresii príslušného proteínu, pretože doxycyklín bráni nasadeniu RNA polymerázy na P_{Tight} promotor, a tým bráni transkripcii príslušného génu (obr. 23).



Obr. 23: Expresia proteínu EGFP v HEK293offA2 bunkách.

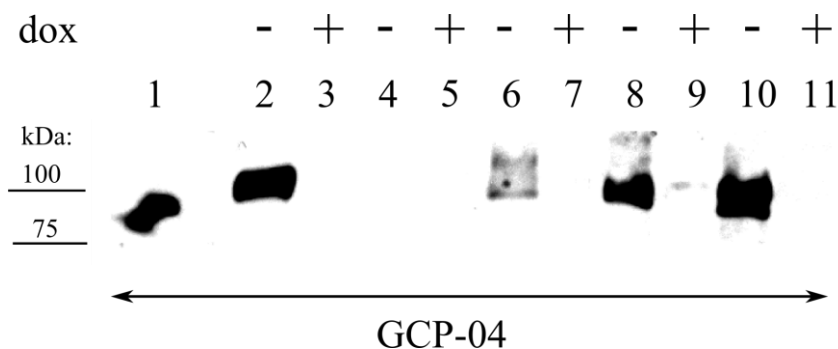
Panel A: zachytáva bunky HEK293pTet-offA2 pod viditeľným svetlom,

Panel B: zobrazuje fluoreskujúci EGFP proteín kultivovaný v médiu bez doxycyklínu (expozičný čas 2 ms);

Panel C: zobrazuje bunky kultivované v médiu s doxycyklínom, a preto po osvetlení nevykazujú žiadnu fluorescenciu -neobsahujú žiadny proteín (expozičný čas u oboch fotiek je 50 ms).

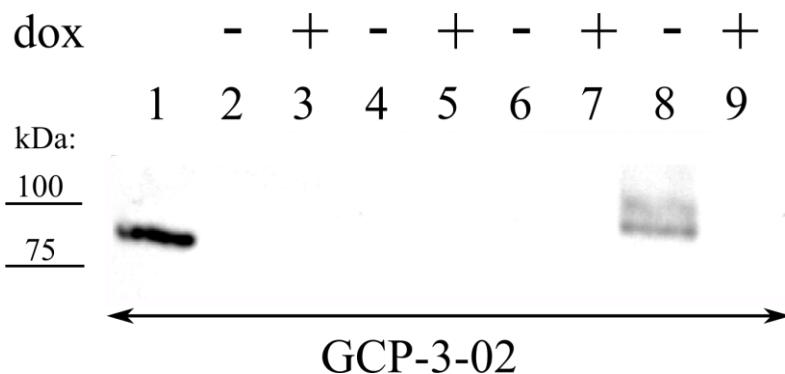
Po transfekcii boli bunky ponechané rásť 2-3 dni a potom bunky obsahujúce EGFP boli vyfotené (obr. 23) na potvrdenie úspešnosti transfekcie a schopnosti regulácie. Následne boli bunky premiestnené do mikroskúmaviiek a boli z nich urobené lyzáty (kap. 4.3.20).

Koncentrácia proteínov v lyzátoch bola zmeraná podľa Bradfordovej (kap. 4.3.17) a jednotlivé vzorky boli analyzované pomocou SDS-PAGE (kap. 4.3.13). Denaturované proteíny boli prenesené z elektroforetického gélu na nitrocelulóзовú membránu, na ktorej bola uskutočnená imunodetekcia monoklonálnymi myšacími protilátkami GCP-04 a GCP-3-02 (kap. 4.3.15) (obr. 24, 25, str. 54). Epitopy oboch protilátok sú zobrazené na obr. 26 na str. 54.



Obr. 24: Imunodetekcia mGCPIII z lyzátu buniek HEK293offA2 protilátkou GCP-04.

Dráha 1: márkér GCPIII (60ng); dráha 2,3 : proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/hGCPII(1-750); dráha 4,5: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/EGFP; dráha 6,7: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/hGCPIII(1-740).; dráha 8,9,10,11: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) z dvoch transfekcií (4.3.19). Množstvo celkového proteínu nanášaného do dráh bolo 20 µg, okrem dráhy 2 a 3, kde boli nanosené 4 µg. Znamienko „+“ a „-“ značí prítomnosť resp. neprítomnosť doxycyklinu pri kultivácii buniek.



Obr. 25: Imunodetekcia mGCPIII z lyzátoov buniek HEK293offA2 protilátkou GCP-3-02.

Dráha 1: márkér GCPIII (60ng); dráha 2,3: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/hGCPII(1-750); dráha 4,5,6,7: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) z dvoch transfekcií; dráha 8,9: proteínový lyzát buniek transfekovaných plazmidom pTRE-Tight/hGCPIII(1-740) (4.3.19). Množstvo celkového proteínu nanášaného do každej dráhy bolo 50µg. Znamienko „+“ a „-“ značí prítomnosť resp. neprítomnosť doxycyklinu pri kultivácii buniek.

A:

ľudská-GCPII AVKNFTEIASKE
 ľudská-GCPIII DFHKRLIQVDLN
 myšacia-GCPIII DFHRRLTQVDLN

B:

ľudská-GCPII QIQSQWKEFGLDSVE
 ľudská-GCPIII KIQTQWKKFGLDSAK
 myšacia-GCPIII KIQTQWKKFGLDSAN

Obr. 26: Porovnanie sekvencií homológov GCPII rozpoznávaných protilátkami GCP-04 aGCP-3-02.

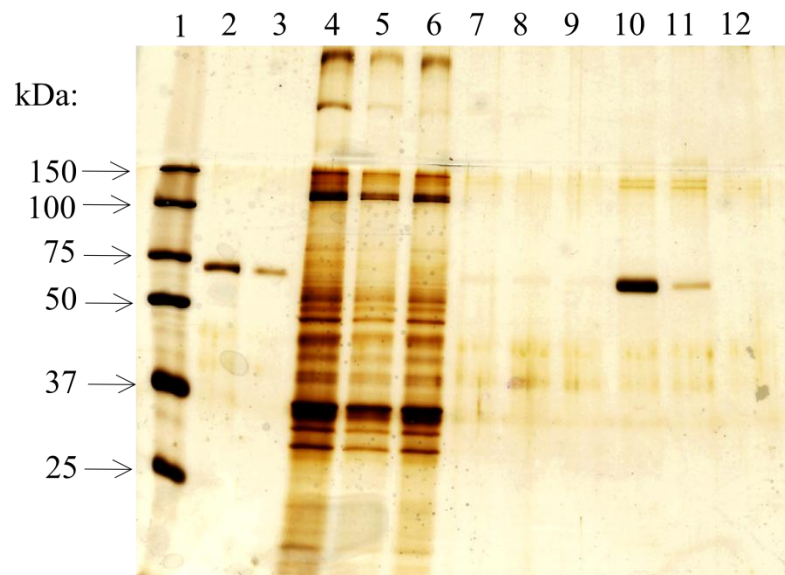
Panel A: porovnanie aminokyselínovej sekvencie peptidu ľudskej GCPIII použitej na imunizáciu pre vytvorenie protilátky GCP-3-02, so sekvenciami ľudskej GCPII a myšacej GCPIII.

Panel B: porovnanie epitopu, ktorý je rozpoznávaný protilátkou GCP-04 v ľudskej GCPII so sekvenciami ľudskej GCPIII a myšacej GCPIII.

Z obr. 24 je zřejmé, že protilátka GCP-04 rozpoznáva ako ľudskú GCPII, tak i ľudskú GCPIII a myšaciu GCPIII. Protilátka GCP-3-02 rozpoznáva iba ľudskú GCPIII.

5.6 Afinitná purifikácia rekombinantnej myšacej GCPIII(36-740)

Boli pripravené stabilné bunkové línie S2 hmyzích buniek produkujúce mGCPIII(36-740) do média (kap. 4.3.12). Po vyprodukovani 20 ml tohto média bol získaný proteín prečistený afinitnou chromatografiou (obr. 27), (kap. 4.3.13). Frakcie získané počas chromatografie boli analyzované pomocou SDS-PAGE (kap. 4.3.14) a následne boli vizualizované farbením striebrom (kap. 4.3.16). Na základe tohto farbenia sme zistili, že väčšina čistého proteínu mGCPIII(36-740) je prítomná vo frakcií E2 (obr. 27, dráha 10). Koncentrácia tohto proteínu v tejto frakcií bola stanovená denzitometricky z gélu farbeného striebrom pomocou programu ImageJ [75]. Výsledná koncentrácia proteínu je 3 ng/ μ l.



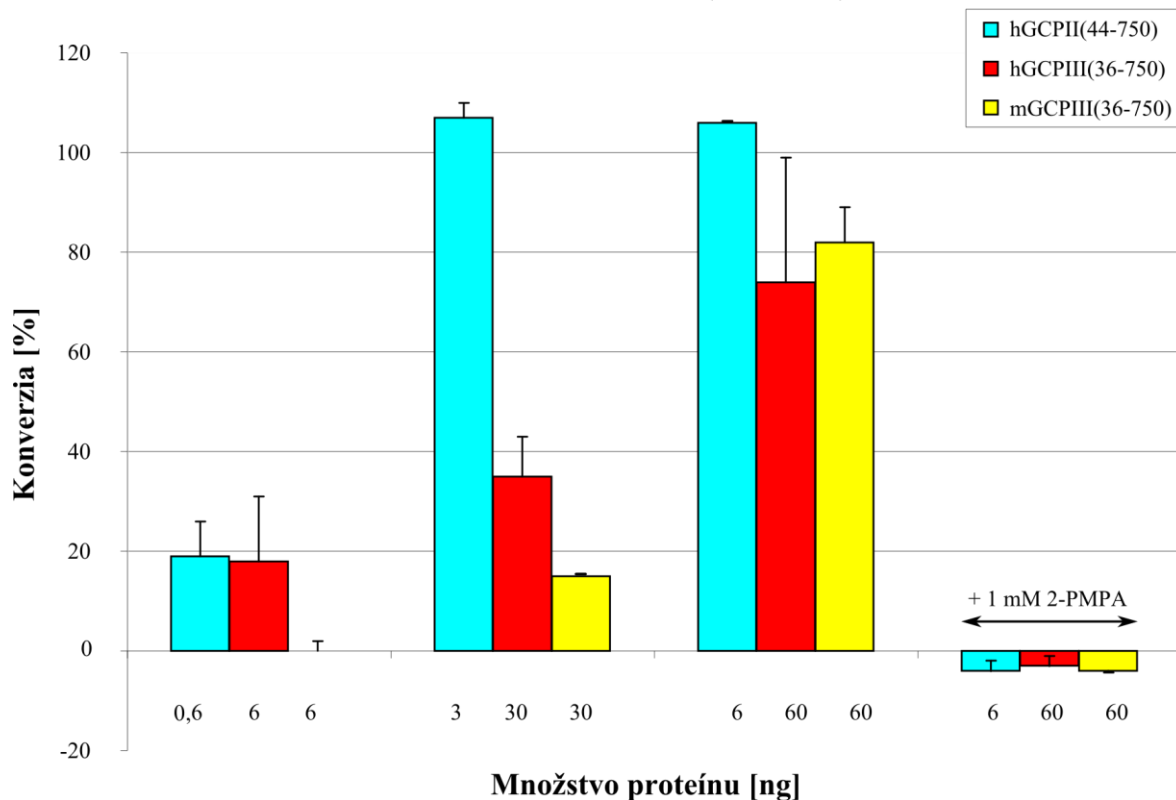
Obr. 27: Purifikácia extracelulárnej mGCPIII(36-740) afinitnou chromatografiou.

Dráha 1: All blue PM (1 μ l); dráha 2: GCPII márker (30 ng); dráha 3: GCPII márker (10 ng); dráha 4: médium po filtrácii; dráha 5: frakcia FT (6 μ l); dráha 6: frakcia W1 (6 μ l); dráha 7: frakcia W2 (18 μ l); dráha 8: frakcia W3 (18 μ l); dráha 9: frakcia E1 (18 μ l); dráha 10: frakcia E2 (18 μ l); dráha 11: frakcia E3 (18 μ l); dráha 12: frakcia E4 (18 μ l). Detailný popis frakcií vid'. 4.3.13.

5.7 Meranie enzýmovej aktivity mGCPIII

Pre meranie enzýmovej aktivity bola zámerné vyprodukovaná extracelulárna oblasť mGCPIII(36-740) a následne purifikovaná (obr. 27). Keďže sme získali len relatívne malé množstvo enzýmu, bol uskutočnený iba pokus o potvrdenie či vyvrátenie α -glutamátcarboxypeptidázovej aktivity (obr. 28, str.56).

Aktivita mGCPIII(46-740)



Obr. 28: Meranie α -glutamátcarboxypeptidázovej aktivity mGCPIII(36-740).

Relatívna aktivita mGCPIII(36-740) je zobrazená žltým stĺpcom. Ako kontrola bola použitá hGCPIII(36-740) (červený stĺpec) a hGCPII(44-750) (modrý stĺpec). Reakcie boli uskutočnené v duplikátoch a u jednotlivých stĺpcov sú uvedené relatívne odchýlky merania.

Z výsledkov vyplýva, že extracelulárna časť proteínu mGCPIII(36-740) vykazuje α -glutamátcarboxypeptidázovú aktivitu porovnateľnú s hGCPIII(36-740), ktorá je inhibovateľná 2-PMPA rovnako ako hGCPIII a hGCPII.

6 Diskusia

V úvode boli zhrnuté základné poznatky o ľudskej GCPII, o ktorej pojednáva veľká časť literatúry. Menej často sú však v literatúre skloňované slová paralógy a orthológy GCPII, ktorým je venovaný záver tejto časti.

Vo výsledkoch bakalárskej práce bola popísaná príprava rekombinantného proteínu mGCPIII, jeho produkcia, purifikácia, testovanie monoklonálnych protilátok a overenie enzýmovej aktivity.

V procese klonovania prišlo v dôsledku sekvenácie klonov B a D k odhaleniu jedno párovej delécie u klonu B a delécie o veľkosti 347 bp u klonu D. Jedno párová delécia v cDNA mGCPIII(1-740) mohla vzniknúť v procese RT-PCR. Reverzná transkriptáza, ktorá je jednou z komponent RT-PCR reakcie, ovplyvňuje mieru presnosti sekvencie RT-PCR produktu v porovnaní s templátom. Reverzné transkriptázy, používané v procese RT-PCR, sa navzájom líšia nielen rýchlosťou polymerizácie, ale i svojou chybovosťou. Pre RT-PCR bola použitá reverzná transkriptáza SuperScript III, ktorá sa nevyznačuje „proof-reading“ aktivitou. Jedná sa o 3',5' exonukleázovú aktivitu, ktorá znižuje chybovosť transkriptázy tým, že pri zaradení chybového nukleotidu sa transkriptáza vráti o jeden krok späť a nesprávny nukleotid nahradí správnym. Je možné sa preto domnievať, že vznik už spomínanej delécie je dôsledkom chybovosti použitej reverznej transkriptázy .

V prípade cDNA s 347 bp deléciou je táto možnosť vzniku delécie málo pravdepodobná, a preto sa domnievame, že sa nám podarilo prepísať práve takú formu mRNA, ktorá sa prirodzene vyskytuje v bunkách. Tejto skutočnosti nasvedčuje i fakt, že deletovaný úsek mRNA odpovedá celým exómom 16 a 17 v myšacom géne pre GCPII (analýza bola uskutočnená pomocou programu Spidey [74]). Táto forma mRNA mohla v bunke vzniknúť v dôsledku alternatívneho zostrihu pre-mRNA, kedy okrem vystrihnutia intrónov prišlo k vystrihnutiu i príslušných exónov. Keďže prepisom tejto mRNA nevzniká žiadny zmysluplný proteín, tak možno usudzovať, že samotná mRNA by mohla ovplyvňovať určité procesy v bunke. Tieto procesy však neovplyvňuje priamo, ale prostredníctvom takých foriem RNA, ktorým dáva vzniknúť. Jedná sa napríklad o dvojvláknové úseky RNA (siRNA), ktoré vznikajú štiepením slučiek a vlásienok, vytváraných spájaním určitých úsekov jedno vláknovej RNA, pomocou enzýmu Dicer [75].

Dôležitou časťou výsledkov bolo určenie špecifity protilátok GCP-04 (rozoznávajúca hGCPII) a GCP-3-02 (rozoznávajúca hGCPIII) voči mGCPIII.

Protilátka GCP-3-02 rozoznávala iba epitop hGCPIII, hoci je veľmi podobný s epitopom mGCPIII (obr. 25, str. 54). Zámena jednej aminokyseliny v sekvencii peptidu použitého na imunizáciu, hydrofóbneho izoleucínu za hydrofilný threonín, sa javí ako jediná vysvetliteľná príčina (obr. 26, panel A, str. 54). Epitopy hGCPII a hGCPIII rozoznávané protilátkou GCP-04 sa líšia zamenou jednej aminokyseliny podobne, ako v prípade sekvencie peptidu mGCPIII a hGCPIII u protilátky GCP-3-02 (obr. 26, str. 54). V prípade protilátky GCP-04 je známe, že táto jedno aminokyselinová zámena má za následok pokles citlivosti protilátky voči hGCPIII približne o jeden rád [39], zatiaľ čo u GCP-3-02 táto zámena viedla k neschopnosti danej protilátky rozpoznať mGCPIII v množstve nanesenom na gél (obr. 25, str. 54). Na základe toho možno usudzovať, že aminokyselina izoleucínu zohráva asi dôležitú úlohu pri rozpoznaní hGCPIII protilátkou GCP-3-02 ako aminokyselina lyzínu v rozpoznávaní hGCPII protilátkou GCP-04.

Protilátka GCP-04 rozpoznávala všetky tri testované proteíny (obr. 24, str. 54). Keďže sa epitop tejto protilátky u ľudskej a myšacej GCPIII nelíšia (obr. 26, panel B, str. 54), dá sa predpokladať, že citlivosť protilátky GCP-04 bude pre obidva tieto proteíny rovnaká. Rozdielna intenzita zón u vzoriek hGCPIII a mGCPIII by sa dala vysvetliť rôznou expresiou týchto proteínov v cicavčích bunkách, ktorá mohla nastať rozdielnou účinnosťou tranzientnej transfekcie. Protilátka GCP-04 teda môže rozpoznávať hGCPIII rovnako dobre ako mGCPIII, ale odlišné zastúpenie týchto proteínov v celkovom množstve proteínov v lyzáte sa výsledne mohlo prejaviť rozdielnou intenzitou sfarbenia.

Pre presné zistenie špecifity a citlivosti týchto protilátok bude ešte potrebné urobiť nové testovanie s vyčistením proteínom o známej koncentrácii, ktorý sme do tejto práce nezaradili z časových dôvodov.

Rovnako ako u hCPII či hGCPIII, tak i u mGCPIII bola radiochemickou metódou potvrdená α -glutamátcarboxypeptidázová aktivita, ktorá je inhibovateľná 2-PMPA. Vzhľadom k tomu, že na stanovenie výslednej koncentrácie proteínu bola v prípade hGCPII a mGCPIII použitá semikvantitatívna metóda a meranie aktivity bolo uskutočnené iba v duplikátoch, nemožno zo získaných výsledkov robiť konkrétne závery. Možno len povedať, že konverzia pre mGCPIII a hGCPIII je porovnateľná a zároveň približne o rád nižšia ako pre hGCPII. Príčina poklesu tejto aktivity u proteínov GCPIII nie je zatiaľ známa (kap. 2.6.1.1.2). Na základe vysokej podobnosti hGCPIII s mGCPIII, je možné očakávať podobnú príčinu poklesu α -glutamátcarboxypeptidázovej aktivity u obidvoch proteínov.

Pre detailnú enzýmovú charakteristiku mGCPIII bude potrebné uskutočniť purifikáciu tohto proteínu vo väčšom miere a získať tak väčšie množstvo proteínu, ktorý sa použije na presné určenie kinetických parametrov tejto proteázy.

7 Záver

- Z vybraného myšacieho tkaniva (jazyk) bola získaná DNA kódujúca celý proteín myšacej GCPIII
- Metódou molekulárneho klonovania bol pripravený plazmid pMT/BiP/Avi/TEV/ /mGCPIII(36-740) kódujúci extracelulárnu oblasť myšacej GCPIII a plazmid pTRE-Tight/mGCPIII(1-740) kódujúci celý proteín myšacej GCPIII
- Bolo zistené, že protilátka GCP-04 okrem ľudskej GCPII a ľudskej GCPIII rozpoznáva aj myšaciu GCPIII(1-740), zatiaľ čo protilátka GCP-3-02 rozpoznáva iba ľudskú GCPIII a nerozpoznáva myšaciu GCPIII(1-740)
- Extracelulárna časť myšacej GCPIII(36-740) bola exprimovaná v hmyzích bunkách a následne bola vyčistená za použitia afinitnej chromatografie
- Bolo zistené, že extracelulárna časť myšacej GCPIII(36-740) vykazuje α -glutamátcarboxypeptidázovú aktivitu, ktorá je rádovo porovnateľná s aktivitou ľudskej GCPIII(36-740)

Zoznam skratiek

[³ H]NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát značený tritiem na glutamátu
2-PMPA	2-(fosfonomethyl)pentándiová kyselina
2-MPPA	2-(3-merkaptopropyl)pentándiová kyselina
7E11-C5.3	myšacia monoklonálna protilátka proti GCPII
AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionát
bp	počet bazí (z angl. base pair)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CNS	centrálna nervová sústava
COS bunky	bunková línia odvodená z obličky z <i>Mačiaka zeleného</i>
CV	objem nosiča (z angl. column volume)
DDT	dithioltreathol
EPE	(2S,3'S)-{[(3'-amino-3'-carboxy-propyl)hydroxyphosphinoyl]methyl} pentandiová kyselina
EST	sekvenčná značka expresie (z angl. expressed sequence tag)
EGFP	zosílený zeleno floreskujúci proteín (z angl.enhanced green fluorescence protein)
GABA	γ -aminobutanová kyselina
GCPII	glutamátkarboxypeptidaza II
GCPIII	glutamátkarboxypeptidaza III
GPI5232	2-[[[(hydroxypentafluororfenyl)methyl]fosfinoyl]methyl] pentándiová kyselina
hGCPII	ľudská glutamátkarboxypeptidaza II
hGCPII(44-750)	extracelulárna časť ľudskej glutamátkarboxypeptidazy II
hGCPIII	ľudská glutamátkarboxypeptidaza III
HEK293	bunková línia odvodená z ľudských embryonálnych ľadvinových buniek (z angl. human embryonic kidney cell)
HRP	chrenová peroxidáza (z angl. horseradish peroxidase)
KO	z angl. knocked-out
LNCaP	bunečná línia odvodená od metastáz karcinómu prostaty do lymfatických uzlin (z angl. lymph node carcinoma of the prostate)
mGCPII	myšacia glutamátkarboxypeptidaza II

mGCPIII(1-740)	celý proteín myšacej glutamátkarboxypeptidazy III
mGCPIII(36-740)	extracelulárna časť myšacej glutamátkarboxypeptidazy III
mGluR	metabotropné glutamátové receptory
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
NAA	N-acetyl-L-aspartyl
β-NAAG	N-acetyl-β-L-aspartyl-L-glutamát
NAALADaza	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase
NAALADazaL	z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PBDA	4,4'-fosfiniková(bután-1,3-dikarboxylová kyselina)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
pGCPII	prasacia glutamátkarboxypeptidaza II
PSM'	alternatívne zostrihnutá forma GCPII
PSMA	membránový antigen špecifický pre prostatu (z angl. prostate-specific membrane antigen)
PSM-C	alternatívne zostrihnutá forma GCPII
PSM-D	alternatívne zostrihnutá forma GCPII
PSM-E	alternatívne zostrihnutá forma GCPII
PSMA-like	Prostate-Specific Membrane Antigen-Like
rGCPII	potkania glutamátkarboxypeptidaza II
VA-033	2-[[benzyloxy(hydroxyl)fosforyl]methyl]pentándiová kyselina
ZJ 43	(S)-2-[3-[(S)-1-karboxy-3-methylbutyl]ureo]pentándiová kyselina.

Príloha

Zoznam použitých prímérov

Název príméru	Sekvence príméru
MT	5'-catctcagtgcaactaaa-3'
FmusratGCPIIBstEII	5'-gcaggtgaccactcac-3'
BGH	5'-tagaaggcacagtcgagg-3'
M13reverse	5'-caggaaacagctatgac-3'
Fmus/ratGCPIIBstEII	5'-gcaggtgaccactcac-3'
Rmus/ratGCPIIBstEII	5'-gtgagtgggtcacctgc-3'
M13forward	5'-gtaaacgacggccag-3'
oligo(dT) ₂₀	5'- tttttttttttttttttt-3'
FmNAIIEXST	5'- aaaggatccgaaacaactacttctgctgg-3'
FmusGCPIIIVarc	5'-gtcagaggtactccctgaccc-3'
RmusGCPIII	5'-gggacactgaccaatgtgttatag-3'

Zoznam použitej literatúry

1. O'Keefe D.S., Su S.L., Bacich D.J., Horiguchi Y., Luo Y., Powell C.T., Zandvliet D., Russell P.J., Molloy P.L., Nowak N.J., Shows T.B., Mullins C., Haar R.A.V., Fair W.R., Heston W.D.W.: **Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene.** *Biochim Biophys Acta* 1998; 1443: 113-127
2. Watt F., Martorana M., Brookes D.E., Ho T., Kingsley E., O'Keefe D.S., Russell P.J., Heston W.D.W., Molloy P.L.: **A tissue-specific enhancer of Prostate-specific membrane antigen gene, *FOLH1*.** *Genomics* 2001; 73: 243-254
3. O'Keefe D.S., Bacich D., Heston W.D.W.: **Prostate specific mambrane antigen**, v knihe „Prostate cancer: biology, genetics and the new therapeutics.“, (Chung L.W.K., Issacs W.B., Simons J.W., edit.) Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2001, 307-326
4. Su S.L., Huang I.P., Fair W.R., Powell C.T., Heston W.D.W.: **Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression.** *Cancer Res* 1995; 55: 1441-1443
5. Cao K.Y., Mao X.P., Wang D.H., Xu L., Yuan G.Q., Dai S.Q., Zheng B.J., Qiu S.P.: **High expression of PSM-E correlated with tumor grade in prostate cancer: A new alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen.** *Prostate* 2007; 67: 1791-1800
6. Israeli R.S., Powell C.T., Fair W.R., Heston W.D.: **Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen.** *Cancer Res* 1993; 53: 227-230
7. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: D227-D233
8. Schülke N., Varlamova O.A., Donovan G.P., Ma D., Gardner J.P., Morrissey D.M., Arrigale R.R., Zhan C., Chodera A.J., Surowitz K.G., Maddon P.J., Heston W.D., Olson W.C.: **The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12590-5
9. Rajasekaran S.A., Anilkumar G., Oshima E., Bowie J.U., Liu H., Heston W., Bander N.H., Rajasekaran A.K.: **A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen.** *Mol. Biol. Cell* 2003;14, 4835-4845
10. Anilkumar G., Rajasekaran S.A., Wang S., Hankinson O., Bander N.H., & Rajasekaran A.K.: **Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity.** *Cancer Res* 2003; 63: 2645-2648
11. Davis M.I., Bennett M.J., Thomas L.M., Bjorkman P.J.: **Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 5981-5986
12. 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; 25: 1375-1384
13. Barinka C., Rovenská M., Mlčochová P., Hlouchová K., Plechanovová A., Majer P., Tsukamoto T., Slusher B.S., Konvalinka J., Lubkowski J.: **Structural insight into the pharmacophore pocket of human glutamate carboxypeptidase II.** *J Med Chem* 2007; 50: 3267-3273

14. Bařinka C., Starkov J., Konvalinka J. and Lubkowski J. **A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II.** *Acta Crystallografica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 2007; 63: 150-153.
15. Hlouchová K.: **Cloning, expression and biochemical characterization of glutamate carboxypeptidase III, a homolog of a metallopeptidase from the central nervous system.** *Praha, 2005*; 13. Diplomov práce; Karlova Univerzita v Praze
16. Klusk V., Bařinka C., Plechanovov A., Mlochov P., Konvalinka J., Ruliřek L., Lubkowski J.: **Reaction mechanism of glutamate carboxypeptidase II revealed by mutagenesis, X-ray crystallography, and computational methods.** *Biochemistry* 2009; 48: 4126-4138
17. Mlochov P.: **Structure, activity and metabolism of human glutamate carboxypeptidase II.** *Prague 2007*; 20. Dissertation Thesis. Charles University of Prague
18. Ghosh A., Heston W.D.W.: **Effect of carbohydrate moieties on the folate hydrolysis activity of the prostate specific membrane antigen.** *Prostate* 2003; 57: 140-151
19. Bařinka C., řcha P., Sklenr J., Man P., Bezouřka K., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity.** *Protein Sci* 2004; 13: 1627-1635
20. Robinson M.B., Blakely R.D., Couto R., & Coyle J.T.: **Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain.** *J. Biol. Chem* 1987; 262: 14498-14506
21. Pouwels P.J. and Frahm J.: **Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS.** *NMR Biomed* 1997; 10: 73-78
22. Neale J.H., Olszewski R.T., Gehl L.M., Wroblewska B., Bzdega T.: **The neurotransmitter N-acetylaspartylglutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia.** *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26(9): 477-484.
23. Halsted C.H., Ling E.H., Luthi-Carter R., Villanueva J.A., Gardner J.M., Coyle J.T.: **Folypoly-γ-glutamate carboxypeptidase from pig jejunum. Molecular characterization and relation to glutamate carboxypeptidase II.** *J Biol Chem* 1998; 273: 20417-20424 (errata v: *J Biol Chem* 2000; 275: 30746)
24. Kamen B.: **Folate and antifolate pharmacology.** *Semin Oncol* 1997; 24: 18-30
25. Bařinka C., Rinnov M., řcha P., Rojas C., Majer P., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II.** *J Neurochem* 2002; 80: 477-487
26. Jacson P.F., Cole D.C., Slusher B.S., Stetz S.L., Ross L.E., Donzanti B.A., Trainor D.A.: **Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase.** *J Med Chem* 1996; 39: 619-622
27. Slusher B.S., Vornov J.J., Thomas A.G.: **Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury.** *Nat Med* 1999; 5: 1396-1402
28. Tsukamoto T., Wozniak K.M., Slusher B.S.: **Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase inhibitors.** *Drug Discov Today* 2007; 12: 767-776
29. Vitharana D., France J. E., Scarpetti D., Bonneville G.W., Majer P., Tsukamoto T.: **Synthesis and biological evaluation of (R)- and (S)-2-(phosphonomethyl)pentanedioic acids as**

inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Tetrahedron Asymmetry* 2002; 13: 1609-1614

30. Majer P., Jackson P.F., Delahanty G., Grella B.S., Ko Y.S., Li W., Lui Q., Maclin M.K., Poláková J., Shaffer K.A., Stoermer D., Vitharana D., Wang Y.E., Zakrzewski A., Rojas C., Slusher B.S., Wozniak M., Burak E., Limsakun T., Tsukamoto T.: **Synthesis and biological characterization of thiol-based inhibitor of glutamate carboxypeptidase II: Discovery of orally active GCPII inhibitor.** *J Med Chem* 2003; 46: 1989-1996
31. Zhou J, Neale J.H., Pomper M.G., Kozikowski A.P.: **NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 1015-1026
32. Kozikowski A.P., Zhang J., Nan F., Petukhov P.A., Grajkowska E., Worblewski J.T., Yamamoto T., Bzedega T., Worblewska B., Neal J.H.: **Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents.** *J. Med. Chem.* 2004; 47: 1729-1738
33. Stoermer D., Lui Q., Hall M.R., Flanary J.M., Thomas A.G., Rojas C., Slusher B.S., Tsukamoto T.: **Synthesis and biological evaluation of hydroxamate-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13: 2097-2100
34. Thomas A.J., Vornov J.J., Olkowski J.L., Merion A.T., Slusher B.S.: **N-acetylated α -linked acidic dipeptidase converts N-acetylaspartylglutamate from a neuroprotectant to a neurotoxin.** *JPET* 2000; 295: 16-22
35. Doble A.: **The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy.** *Pharmacol. Ther.* 1999; 81: 163-221
36. Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K.: **Glutamate receptors in the mammalian central nervous system.** *Prog. Neurobiol.* 1998; 54: 581-618
37. Cotman C.W., Monaghan D.T., Ganong A.H.: **Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity.** *Neurosci.* 1988; 11: 61-80
38. Arundine M., Tymianski M.: **Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury.** *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004; 61: 657-668
39. Šácha P., Zámečník J., Bařinka C., Hlouchová K., Vřcha A., Mlřochová P., Hilgert I., Eckschlager T., Konvalinka J.: **Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain.** *Neurosci.* 2007; 144: 1361-1372
40. Wroblewska B., Wroblewski J.T., Pshenichkin S., Surin A., Sullivan S.E., Neale J.H.: **N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells.** *J. Neurochem.* 1997; 69: 174-181
41. Tsai S.J.: **Central N-acetyl-aspartylglutamate deficit: a possible pathogenesis of schizophrenia.** *Med. Sci. Monit.* 2005; 11: 39-45
42. Bruno V., Wroblewska B., Wroblewski J.T., Fiore L., Nicoletti F.: **Neuroprotective activity of N-acetylaspartylglutamate in cultured cortical cells.** *Neurosci.* 1998; 85: 751-757
43. Klener, P.: **Karcinom prostaty**, v kniře „Klinická onkologie“, Praha, Galén a Karolinum, 2002, 452-460
44. Howell T., Hailey D.: **Use of In-111 Capromab Pentetide in detecting metastatic prostate cancer.** *Edmonton : Alberta Heritage Foundation for Medical Research*, 1999; 1-26
45. Horoszewicz J.S., Kawinski E., Murphy G.P.: **Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients.** *Anticancer Res.* 1987; 7: 927-935
46. Troyer J.K., Beckett M.L., Wright G.L. Jr.: **Location of prostate specific membrane antigen in the LNCaP prostate carcinoma cell line.** *Prostate* 1997; 30: 232-242

47. Lopes A.D., Davis W.L., Rosenstraus M.J., Uveges A.J., Gilman S.C.: **Immunochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostate monoclonal antibody 7E11- C5.** *Cancer Res.* 1990; 50: 6423-6429
48. Lui H., Moy P., Kim S., Xia Y., Rajesakaran A., Navarro V., Kundsén B., Bander N.H.: **Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium.** *Cancer Res.* 1997; 57: 3629-3634
49. Bander N.H., Trabulsi E.J., Kostakoglu L., Yao D., Vallabhajosula A., Smith-Jones P., Joyce M.A., Milowsky M., mNanus D.M., Goldsmith S.J.: **Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen.** *J Urol.* 2003; 170 : 1717-1721
50. Bander N.H., Molowski M.I., Nanus D.M., Kostakoglu L., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J.: **Phase I trial of lutetium-labeled J591 , a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen , in patients with androgen-independent prostate cancer.** *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4591-4601
51. Murphy G.P., Greene T.G., Tino W.T., Boynton A.L., Holmes E.H.: **Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate specific membrane antigen.** *J Urol* 1998; 160: 2396-2401,
52. Fitch W.M.: **Homology a personal view on some of the problems.** *Trends Genet.* 2000; 16: 227-231
53. Pangalos M.N., Neefs J.M., Somers M., Verhasselt P., van der Bekkers M.H.L., Fraiponts E., Ashton D., Gordon R.D.: **Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated aliphatic acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity.** *J Biol Chem.* 1999; 274: 8470-8483
54. Hlouchová K., Bařinka C., Klusák V., Šácha P., Mlčochová P., Majer P., Rulišek L., Konvalinka J.: **Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III.** *J Neurochem.* 2007; 101: 682-696
55. Rovenská M., Hlouchová K., Šácha P., Mlčochová P., Horák V., Zámečník J., Bařinka C., Konvalinka J.: **Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs.** *Prostate* 2008; 68: 171-182
56. Hlouchová K., Bařinka C., Konvalinka J., Lubkowski J.: **Structural insight into the evolutionary and pharmacologic homology of glutamate carboxypeptidases II and III.** *FEBS J.* 2009; 276: 4448-4462
57. Bacich D.J., Ramadan E., O'Keefe D.S., Bukhari N., Wegorzewska I., Ojeifo O., Olszewski R., Wrenn C.C., Bzdega T., Wroblewska B., Heston W.D., Neale J.H.: **Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate.** *J Neurochem.* 2002; 83: 20-29
58. Tsai G., Dunham K.S., Drager U., Grier A., Anderson C., Collura J., Coyle J.T.: **Early embryonic death of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) homozygous mutants.** *Synapse* 2003 ; 50(4), 285-292
59. O'Keefe D.S., Bacich D.J., Heston W.D.W.: **Comparative analysis of Prostate-specific membrane antigen (PSMA) versus a prostate-specific membrane antigen- like gene.** *Prostate* 2004; 58: 200-210
60. 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.* 1997; 272: 31006-31015
61. Bzdega T., Turi T., Wroblewska B., She D., Chung H.S., Kim H., Neale J.H.: **Molecular cloning of a peptidase against N-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library.** *J Neurochem.* 1997; 69: 2270-2277

62. Slusher B.S., Robinson M.B., Tsai G., Simmons M.L., Richards S.S., Coyle J.T.: **Rat brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity. Purification and immunologic characterization.** *J Biol Chem.* 1990; 265: 21297-21301
63. Bacich D.J., Pinto J.T., Tong W.P., Heston W.D.W.: **Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase.** *Mamm Genome* 2001; 12: 117-123
64. 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.* 2004; 89: 627-635
65. Knedlík T.: **Klonování, exprese a biochemická charakterizace myši glutamát-karboxypeptidasy II.** *Praha 2010*; 49. Diplomová práce. Karlova Univerzita v Praze
66. Finnzymes: **Phusion® hot start high-fidelity DNA polymerase.** (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: http://www.finnzymes.com/pcr/phusion_hot_start_high_fidelity_dna_polymerase.html
67. QIAGEN: **QIAquick® Gel extraction Kit** *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols.* (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000252>
68. Invitrogen™: **TOPO TA Cloning® User Manual.** *Invitrogen Manuals & Documents.* (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf
69. QIAGEN: **QIAprep® Spin Miniprep Kit.** *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbook & Protocols* (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>
70. Tykvart J.: **One-step purification of recombinant glutamate carboxypeptidase II and its homolog.** *Prague 2009*; 23-24. Diploma Thesis. Charles University in Prague
71. Bradford M.M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254
72. QIAGEN: **RNeasy Mini Kit.** *Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols.* (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: http://labs.fhcr.org/fero/Protocols/RNeasy_Mini_Handbook.pdf
73. Databáza EST profile. (citované dňa 2. 6. 2010)
Webová adresa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.654487>
74. Clontech: Tet-on® and Tet-off® advanced inducible gene expression systems. (citované dňa 3. 6. 2010)
Webová adresa: http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=157247&tabno=2
75. Dostupné z <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; vytvoril Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD
76. Wheelan S.J., Church D.M., Ostell J.M., **Spidey: a tool for mRNA-to-genomic alignments.** *Genome Res.* 2001; 11: 1952-1957
77. Bagasra O, Prilliman KR (2004). **"RNA interference: the molecular immune system".** *J. Mol. Histol.* **35** (6): 545-53

Zoznam obrázkov

Obr. 1: Schematické znázornenie mRNA kódujúcej GCPII, jej možných zostrihových foriem a proteínov vzniknutých transláciou daných mRNA.....	9
Obr. 2: Kryštálová štruktúra extracelulárnej časti homodiméru GCPII.....	10
Obr. 3: Panel A: Aminokyseliny koordinujúce zinky v aktívnom mieste GCPII.....	11
Obr. 4: Štiepenie N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG).....	13
Štiepením N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG) vzniká N-acetyl-L-aspartát (NAA) a L-glutamát.....	13
Obr. 5: Štiepenie foyl(n)- γ -L-glutamátu.....	13
Obr. 6: N-acetyl- α -aspartyl-L-glutamát a N-acetyl- β -aspartyl-L-glutamát.....	14
Obr. 7: Prehľad inhibítorov GCPII.....	16
Obr. 8: Glutamátová excitotoxicita.....	18
Obr. 9: Porovnanie epitopov u ľudskej GCPII a GCPIII, rozpoznávaných monoklonálnou protilátkou GCP-04.....	22
Obr. 10: Koordinačná sféra zinočnatých iónov v hGCPIII a hGCPII.....	22
Obr. 11: Superpozícia aminokyselín tvoriacich väzbovú dutinu hGCPII a hGCPIII.....	23
Obr. 12 : Porovnanie primárnej sekvencie ľudskej GCPII, GCPIII, NAALADazy L a PSMA-like.....	26
Obr. 13: Porovnanie aminokyselínovej sekvencie ľudskej, myšacej, potkanej a prasacej GCPII.....	29
Obr. 14: cDNA mGCPIII(1-740) získaná reverznou transkripciou.....	45
Obr. 15: Elektroforeogram vzoriek po štiepení reštrikčnou endonukleázou <i>HindIII</i>	46
Obr. 16: Plazmid pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740) spolu so zakreslenými deléciami.....	47
Obr. 17: Štiepenie plazmidov pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),D a pCRII-TOPO/mGCPIII(1-740),B reštrikčnými endonukleázami <i>NheI</i> a <i>KpnI</i>	47
Obr. 18: Schematické znázornenie prípravy cDNA myšacej GCPIII.....	48
Obr. 19: Štiepenie DNA kódujúcej mGCPIII(36-740) reštrikčnými endonukleázami <i>BamHI</i> a <i>XhoI</i>	49
Obr. 20: Klonovanie mGCPIII(36-740) do vektoru pMT/Bip/Avi/TEV/hSR.....	50
Obr.21: Štiepenie plazmidu pMT/BiP/Avi/TEV/mGCPIII(36-740) reštrikčnými endonukleázami <i>XhoI</i> , <i>NheI</i>	50
Obr. 22: Klonovanie mGCPIII(1-740) z vektoru pCRII-TOPO do vektoru pTRE-Tight.....	52
Obr. 23: Expresia proteínu EGFP v HEK293offA2 bunkách.....	53
Obr. 24: Imunodetekcia mGCPIII z lyzátu buniek HEK293offA2 protilátkou GCP-04.....	54
Obr. 25: Imunodetekcia mGCPIII z lyzáto buniek HEK293offA2 protilátkou GCP-3-02.....	54
Obr. 26: Porovnanie sekvencií homológov GCPII rozpoznávaných protilátkami GCP-04 a GCP-3-02.....	54
Obr. 27: Purifikácia extracelulárnej mGCPIII(36-740) afinitnou chromatografiou.....	55
Obr. 28: Meranie α -glutamátcarboxypeptidázovej aktivity mGCPIII(36-740).....	56

Zoznam tabuliek

Tab. 1: Prehľad kinetických parametrov hydrolýzy NAAG pre ortológy ľudskej GCPII	28
Tab. 2: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre amplifikáciu extracelulárnej časti myšacej GCPIII	34
Tab. 3: Podmienky priebehu PCR	35
Tab. 4: Zloženie master mix použitého pre RT-PCR.....	35
Tab. 5: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre amplifikáciu myšacej GCPIII	35
Tab. 6: Podmienky priebehu PCR	36