

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Fyziologická a patofyziologická role GCPII v organismu

Physiological and pathophysiological role of GCPII in the body

MUDr. František Sedlák

2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Libor Víték, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Školitel: prof. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíle práce.....	7
3. Metody	8
4. Výsledky.....	9
4.1 Porovnání jednotlivých protilátek proti GCPII	9
4.2. Syntetická náhrada protilátek (iBodies) na bázi hydrofilního polymeru	11
4.3 Porovnání lidské a myší GCPII	12
4.4 Myš s vyřazeným genem GCPII má ve stáří zvětšené semenné vajíčky	13
4.5. GCPII neštěpí peptidy amyloidu β	15
4.6 Využití interakce inhibitor-GCPII k cílení nádorových buněk	16
5. Diskuze.....	18
6. Souhrn	23
7. Seznam použité literatury.....	24
8. Seznam publikací	28

Abstrakt

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) je metaloproteáza zodpovědná za štěpení neurotransmiteru N-acetyl-aspartyl-glutamátu v centrálním nervovém systému na N-acetyl-aspartát a glutamát. Současně v lidském tenkém střevě napomáhá vstřebávání folátů pomocí odštěpování γ -vázaných glutamátů z folyl-poly- γ -glutamátu. GCPII je u člověka exprimována i v řadě dalších orgánů (např. ledviny a prostata) a nádorech, kde však její fyziologická funkce není známa. Při komplexním studiu role tohoto enzymu v savčím organismu jsme nejprve charakterizovali komerčně dostupné monoklonální protilátky proti GCPII. Dále jsme vyvinuli jejich plně syntetickou náhradu založenou na hydrofilním polymeru s navázanými GCPII inhibitory. Poté jsme zhodnotili vhodnost užití myšního biomodelu pro studium funkce GCPII *in vivo*, kdy jsme zachytili rozdíl v expresním profilu GCPII v myši a člověku. U myši ani v prostatě, ani v tenkém střevě jsme GCPII nepozorovali. Pro zhodnocení fyziologické a patofyziologické funkce enzymu jsme analyzovali myší GCPII-deficientní model. Kromě pozorování zvětšených semenných váčků u starších samců jsme nezjistili žádný další zjevný fenotyp. Obdobně jsme vyvrátili i schopnost GCPII štěpit amyloidní peptidy ($A\beta_{1-40}$ a $A\beta_{1-42}$). Ukazuje se tak, že chybějící aktivita GCPII v organismu nemá žádné evidentní negativní dopady. Z toho lze usuzovat, že ani farmakologická inhibice GCPII nebude vést k významným nežádoucím účinkům. Lze tak předpokládat, že i klinické užití inhibitorů GCPII bude nejspíše bezpečné. V rámci cílení léčiv jsme prokázali, že interakce inhibitor-GCPII umožňuje specifické směřování rozličných nanostruktur do nádorových buněk, přičemž klíčová je optimalizace bio-nano rozhraní nanočástic k redukci nespecifické vazby.

Klíčová slova: GCPII, PSMA, FOLH1, glutamátcarboxypeptidasa II, prostaticky specifický membránový antigen, fyziologická funkce, inhibice, myší biomodel, zvětšené semenné váčky, cílení léčiv, GCPII deficientní myš, geneticky modifikovaná myš, náhrada protilátek, hydrofilní polymer, nádor, prostata, nanočástice, virům podobné částice, nanodiamanty

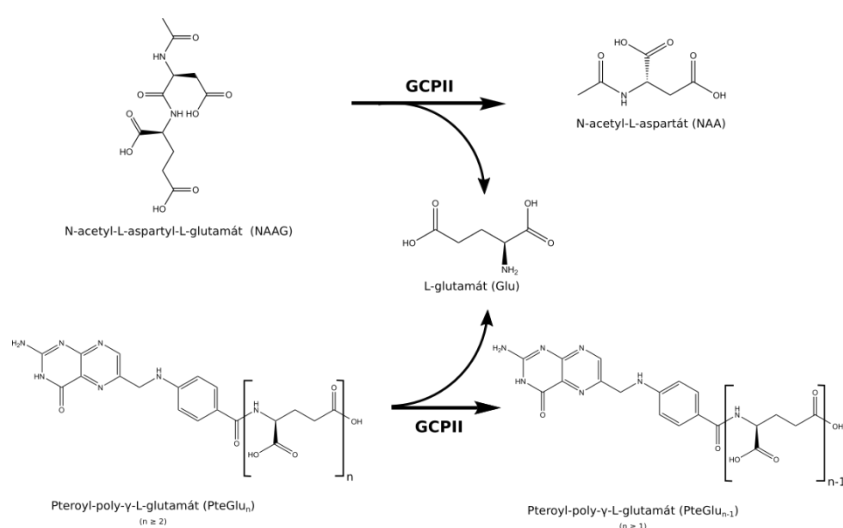
Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) is a metalloprotease responsible for cleaving the neurotransmitter N-acetyl-aspartyl-glutamate in the central nervous system to N-acetyl aspartate and glutamate. At the same time, in the human small intestine, it facilitates folate absorption by cleaving γ -linked glutamate from folyl-poly- γ -glutamate. In humans, GCPII is also expressed in a number of other organs (e.g., kidney and prostate) and tumors, where its physiological function is unknown. In an attempt to characterize the physiological function of the enzyme, we first characterized the commercially available monoclonal antibodies against GCPII. Further, we developed a fully synthetic replacement based on a hydrophilic polymer with bound GCPII inhibitors. We evaluated the suitability of using a murine biomodel to study GCPII function *in vivo*. We found the difference in GCPII expression profile in mouse and human. We did not observe GCPII in either the mouse prostate or small intestine. To assess physiological and pathophysiological functions of the enzyme we analyzed a GCPII-deficient mouse model. Apart from the observation of enlarged seminal vesicles in older males, we did not detect any other obvious phenotype. Similarly, we confirmed that GCPII cannot cleave amyloid peptides ($A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$). Thus, it appears that the lack of GCPII activity in the organism has no obvious negative effects. It can be therefore assumed that pharmacological inhibition of GCPII will not lead to significant adverse effects either and the clinical use of GCPII inhibitors will be likely safe. In the context of drug targeting, we have shown that the inhibitor-GCPII interaction allows specific targeting of different nanostructures to tumor cells, while the optimization of the nanoparticle bio-nano interface is important to reduce non-specific binding.

Keywords: GCPII, PSMA, FOLH1, glutamate carboxypeptidase II, prostate-specific membrane antigen, physiological function, inhibition, mouse biomodel, enlarged seminal vesicles, drug targeting, GCPII-deficient mouse, genetically modified mouse, antibody replacement, hydrophilic polymer, tumor, prostate, nanoparticles, virus-like particles, nanodiamonds

1. Úvod

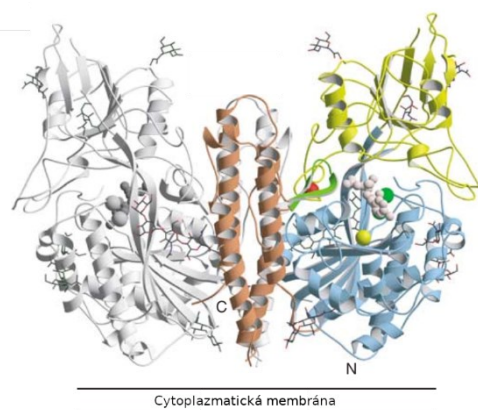
Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII), známá též jako prostaticky specifický membránový antigen (PSMA) a folylpoly- γ -glutamát-hydrolyasa I (FOLH1), je transmembránová metaloproteáza s karboxypeptidázovou aktivitou extracelulární části. Je zodpovědná za štěpení neurotransmiteru N-acetyl-aspartyl-glutamátu[1] v centrálním nervovém systému na N-acetyl-aspartát a glutamát a současně napomáhá v lidském tenkém střevě vstřebávání folátů pomocí odštěpování γ -vázaných glutamátů z foyl-poly- γ -glutamátu[2]. Příslušné reakce jsou zobrazeny na obrázku 1. Z ostatních substrátů jsou obecně preferovány kyselé dipeptidy (odtud také alternativní název N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase I – NAALADasa).



◀ Obrázek 1:
Hydrolytické reakce katalyzované GCPII. Molekuly vody jsou pro jednoduchost vynechány.

Strukturálně se jedná o glykoprotein 2. typu charakteru homodimeru, přičemž jednotlivé monomery se sestávají z krátké intracelulární části, transmembránového úseku a velké enzymaticky aktivní extracelulární části, jejíž struktura je znázorněna na obrázku 2, převzatého z [3].

Co se týče neenzymatických funkcí, je zvažována receptorová funkce [4], transportní funkce pro foláty [5] či funkce při kontrole mitózy v rámci anafázi podporujícího komplexu [6]. GCPII je také kromě mozku a tenkého střeva taktéž exprimovaná v řadě dalších tkáních, jako např. prostata (odtud PSMA), ledvina nebo slinná žláza [7-10], kde není biologická funkce dosud



▲ Obrázek 2 – Struktura extracelulární části GCPII, převzato a upraveno z [1]

známa. Dále je GCPII exprimována v nádorech, a to jak ve vlastních nádorových buňkách [7, 10-14], tak i nádorově asociované vaskulatuře [14-19]. Zde také není plně pochopena funkce GCPII a navíc není vzhledem k nesouladům v literatuře ani zcela jasné, jestli přítomnost GCPII ovlivňuje klinický průběh onemocnění [20-22]. Mezi zajímavé hypotézy, jaká je role GCPII v tumorech, patří transport folátů [5], tvorba glutamátu [23] včetně eventuálního ovlivnění glutamátové signalizace [24], urychlení mitozy [6], a i komplexní vliv na buněčnou signalizaci [25-27]. Co se právě signalizace týče, byla uvažována funkce GCPII v aktivaci β_1 integrinové signalizace v důsledku proteolytického zpracování peptidů vznikajících štěpením lamininu [28-30]. Dochází k aktivaci p21 aktivované kinázy (PAK-1) a k ovlivnění buněčné adheze a migrace, což je zvláště důležité v rámci angiogeneze. Dalším efektem aktivace GCPII je spuštění mitogenem aktivované kinázové (MAPK) dráhy [26, 27], případně dráhy proteinkinázy B (AKT) [25, 26].

Snaha o studium GCPII *in vivo* je komplikována různou expresí mezi jednotlivými živočišnými druhy, kdy rozdíly byly pozorovány zejména v oblasti urogenitálního a trávicího systému [31-33]. Užití genetických GCPII-deficientních modelů dále vedlo k rozporuplným výsledkům. Zatímco někteří autoři pozorovali embryonální letalitu [34, 35], jiní nepozorovali žádný výrazně nepříznivý fenotyp [36, 37].

Fyziologická a patofyziologická funkce GCPII tak mimo nervového systému a tenkého střeva není stále známá.

2. Cíle disertační práce

- Zhodnotit dostupné nástroje – protilátky pro stanovení obsahu GCPII, porovnat možnosti užití daných protilátek pro použití jednotlivými imunochemickými metodami, a zhodnotit případné možnosti stanovení homologů GCPII (GCPIII, myší, lidské proteiny). Pokusit se nahradit, v rámci analytických metod, ne vždy spolehlivé protilátky proti GCPII polymerními konjugáty.
- Zhodnotit možnosti využití myšího *in vivo* modelu pro studium GCPII porovnáním biochemických charakteristik myší a lidské GCPII a srovnáním expresního profilu tohoto proteinu u myši a člověka.
- Posoudit roli GCPII v Alzheimerově chorobě vzhledem k možnému štěpení amyloidu β , a tím i zhodnotit možný dlouhodobý nežádoucí efekt inhibice GCPII.

- Pomoci charakterizovat model a fenotyp GCPII deficientní myši a pomocí něj prozkoumat další možné fyziologické funkce GCPII, případně fyziologické důsledky inhibice GCPII.
- Zhodnotit a porovnat možnosti cílení GCPII jako známého nádorového antigenu pomocí různých typů nanostruktur (polymerní nanostruktury, částice podobné virům).

3. Metody

Metody použité v této disertační práci jsou zevrubně rozepsány v jednotlivých publikacích, přičemž můj podíl práce je uveden na konci jednotlivých souhrnů k publikacím. Naprostá většina práce byla vykonána na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB AV ČR). V rámci spoluprací mimo ÚOCHB AV ČR byly připraveny hydrofilní polymery na bázi N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) ve skupině dr. Etrycha (Ústav makromolekulární chemie Akademie věd české republiky). Myši model deficientní v genu pro GCPII byl vyvinut ve skupině funkční genomiky Dr. Sedláčka (BIOCEV). Virům podobné nanočástice odvozené z myšího polyomaviru byly vytvořeny ve skupině doc. Jitky Forstové (Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy). Zde pouze uvádím stručný seznam metod, které byly mnou přímo využity v souvislosti s přípravou této disertační práce.

Preparativní metody: purifikace malých molekul i proteinů užitím chromatografických technik, purifikace nanočástic užitím ultracentrifugace, kovalentní modifikace nanočástic i s použitím bioortogonálních technik

Analytické metody: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), měření fluorescenčních spekter, polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), imunoblot („western blot“) s chemiluminiscentní i fluorescenční detekcí, měření koncentrace proteinů Bradfordovou metodou, měření inhibičních konstant inhibitorů (K_i) pomocí stanovení enzymové aktivity metodou konečného bodu (tj. měření koncentrace produktu po zastavení enzymové reakce), imunohistochemické metody, charakterizace interakcí látek s živými savčími buňkami (včetně kultivace tkáňových kultur) metodami konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie, analýza obrazu

In-vivo metody: práce s experimentálními zvířaty (myši), disekce jednotlivých orgánů

4. Výsledky

Mé výsledky studia proteinu GCPII vyústily ve vznik šesti publikací, z nichž všechny prošly recenzním řízením, přičemž na dvou publikacích jsem prvním autorem (jedno prvoautorství je sdílené). Mimo to, studium metod analýzy proteinu GCPII pomocí HPMA polymeru nakonec vyústilo v obecnější analytický přístup, na který byla získána mezinárodní patentová ochrana. Dále mám v souvislosti s tématem disertace rozpracovány dvě prvoautorské práce, které jsou ve fázi těsně před odesláním k publikaci. Vzhledem k tomu, že ale ještě nejsou publikovány, rozhodl jsem se je nakonec do této disertace nezařadit. Každá takto vzniklá publikace byla dílem řady autorů, přičemž můj přínos je vždy shrnut na konci příslušného popisu.

4.1 Porovnání jednotlivých protilátek proti GCPII

Tykvar J, Navrátil V, **Sedlák F**, Corey E, Colombatti M, Fracasso G, Koukolík F, Bařinka C, Šácha P, Konvalinka J. **Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA).** *Prostate*. 2014 Dec;74(16):1674-90.

Monoklonální protilátky tvoří vzhledem ke své specifické vazbě s antigenem jeden ze základních analytických nástrojů v biochemii. Konkrétně pro analýzu GCPII je v současnosti k dispozici řada různě charakterizovaných protilátek pocházejících jak z akademické sféry, tak od komerčních institucí. Vzhledem k tomu, že řada těchto protilátek doposud nebyla důkladně popsána, mohlo by jejich užití vést k rozdílným výsledkům, a i k případným chybám v interpretaci. Cílem této práce bylo charakterizovat 13 nejběžnějších monoklonálních protilátek za použití standardních biochemických analytických metod.

Pomocí metody ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) a pomocí povrchové plasmonové rezonance (SPR – „surface plasmon resonance“) byla kvantifikována vazba protilátek na nativní event. i denaturovaný antigen. S nativní GCPII interagovaly protilátky D2B, J415, J591, 2G7, 107-1A4, 24.4E6 a GCP-05 (tabulka 1), kdežto na denaturovanou GCPII se vázaly protilátky GCP-04, J591, GCP-02, 3E6, 7E11-C5.3, YPSMA-1, YPSMA-2 (tabulka 2). Byly pozorovány výrazné rozdíly jak v koncentracích, při kterých k vazbě docházelo, tak i v maximálním signálu (až $7 \times$ pro nativní, respektive až $54 \times$ pro denaturovaný antigen). Protilátky GCP-02, 3E6 a GCPII-04 byly navíc schopny vázat i denaturovaný myší homolog GCPII a protilátka GCPII-04 dokonce i lidský a myší homolog GCPIII. K lepšímu pochopení vazby protilátek na homology GCPII bylo u protilátek vázajících denaturovaný antigen provedeno mapování epitopu.

Tabulka 1 ► – Vazba protilátek na nativní GCPII. Výsledek proložení saturačních křivek vazby protilátek na antigen pomocí metody ELISA. Maximální signál udává relativní maximální dosaženou hodnotu luminiscence v metodě ELISA pro danou protilátku. 50 % saturace vyjadřuje koncentraci protilátky, při které bylo dosaženo 50 % maximálního signálu. Maximální signál u protilátek 24.4E6 a GCP-05 nebyl určen pro použití jiného množství imobilizované GCPII („NC“).

Protilátka	50% saturace	Maximální signál
D2B	0,072 ± 0,013 nM	4.8
J415	0,163 ± 0,022 nM	3.9
J591	1,4 ± 0,27 nM	6.9
2G7	2,89 ± 0,25 nM	1.0
107-1A4	3,81 ± 0,43 nM	2.6
24.4E6	365 ± 77 nM	NC
GCP-05	550 ± 130 nM	NC

Tabulka 2 ► – Vazba protilátek na denaturovanou GCPII. Výsledek proložení saturačních křivek vazby protilátek na antigen pomocí metody ELISA. Maximální signál udává relativní maximální dosaženou hodnotu luminiscence v metodě ELISA pro danou protilátku. 50 % saturace vyjadřuje koncentraci protilátky, při které bylo dosaženo 50 % maximálního signálu. Maximální signál u protilátek 7E11-C5.3 nebyl určen pro použití jiného antigenu

Protilátka	50% saturace	Maximální signál	Epitop
GCP-04	0,628 ± 0,066 nM	54	91–108
J591	3,06 ± 0,89 nM	1	ND
GCP-02	5,2 ± 1,2 nM	40	271–288
3E6	9,8 ± 1,7 nM	9	118–135
7E11-C5.3	9,9 ± 3 nM	NC	1–21
YPSMA-1	61 ± 17 nM	7	469–486
YPSMA-2	216 ± 55 nM	42	469–486
24.4E6	267 ± 49 nM	5	640–657

(intracelulární peptid). Epitop značí sekvenci peptidu, který je schopen interagovat s danou protilátkou, přičemž čísla udávají jeho lokalizaci na primární sekvenci lidské GCPII.

S výsledky kvantitativní analýzy úzce souvisí kvalitativní výsledky použitých protilátek v běžných biochemických metodách. Zatímco protilátky interagující s denaturovaným antigenem vykazovaly na „western blotu“ silný (GCP-02, GCP-04 a YPSMA-1) respektive střední signál (3E6, YPSMA-2 a

7E11-C5.3), protilátky reagující i s nativním antigenem vykazovaly slabý signál (24.4E6, D2B a J591). Obdobně u imunohistochemie na parafinových řezech bylo barvení na GCPII pozitivní v případě protilátek proti denaturovanému antigenu (GCP-02, GCP-04, YPSMA-1, YPSMA-2, 24.4E6, 3E6). Naproti tomu použití nativní průtokové cytometrie

Tabulka 3 ▼ – Semikvantitativní hodnocení protilátek pro jednotlivé bioanalytické metody („FC“ značí průtokovou cytometrii, „WB“ – imunoblot -, „western blot“ a IHC-P – imunohistochemii na parafinových řezech). Vhodnost je znázorně na škále, kde „-“ znamená nevhodné a naopak „+++“ nejvhodnější. Protilátka 7E11-C5.3 je označena hvězdičkou (*) vzhledem k použití syntetického intracelulárního peptidu v metodě ELISA.

Protilátka	nativní GCPII		denaturovaná GCPII		
	ELISA	FC	ELISA	WB	IHC-P
J591	+++	+++	+	+	-
J415	+++	+++	-	-	-
D2B	+++	+++	+	+	-
107-1A4	+++	+++	-	-	-
2G7	++	++	-	-	-
GCP-05	+	+++	-	-	-
7E11-C5.3*	++	-	++	++	-
GCP-02	-	-	+++	+++	+++
GCP-04	-	-	+++	+++	+++
YPSMA-1	-	-	++	+++	+++
YPSMA-2	-	-	++	++	+++
3E6	-	-	++	++	++
24.4E6	+	-	+	+	++

nepřekvapivě vyžadovalo použití protilátek vázajících nativní antigen (J591, J415, D2B, 107-1A4, 2G7 nebo GCP-05). Výsledky praktického užití protilátek v jednotlivých biochemických metodách jsou semikvantitavně zhodnoceny v tabulce 3.

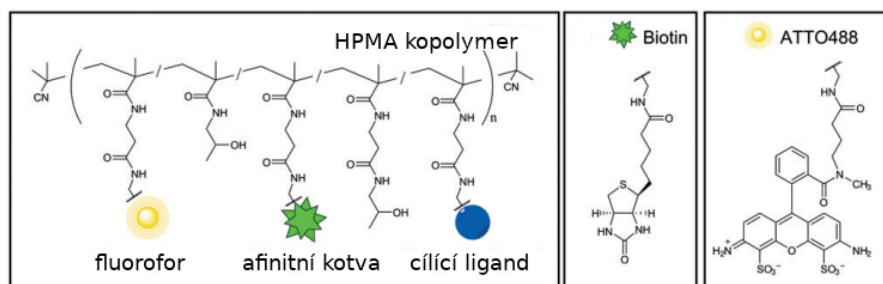
Mým podílem na této práci bylo provedení všech imunohistochemií a jejich interpretace. U vybraných protilátek (GCP-02 a GCP-04) jsem provedl i předběžné zhodnocení vazby homologů GCPII pomocí „western blotu“ a též předběžné mapování epitopu. Podílel jsem se i na vyhodnocení dalších experimentů a diskusi výsledků.

4.2 Syntetická náhrada protilátek (iBodies) na bázi hydrofilního polymeru

Šácha P, Knedlík T, Schimer J, Tykvar J, Parolek J, Navrátil V, Dvořáková P, **Sedlák F**, Ulbrich K, Strohalm J, Majer P, Šubr V, Konvalinka J. **iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 Feb 12;55(7):2356-60.

Selektivní vazba protilátek k antigenu je klíčová vlastnost umožňující jejich využití jako nástroje v biochemii. Vzhledem k tomu, že naše předchozí studie (kapitola 4.1) ukázala, že vlastnosti běžně dostupných protilátek proti GCPII se značně liší, a vzhledem k našemu pozorování, že modifikace protilátek může být obtížná, pokusili jsme se navrhnout čistě syntetický systém, který by umožnil protilátky v bioanalytických metodách nahradit, nebo event. i překonat.

Základní součástí náhrady protilátek, kterou v této práci představujeme, byl polymer na bázi N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidu (HPMA), na který byl kovalentně navázán cílicí ligand, např. inhibitor, a dále pak afinitní kotva (biotin) a vhodný fluorofor (obrázek 3). Tento postup byl otestován na modelovém případě proteázy GCPII, proteázy z viru HIV, pepsinu a proteinu s polyhistidinovou sekvencí. Vzhledem k tomu, že na jednu molekulu polymeru (iBody) bylo navázáno větší množství cílicího ligandu – u polymeru proti GCPII průměrně 19 molekul inhibitoru, byl navíc pozorován výrazný aviditní efekt, kdy hodnota K_i poklesla cca $465 \times$ ve srovnání s hodnotou volného inhibitoru (K_i polymeru 4,3 pM vs. K_i inhibitoru 2 nM). Toto výrazné zvýšení afinity přibližuje disociační konstantu daného iBody (< 20 pM) k nejlepším dostupným protilátkám proti GCPII.



◀Obrázek 3 –

Schematické zobrazení struktury HPMA polymeru s kovalentně navázaným fluoroforem (ATTO488), afinitní kotvou (biotin) a cílicím ligandem (např. inhibitor GCPII).

Kromě užití iBody k inhibici byla na různých modelových případech potvrzena vazba pomocí SPR, a možnost využití v metodě ELISA, průtokové cytometrie, zobrazování živých buněk (imunocytochemie pomocí konfokální mikroskopie), imunoprecipitace a metody imunoblotu - „western blot“. Připravené iBody proti GCPII je současně univerzálním nástrojem pro další analýzu funkce GCPII. Mou prací byla optimalizace využití iBodies pro použití v zobrazování živých buněk (imunocytochemie) pomocí konfokální mikroskopie.

4.3 Porovnání lidské a myší GCPII

Knedlík T, Vorlová B, Navrátil V, Tykvart J, Sedlák F, Vaculín Š, Franěk M, Šácha P, Konvalinka J. **Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has a similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII.** *FEBS Open Bio.* 2017 Aug 29;7(9):1362-1378.

Pro výzkum fyziologických a patofyziologických funkcí na úrovni organismu je nezbytný *in vivo* model. Vzhledem k tomu, že myší modely jsou obecně nejběžněji používané a dostupné, pokusili jsme se v předkládané práci zhodnotit jejich využitelnost pro studium GCPII. Optimální zvířecí model totiž musí pro přenositelnost poznatků do humánní medicíny, kromě dostupnosti, splňovat podmínku dostatečné podobnosti s člověkem.

Porovnání myší a lidské GCPII proběhlo nejprve na proteinové úrovni. Nepřekvapivě vzhledem k vysoké podobnosti v aminokyselinové sekvenci – 86 % identita, 91 % podobnost [38] byla zachována enzymová aktivita i substrátová specifita. Myší homolog GCPII byl schopen štěpit NAAG na NAA a glutamát, stejně tak jako odštěpovat γ -koncové glutamáty s pteroylpoly- γ -glutamátu. Enzymatická aktivita myšího homologu byla však nižší, zejména pro vyšší hodnotu K_M (viz tabulka 4). Substrátová specifita studovaná na N-terminálně acetylované dipeptidové knihovně vykazovala u myší GCPII obdobný vzor jako u lidského homologu, pouze byla zvýrazněna specifita pro štěpení dipeptidů s C-terminálním glutamátem. Naprostá většina inhibitorů byla schopná identicky inhibovat myší i lidskou variantu GCPII.

Tabulka 4 – Kinetické parametry rekombinantní myší a lidské GCPII stanovené pro NAAG radioenzymatickou metodou [39] nebo pro pteroyl-di-L- γ -glutamát HPLC metodou [40], zobrazeny průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka.

Enzym	NAAG			Pteroyl-di-L-glutamát		
	K_M [nM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\times 10^7 s^{-1} M^{-1}$]	K_M [nM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\times 10^7 s^{-1} M^{-1}$]
Avi-mGCPII	1900 \pm 100	1,44 \pm 0,02	0,077 \pm 0,001	290 \pm 20	3,63 \pm 0,09	1,26 \pm 0,08
Avi-hGCPII	550 \pm 60	1,45 \pm 0,04	0,265 \pm 0,007	39 \pm 2	5,09 \pm 0,09	13,20 \pm 0,80

Dále byl porovnán expresní profil, a to jak na úrovni aktivity (hydrolýza NAAG na NAA a glutamát), exprese samotného proteinu. Vzhledem k velmi podobným vlastnostem myší GCPII

a GCPIII, byla pro jejich odlišení aplikována i analýza v tkáních přítomné mRNA. V myši, obdobně jako u člověka, byla zachycena vysoká exprese v mozku a v ledvinách, naopak u myši oproti člověku nebyla zachycena exprese v prostatě a do větší míry ani v tenkém střevě (jejunu ani ileu). Vedlejším nálezem byla variabilní exprese GCPII v myších slinných žlázách, která byla dále potvrzena imunohistochemicky, a to zejména v podjazykové slinné žláze. Vzhledem k výrazné podobnosti mezi GCPII a jejím homologem GCPIII, jak v enzymatické aktivitě, tak i schopnosti být rozpoznán použitou protilátkou GCP-04 bylo doplněno i hodnocení na úrovni transkriptů, které korelovalo s nálezem na proteinové úrovni.

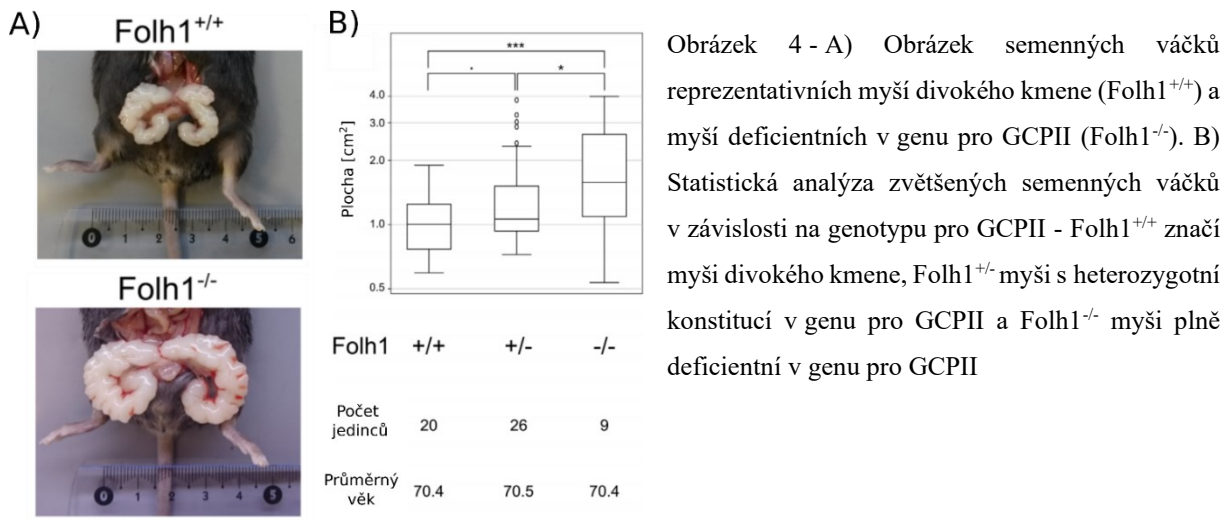
Souhrnně, biochemická charakterizace na proteinové úrovni neukázala výraznější rozdíly. Oproti tomu exprese GCPII v myši se lišila chybějící expresí v prostatě a do značné míry i v tenkém střevě. Zatímco u prostaty to může být dáno výrazně odlišnou anatomicko-histologickou strukturou [41], tak u střeva může být obdobně jako u potkana [33] funkce štěpení pteroyl-poly-glutamátu zprostředkována aktivitou gamma-glutamyl hydrolázy. Vzhledem k této tkáňové distribuci, lze předpokládat, že myší modely funkce GCPII v nervovém systému jsou přenositelné i na člověka, kdežto stran studia karcinogeneze v prostatě není volba myši jako experimentálního zvířete ideální. Mým podílem v této práci byl odběr vybraných myších tkání a provedení imunohistochemické analýzy. Podílel jsem se i na analýze a diskusi experimentálních výsledků.

4.4 Myš s vyřazeným genem GCPII má ve stáří zvětšené semenné vajíčky

Vorlová B, Sedlák F, Kašpárek P, Šrámková K, Malý M, Zámečník J, Šácha P, Konvalinka J. **A novel PSMA/GCPII-deficient mouse model shows enlarged seminal vesicles upon aging.** *Prostate*. 2019 Feb;79(2):126-139.

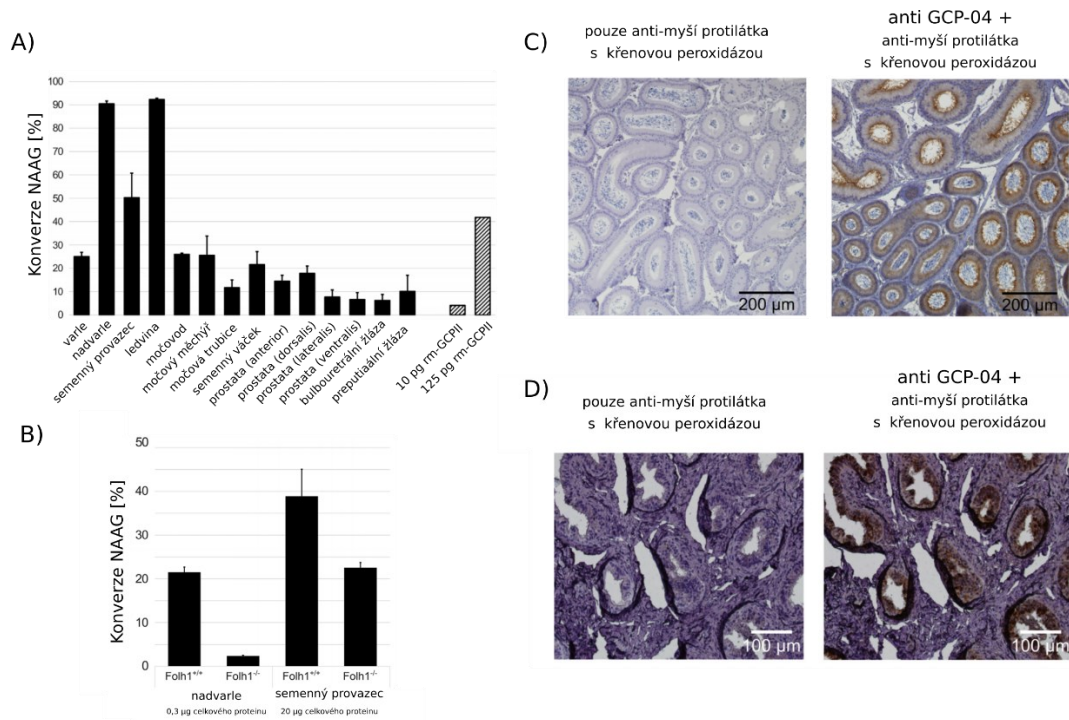
Jeden ze základních prostředků pro výzkum fyziologické a patofyziologické aktivity jednotlivých genů tvoří zvířata deficientní v daném genu. Přestože byla již publikována řada myších modelů s vyřazeným genem pro GCPII, výsledky byly ve vzájemném nesouladu. Zatímco některé práce [34, 35] uvádějí embryonální letalitu, tak další studie [36, 37] neprokazují žádný zjevný patologický fenotyp. Proto jsme vytvořili další nezávislý model GCPII deficientní myši pomocí TALEN (efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům). Zatímco v přechodných pracích [37, 42] byl ponejvíce analyzován efekt GCPII na funkci nervového systému, ostatní možné fenotypy, mimo jiné např. v urogenitálním systému, byly studovány do výrazně menší hloubky, navíc v přechodných studiích nebyly studovány stárnoucí myši.

U stárnoucích myší jsme obdobně jako v práci [43] pozorovali zvětšení semenných váčků, přičemž ke zvětšení u myší deficientní v genu pro GCPII ($Folh1^{-/-}$) docházelo dříve. Reprezentativní fotografie semenných váčků a porovnání velikostí semenných váčků je zobrazeno na obrázku 4.



Následně provedená histologická analýza zvětšených semenných váčků prokázala pouhou dilataci, bez dalších přidavných patologií. Vzhledem k tomuto pozorování jsme provedli zevrubné měření aktivity GCPII ve většině tkání urogenitálního systému, přičemž pouze v ledvině, nadvarleti a chámovodu jsme zachytili významnou expresi GCPII (182 ± 12 ng GCPII/mg tkáně v nadvarleti a 2.3 ± 1 ng/mg tkáně v chámovodu). Takto výrazný záchyt GCPII v nadvarleti, představující cca desetinásobek obsahu v mozku, byl nadále potvrzen pomocí imunohistochemie, a to jak na vzorcích myšího, tak i lidského nadvarlete (obrázek 5). Celkově tak zvětšení semenných váčků u starších myší tvoří první fenotyp v urogenitálním systému související s expresí GCPII.

Mým přínosem byl podíl na pitvách jednotlivých tkání, obzvláště v oblasti urogenitálního traktu, měření plochy semenných váčků a předběžná statistická analýza. Dále jsem provedl imunohistochemii lidských i myších nadvarlat. Podílel jsem se i na analýze a diskusi experimentálních výsledků.



Obrázek 5. Měření exprese GCPII v urogenitálním traktu. A) Zhodnocení přítomnosti GCPII pomocí měření aktivity štěpení NAAGu, rm-GCPII (rekombinantní myšší GCPII) slouží jako aktivní standard. B) Porovnání štěpení NAAGu u tkání pocházejících z myši divokého kmene (Folh1^{+/+}) a myši deficientních v genu pro GCPII (Folh1^{-/-}) potvrzuje přítomnost GCPII v nadvarletu a semenném provazci. C) Imunohistochemie myšského nadvarlete nasvědčuje přítomnosti GCPII na lumenální straně tubulů. D) Imunistochemie lidského nadvarlete svědčí pro přítomnost GCPII také na lumenální straně tubulů.

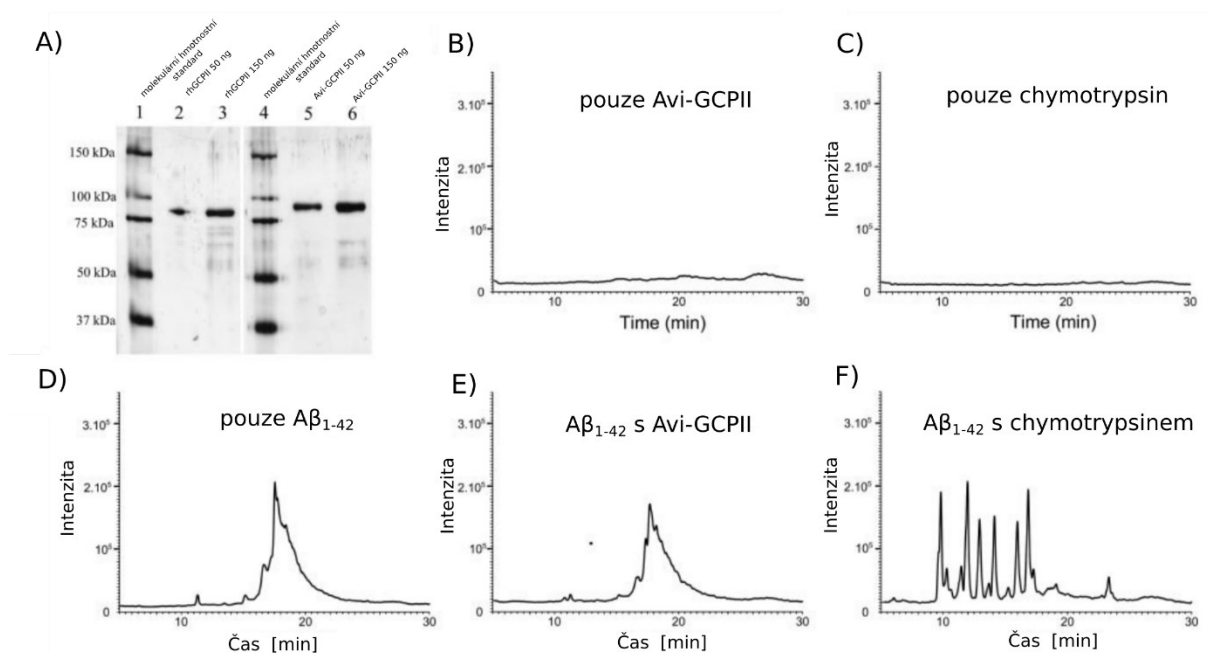
4.5 GCPII neštěpí peptidy amyloidu β

Sedlák F, Šácha P, Blechová M, Březinová A, Šafařík M, Šebestík J, Konvalinka J. **Glutamate carboxypeptidase II does not process amyloid- β peptide.** *FASEB J.* 2013 Jul;27(7):2626-32.

Fyziologickou funkcí GCPII v nervovém systému je štěpit neurotransmitter NAAG na NAA a glutamát [1], což vzhledem k neuroprotektivnímu chování NAAGu [44], nasvědčuje možnosti užití inhibitorů GCPII jako neuroprotektiva [45-48]. Nicméně, v r. 2010 byla v prestižním *FASEB J.* publikována velmi překvapivá práce korejských autorů, která reportovala schopnost GCPII degradovat amyloid β a amyloidní fibrily [49]. To vedlo ke znepokojivé hypotéze, zda by aplikace GCPII inhibitorů by mohla mít jako vedlejší nežádoucí účinek případný vznik plaků amyloidu β a tím podněcovat vznik Alzheimerovy choroby. Kdyby se tato hypotéza potvrdila, znamenalo by to zastavení velmi slibných klinických experimentů s inhibitory GCPII v řadě dalších terapeutických nebo diagnostických indikací.

K prošetření tohoto problému jsme rekombinantní protein GCPII inkubovali se synteticky připraveným peptidem amyloid- β_{1-42} . Případné degradační produkty a vlastní úbytek amyloidu- β jsme pozorovali pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem. Zatímco kontrolní proteázy (neprilysin, chymotrypsin) amyloid- β štěpily,

štěpení pomocí GCPII se nám, kromě velmi pomalého odštěpení jedné N-terminální aminokyseliny – aspartátu, nepodařilo potvrdit. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 6. Aktivita vlastního rekombinantního proteinu byla následně ověřena štěpením NAAGu. Obdobných výsledků dosáhli i v paralelně publikované práci [50] u peptidu amyloid- β_{1-40} . Souhrnně lze usoudit, že GCPII amyloidní peptidy neštěpí, a tudíž riziko nežádoucích účinků ve smyslu iniciace Alzheimerovy choroby u inhibitorů GCPII je nepravděpodobné.



Obrázek 6. HPLC-MS analýza reakčních směsí a kontroly hydrolyzy $A\beta_{1-42}$ A) SDS-PAGE elektroforetogram prokazující čistotu rekombinantních proteinů GCPII. Popisky nad elektroforetogramem uvádějí nanášky v jednotlivých jamkách gelu. V částech B-F jsou zobrazeny chromatogramy zobrazující celkový iontový proud pro jednotlivé enzymové reakce a kontroly, přičemž v B) je samotný enzym Avi-GCPII, v C) samotný chymotrypsin, v D) samotný amyloid $A\beta_{1-42}$, v E) reakce amyloidu $A\beta_{1-42}$ s GCPII a v F) reakce amyloidu $A\beta_{1-42}$ s chymotrypsinem.

Mým příspěvkem byla purifikace peptidu amyloidu $A\beta_{1-42}$, návrh i provedení vlastních štěpení amyloidu β pomocí GCPII a kontrolními proteázami, optimalizace separace vzniklých peptidů použitím kapalinové chromatografie, a charakterizace čistoty enzymu pomocí gelové elektroforézy. Všechny experimenty jsem analyzoval, jejich výsledky diskutoval a podílel se na sepsání publikace.

4.6 Využití interakce inhibitor-GCPII k cílení nádorových buněk

Neburková J, **Sedlák F**, Žáčková Suchanová J, Kostka L, Šácha P, Šubr V, Etrych T, Šimon P, Bařínková J, Kryštufek R, Španielová H, Forstová J, Konvalinka J, Cígler P. **Inhibitor-GCPII Interaction: Selective and Robust System for Targeting Cancer Cells with Structurally Diverse Nanoparticles.** *Mol Pharm.* 2018 Aug 6;15(8):2932-2945.

Cílení GCPII jako nádorového antigenu pomocí řady přístupů (inhibitor, protilátka, aptamer, atp.) bylo již popsáno v řadě publikací [51-65]. V naší přecházející práci (kapitola 4.2) jsme

taktéž prokázali velmi silnou interakci polymeru na bázi HPMA dekorovaného inhibitory GCPII s vlastní proteázou GCPII, umožňující vizualizaci buněk. Na základě tohoto úspěšného cílení jsme se pokusili vytvořit řadu různých dalších nanostruktur, které by byly cíleny pomocí GCPII inhibitoru, a tak ověřit, jak je systém GCPII – inhibitor robustní pro případnou diagnostiku a event. terapii cílenými léčivy.

Jako příklady nanočástic byly zvoleny nanodiamanty, virům podobné částice (VLP) z bakteriofágu Q β a myšího polyomaviru, a polymerní nanostruktury založené na HPMA. VLP byly pro porovnání kromě přímé modifikace pomocí inhibitoru i dekorovány pomocí HPMA polymeru. Tyto částice se výrazně lišily jak ve své velikosti, rigiditě, tak i bio-nano rozhraní. Přesto všechny vytvořené částice interagovaly s rekombinantním GCPII, jak bylo prokázáno inhibicí enzymatické aktivity, tak i pomocí SPR (tabulka 5). Stran inhibiční aktivity byl pozorován aviditní efekt, který koreloval s množstvím navázané inhibiční substance na částici, zatímco základní inhibitory měly inhibiční konstantu K_i v nízkém nanomolárním rozmezí (2-14 nM), tak v případě polymerních částic došlo ke snížení K_i na subnanomolární koncentrace (323 pM), a v případě ostatních částic až na hodnoty v pikomolární oblasti (0,6-3,92 pM). Předpokládáme, že dosažení takto nízkých inhibiční konstant bylo umožněno výrazně pomalejší disociací nanočástic pro velmi nízkou hodnotou k_{off} způsobenou aviditním efektem.

Tabulka 5. Charakterizace inhibičních konstant nanočástic i zdrojových inhibitorů. Označení nanočástic je následující: „ND-inh“ – částice nanodiamantu s inhibitory, „pol-inh“ – HPMA polymer s inhibitory, „Q β -pol-inh“ – VLP částice Q β s navázanými HPMA polymery s inhibitory, „Q β -inh“ – VLP částice Q β s navázanými inhibitory, „MP γ V-pol-inh“ – VLP částice myšího polyomaviru s navázanými HPMA polymery s inhibitory, „MP γ V-inh“ – VLP částice myšího polyomaviru s navázanými inhibitory. Měření provedeno HPLC metodou [40]. MEF („multivalent enhancement factor“) značí podíl K_i (základní inhibitor) / K_i (nanočástice).

nanočástice	typ inhibitoru	počet inhibitorů na částici	inhibice: $K_i \pm 1$ SD [pM]	MEF
ND-inh	4	250	3,7 \pm 0,67	3780
pol-inh	1	6	323 \pm 50	6,63
Q β -pol-inh	1	12	3,92 \pm 0,83	546
Q β -inh	5	180	30,3 \pm 4,5	373
MP γ V-pol-inh	1	180	2,87 \pm 0,6	746
MP γ V-inh	5	540	0,60 \pm 0,11	18800

inhibitor	inhibice: $K_i \pm 1$ SD [pM]
1	2140 \pm 290
4	14000 \pm 1700
5	11300 \pm 1200

Pro aktivitu na buněčných liniích mělo kromě klíčové interakce GCPII – inhibitor charakterizované inhibiční konstantou výrazný vliv i nano-bio rozhraní. U všech částic

s výjimkou nemodifikovaných VLP myšího polyomaviru bylo dosaženo rozdílu ve vazbě na GCPII exprimující a neexprimující buňky. Zatímco u naprosté většiny částic (polymery, nanodiamanty, VLP charakteru bakteriofágu Q β) byla interakce s buňkami neexprimujícími GCPII zanedbatelná, tak VLP částice nemodifikovaného nebo polymery modifikovaného myšího polyomaviru vykazovala stále schopnost vázat i buňky bez exprese GCPII. Předpokládáme, že tento jev může být vysvětlen tím, že základní vlastností VLP myšího polyomaviru, jako původních virových částic, je schopnost vázat se na savčí buňky. Toto chování souhlasí i s pozorováním jednotlivých buněk metodou konfokální mikroskopie, kde po inkubaci s nemodifikovanými VLP částicemi myšího polyomaviru dochází zejména k vazbě na buněčnou membránu, oproti cílené internalizaci u částic modifikovaných inhibitorem. Tato nespecifická interakce je odstranitelná modifikací nano-bio rozhraní částic pomocí PEG₁₃ karboxylové kyseliny, který je jako malá molekula schopen se navázat v daleko větší kvantitě než HPMA polymer, a tedy i lépe maskovat původní bio-nano rozhraní z myšího polyomaviru. Lze shrnout, že silná interakce GCPII-inhibitor umožňuje specifické cílení velmi různorodými typy nanočástic, přičemž pro další zvýšení specifity je kritické omezení nespecifických interakcí optimalizací bio-nano rozhraní vlastních částic.

Mým přínosem na této práci byla optimalizace modifikace bio-nano rozhraní VLP částic myšího polyomaviru k redukci nespecifické vazby a pomoc s přípravou nanočástic modifikovaných polymery. Dále jsem provedl charakterizaci částic stran fluorescenčních vlastností, měření inhibičních konstant částic a přípravu obrázku z konfokální mikroskopie. Podílel jsem se i na měření vstřebávání částic buňkami pomocí průtokové cytometrie a zobrazování navázaných nanočástic pomocí konfokální mikroskopie. Podílel jsem se na návrhu jednotlivých experimentů, analýze vzniklých experimentálních dat, jejich diskusi a konečně i na sepsání rukopisu.

5. Diskuze

V první části disertace jsem se zaměřil na zhodnocení dostupných možností a vývoj nových metod a bioanalytických nástrojů pro analýzu obsahu GCPII. Tyto metody umožňují měřit zastoupení a sledovat GCPII jak na úrovni organismu, tkání, buněk, tak i subcelulárně, a tím i pomáhají pochopit jeho biologickou funkci. Protilátky, obzvláště monoklonální, díky své specifické interakci s antigenem tvoří klíčový analytický nástroj [66] a vskutku právě protilátka 7E11-C5.3., vzniklá imunizací lyzátem prostatické buněčné linie LNCaP, vedla v minulosti k objevu PSMA (alias GCPII) [7]. Naším prvním krokem proto bylo důkladné zhodnocení

vlastností protilátek. Špatná charakterizace protilátek totiž může pro případné nespecifické interakce vést k zavádějícím výsledkům, obzvláště v případě komplexnějších biologických vzorků. Užití nevhodných protilátek současně může vést k rozdílným výsledkům různých autorů.

Protilátky pro studium GCPII byly užity v řadě metod jako imunohistochemie [11, 14, 17, 18, 67, 68], ELISA [69, 70] a imunoblot – „western blot“ [31, 71], přesto doposud nebylo v literatuře provedeno komparativní srovnání dostupných monoklonálních protilátek. Srovnání není dostupné i proto, že řada publikací neuvádí experimentální podmínky do dostatečných detailů. Naše výsledky, měření interakce jednotlivých protilátek s denaturovanou a nativní formou GCPII pomocí metody ELISA, umožnily určit kromě odhadované síly interakce i preferenční formu antigenu, kterou daná protilátka rozpoznává (nativní vs. denaturovaný). To nám umožnilo rozřadit protilátky do skupiny vhodné pro metody s denaturovaným antigenem (např. imunohistochemie na parafinových řezech, imunoblot – „western blot“) a pro metody spíše s antigenem nativním (průtoková cytometrie, ELISA, imunoprecipitace) a odhadnout dle síly interakce i nutnou koncentraci protilátky pro danou metodu. Oproti dostupné literatuře [7, 11, 67] jsme nebyli schopni úspěšně využít protilátku 7E11-C5.3 jak na imunohistochemii, tak ani na průtokové cytometrii, což může být způsobeno tím, že jako jediná dostupná protilátka interaguje s intracelulárním epitopem, který může vyžadovat odlišné metody provedení analýzy. Některé další protilátky (zejména např. protilátka J591), které interagují převážně s nativním antigenem, jsou překvapivě úspěšně využívány v literatuře [72] pro metody s denaturovaným antigenem jako je imunoblot – „western blot“. Možné vysvětlení může být např. nedostatečná denaturace antigenu vedoucí k přítomnosti nativního antigenu.

Protilátky kromě pozitivních vlastností mají i řadu nevýhod, jako např. často velmi zdlouhavou přípravu, omezenou stabilitu, v některých případech i obtížnou modifikovatelnost danou vlastní proteinovou strukturou. To nás vedlo, zejména v případě protilátek proti nativní GCPII, k tomu pokusit se najít jejich adekvátní náhradu. V literatuře byla popsána řada různých náhrad protilátek, založených na biopolymerech, jako např. protein, RNA, či syntetických polymerech nebo dokonce malých molekulách [73]. Co se týče proteinových náhrad, jedná se např. o „affibodies“ na základě modifikovaného bakteriálního receptoru [74], či o navrhované proteiny s opakujícími se ankyrinovými doménami [75]. U RNA se používají krátké, cca 100 párů basí dlouhé, sekvence zvané aptamery [76]. Zástupcem skupiny syntetických polymerů mohou být např. „molecular imprinted polymers“ získané polymerizací za přítomnosti antigenu, který je vzniklým polymerem obklopen [77, 78]. Využití HPMA polymeru jako nosiče pro diagnostiku a terapii bylo již ověřeno dříve [79, 80]. Naš inovativní přístup, kdy jsme na HPMA polymer

kovalentně navázali malou cílicí molekulu (inhibitor) - iBodies, se ukázal jako mimořádně univerzální. Podařilo se nám takto úspěšně nahradit protilátky v průtokové cytometrii, ve vizualizaci na buněčných liniích, v metodě ELISA i v afinitní purifikaci, přičemž v některých případech tato námi vytvořená náhrada vykazovala lepší vlastnosti než dostupné protilátky, mimo jiné např. ve stabilitě.

Po ověření vlastností analytických nástrojů jsme pro další studium fyziologických a patofyziologických efektů GCPII přistoupili k charakterizaci jednoho z nejdostupnějších biomodelů, tj. myši. Jedině *in vivo* studie totiž může poskytnout dostatečné množství relevantních informací na úrovni celého organismu. Výrazná podobnost užitého biomodelu s člověkem je podmínkou, aby vzniklé poznatky mohly být užitečné i pro humánní medicínu. Myš tvoří pro svoji dostupnost jeden ze základních biomodelů pro studium fyziologických a patofyziologických jevů. Co se týče GCPII však myší biomodel nebyl doposud plně charakterizován, přestože v literatuře je dostupná řada prací, která analyzuje efekt GCPII na myším modelu, zejména v oblasti nervového systému – např. [37, 42, 45]. Z toho důvodu jsme nejprve zevrubně prozkoumali enzymologické a biochemické vlastnosti myšího homologu GCPII. Až na mírně nižší aktivitu z důvodů vyššího K_M a striktnější substrátovou specifitu nevykazovala myší GCPII výraznější biochemické odchylky oproti lidské GCPII. Dále jsme provedli analýzu expresního profilu GCPII v myši, který oproti jiným biomodelům, jako jsou potkan, prase [31], nebyl dosud zevrubně studován, a byly dostupné pouze limitované informace týkající se vybraných tkání [32, 36, 38]. Obdobně jako v předchozích pracích [36, 38] jsme identifikovali výraznou expresi v mozku a ledvinách, zatímco expresi v prostatě jsme nepozorovali [32]. Mimo to jsme zachytili expresi ve slinných žlázách, zejména u žlázy podjazykové. Tento nález je v souladu i se známou expresí GCPII ve slinných žlázách člověka [9, 71, 81]. Přestože v myši i člověku je GCPII přítomna ve slinných žlázách, histologická lokalizace je odlišná, u člověka převažuje lokalizace v acinárních buňkách [81], zatímco v myši jsme pozorovali pozitivitu zejména v nesekrečních abluminálních buňkách. Obdobně jako u potkana [31] jsme u myši nepozorovali výraznou expresi GCPII v tenkém střevě. Expresní profil v orgánech urogenitálního traktu jsme dále upřesnili v další publikaci, kde jsme opět nebyli schopni nalézt expresi GCPII v žádné části myší prostaty. Nově jsme ale zachytili výraznou expresi v nadvarleti, a to jak u myši, tak u člověka.

Celkově lze shrnout, že myš pro biochemické podobnosti myšího homologu GCPII a podobný expresní profil tvoří adekvátního biomodel pro *in vivo* studie nervového systému a patrně i ledvin. Naproti tomu vzhledem k nepřítomnosti GCPII v myším tenkém střevě (ileum a jejunum) lze předpokládat, že GCPII není pro vstřebávání folátů u myši zásadní. Souviset to

může i s nižší aktivitou myšního homologu GCPII vůči pteroyl-di-glutamátu oproti lidskému homologu. Lze předpokládat, že u myši, stejně jako u potkana, je místo GCPII odštěpování γ -vázaných glutamátů z folylpolyglutamátů zprostředkováno γ -glutamyl hydrolázou [33]. Myš tak pro folátový metabolismus nejspíše není vhodným biomodelem. V urogenitálním traktu jsme souhrnně zachytili výraznější expresi GCPII pouze v nadvarleti, v prostatě oproti člověku v souladu s literaturou [32, 38] jsme přítomnost GCPII nepozorovali. Lze tedy předpokládat, že poznatky získané na myším modelu spojené s aktivitou GCPII v urogenitálním systému budou mít limitovanou přenositelnost do humánní medicíny. Vzhledem k tomu, že v myší prostatě nebyla GCPII detekována, můžeme uvažovat ve vztahu ke GCPII nad správností ortotopických myších modelů karcinogeneze prostaty. Ostatně i u myších transgenních modelů karcinomu prostaty nejsou data v plném souladu. Stručně, v „Hi-Myc“ modelu, kde exprese onkogenu Myc je řízená probasinovým promotorem specifickým pro prostatu, byla pozitivita popsána [82]. V TRAMP modelu, vytvořeném expresí SV40 T antigenu opět pod probasinovým promotorem, byla exprese GCPII v některých pracích nalezena [25, 83, 84], kdežto v jiných nikoli [82]. Na druhou stranu není zjištění absence GCPII v myší prostatě natolik překvapivé vzhledem k výrazným anatomickým a histologickým rozdílům mezi myší a lidskou prostatou [41].

Prokázaná podobnost mezi biochemickými vlastnostmi a expresními profily u člověka a myši, nám umožnila použít model myši deficientní v genu pro GCPII k dalšímu studiu fyziologické a patofyziologické funkce GCPII. Dosavadní výsledky fenotypů myši deficientních v GCPII byly ve značném rozporu. Zatímco někteří autoři pozorovali embryonální letalitu [34, 35], jiní nepozorovali žádný výrazně nepříznivý fenotyp [36, 37]. Všechny tyto kmeny myši deficientní v genu pro GCPII byly vytvořeny standardní technikou pomocí manipulace embryonálních kmenových buněk, jednotlivé cíle zásahu však byly odlišné. V jedné z prvních prací byl zásah v intron-exonovém rozhraní prvního a druhého exonů s vložením několika stop-kodonů [36]. Dalšími přístupy byla delece exonů 9 a 10 [35], exonů 3-5 [37], nebo prvního a druhého exonu [34]. Zda tyto vlastní konkrétní postupy přímo vedly k embryonální úmrtnosti není dosud zcela objasněno [85].

V naší práci jsme vytvořili nový myší model v genu pro GCPII odlišnou metodou – pomocí specifických TALEN (endonukleaz). Vzniklé myši deficientní v GCPII nevykazovaly žádný zjevný fenotyp kromě tendence k dřívější dilataci semenných váčků ve stáří. Jedná se tak o první nalezený fenotyp delece GCPII genu v urogenitální oblasti. Patofyziologický proces, který vedl k této dilataci, se nám zatím nepodařilo rozklíčovat. Mezi možné hypotézy může patřit např. defekt vnitřní signalizace mezi jednotlivými orgány urogenitálního systému při

chybějící fyziologické expresi GCPII v nadvarleti. Alternativně, absence GCPII v centrálním nervovém systému může ovlivnit míru fyzické aktivity, a tak druhotně ovlivnit velikost semenných váčků [86].

V rámci výzkumu fyziologické funkce GCPII jsme se zaměřili i na publikovanou velmi překvapivou schopnost štěpit amyloidogenní peptidy $A\beta_{1-40}$ a $A\beta_{1-42}$ [49, 87]. Tato aktivita by totiž měla dalekosáhlé důsledky v případném klinickém užití inhibitorů GCPII, neboť snížením degradace amyloidogenních peptidů inhibicí GCPII by mohlo dojít k zvýšení rizika tvorby amyloidogenních plaků, a tedy i ke zvýšení rizika vzniku Alzheimerovy choroby. Neobvyklost amyloidogenních peptidů jako substrátů GCPII vyplývá již ze základní katalytické a enzymové specifity GCPII, kde GCPII má primárně karboxypeptidasovou aktivitu pro C-terminální acidické aminokyseliny. Schopnost degradace amyloidogenních peptidů se nám stejně jako v práci [50] nepodařilo potvrdit.

GCPII alias PSMA, díky své expresi na nádorových buňkách se stává jednou z často užívaných cílových molekul pro směřování léčiv i pro diagnostiku. Řada publikací užila pro cílení různých přístupů, např. protilátek [53, 55, 88], aptamerů [56, 89], peptidů [90] či inhibitorů [52, 57-59, 91], přičemž vlastní částice byly tvořeny nanočásticemi s anorganickým jádrem [53, 55, 56], polymerními strukturami [52, 57, 59, 89], liposomy [88, 91] či exosomy [90].

Velmi slibné výsledky s HPMA polymery vázající GCPII nás vedly k hypotéze, zda interakce GCPII-inhibitor nemůže sloužit jako univerzální metoda pro směřování nanostuktur. Dalším vodítkem byla i hodnota inhibiční konstanty námi použitých inhibitorů, která se pohybovala v nanomolárním rozmezí, a tak se blížila k interakčním konstantám běžně užívaným k směřování léčiv – jako je interakce transferin-transferinový receptor [92] či interakce „RGD“ peptidů s $\alpha_v\beta_3$ integriny [93]. Modifikovali jsme částice jak rigidní (nanodiamanty), tak flexibilnější (polymerní nanočástice), tak i dva typy původně biologických částic – VLP částice bakteriofágu Q β a VLP částice myšího poliomyoviru. Kovalentní navázání proběhlo jak cestou konjugace s malou molekulou, tak i navázáním celého HPMA polymeru s již navázanými inhibitory. Všechny přístupy vedly k částicím, které jak *in vitro*, tak i na buněčných liniích byly schopny efektivně vázat GCPII, přičemž byl pozorován signifikantní aviditní efekt, vedoucí k výraznému poklesu inhibiční konstanty, daný tím, že na nanočástice bylo navázáno více molekul inhibitoru.

Klíčovým parametrem pro specifitu vazby nanočástic na buňky buněčných linií bylo vlastní bio-nano rozhraní nanočástic. Zatímco HPMA polymerní částice, HPMA pokryté nanodiamanty a částice bakteriofágu Q β vykazovaly samy o sobě nízkou interakci s testovanými buněčnými liniemi, tak VLP částice myšího polyomyoviru vykazovaly bez dalších

modifikací poměrně výraznou nespecifickou interakci. Tato nespecifická vazba je nejspíše způsobena faktem, že myší polyomavirus je schopen se díky VP1 kapsidovému proteinu vázat na gangliosidy na buňkách [94, 95]. Tato nespecifita je však odstranitelná modifikací přirozeného bio-nano rozhraní VLP částic navázáním velkého proteinu [96]. V našem případě byla velmi účinná modifikace pomocí PEG-karboxylové kyseliny, kdežto navázání HPMA polymerů bylo v našem případě výrazněji méně účinné, nejspíše vzhledem k relativně nízkému množství navázaných molekul polymeru a tím i chráněnou plochou nanočástice. Prokázali jsem tím značnou míru univerzálnosti cílicího systému GCPII inhibitor pro další potenciální biomedicínské použití.

6. Souhrn

Ve své disertační práci jsem se v první řadě zaměřil na analýzu vhodných analytických nástrojů pro studium GCPII. Zevrubně jsme charakterizovali komerčně dostupné používané monoklonální protilátky a současně jsme vyvinuli plně syntetickou náhradu protilátek založenou na HPMA polymeru s navázanými inhibitory GCPII, která v některých parametrech vykazovala, např. ve stabilitě, lepší vlastnosti. Pro *in vivo* studii fyziologické a patofyziologické role GCPII jsme zvolili myš jako experimentální biomodel, tento model jsem charakterizovali jak na biochemické, tak i expresní úrovni a porovnali s dostupnými poznatky u člověka. Naše výsledky prokázaly dobrou přenositelnost získaných poznatků v oblasti nervového systému. Data získaná v urogenitální oblasti a trávicím traktu budou vzhledem k rozdílnému expresnímu profilu aplikovatelná do humánní biomedicíny jen částečně. Jako vedlejší výsledek jsme nově pozorovali expresi v nadvarleti a slinných žlázách. Následně jsme vzhledem k dosavadním nesouladům v literatuře [34, 35, 37, 42] vytvořili ve spolupráci se skupinou funkční genomiky Dr. Sedláčka (BIOCEV) vlastní myší GCPII-deficientní model pomocí TALEN (endonukleáz). Tento model jsme charakterizovali, a kromě pozorování zvětšených semenných váčků u starších samců jsme nezaznamenali žádný další zjevný fenotyp. Zvětšení semenných váčků může souviset s chybějící expresí GCPII v nadvarleti, ale nelze ani vyloučit např. ovlivnění vzorců fyzické aktivity zpětně ovlivňující urogenitální systém [34, 86]. Pro důkladnější pochopení patofyziologie však bude jistě nutný další výzkum. Nepřítomnost žádného výrazného fenotypu, a v souladu s prací [50] vyvrácená schopnost štěpit amyloidní peptidy ($A\beta_{1-40}$ a $A\beta_{1-42}$) ukazuje, že chybějící aktivita GCPII v organismu nemá žádné evidentní negativní dopady. Toto pozorování je obzvláště důležité pro užití inhibice a cílení GCPII jako důležitého přístupu v terapii a diagnostice neurologických a onkologických onemocnění. Když

nepřítomnost enzymu nevyvolává žádné výrazné nežádoucí účinky, lze předpokládat, že ani farmakologická inhibice GCPII nebude vést k signifikantním nežádoucím účinkům. Závěrem jsme, díky výborné schopnosti našich polymerních HPMA částic vázat GCPII, provedli rozsáhlou analýzu, zda interakce GCPII-inhibitor může sloužit jako univerzální přístup k specifickému cílení léčiv do nádorových buněk. Vazba inhibitor-GCPII umožnila specifické směřování jak anorganických a rigidních (nanodiamanty), flexibilních (polymerní částice), tak i VLP částic, přičemž klíčová byla optimalizace bio-nano rozhraní k redukci nespecifické vazby. Nanočástice s navázaným GCPII inhibitorem tak mohou tvořit novu cestu, jak specificky dopravovat léčivo např. do nádorových buněk.

7. Seznam použité literatury

1. Robinson, M.B., et al., *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**(30): p. 14498-506.
2. Halsted, C.H., *Jejunal brush-border folate hydrolase. A novel enzyme.* West J Med, 1991. **155**(6): p. 605-9.
3. Mesters, J.R., et al., *Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer.* Embo j, 2006. **25**(6): p. 1375-84.
4. Rajasekaran, A.K., G. Anilkumar, and J.J. Christiansen, *Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2005. **288**(5): p. C975-C981.
5. Yao, V., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid.* Prostate, 2010. **70**(3): p. 305-16.
6. Rajasekaran, S.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen associates with anaphase-promoting complex and induces chromosomal instability.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 2142-51.
7. Horoszewicz, J.S., E. Kawinski, and G.P. Murphy, *Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients.* Anticancer Res, 1987. **7**(5b): p. 927-35.
8. Pangalos, M.N., et al., *Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity.* J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8470-83.
9. Israeli, R.S., et al., *Expression of the prostate-specific membrane antigen.* Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1807-11.
10. Lopes, A.D., et al., *Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5.* Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6423-9.
11. Kinoshita, Y., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues.* World J Surg, 2006. **30**(4): p. 628-36.
12. Gala, J.L., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in transitional cell carcinoma of the bladder: prognostic value?* Clin Cancer Res, 2000. **6**(10): p. 4049-54.
13. Dumas, F., et al., *Molecular expression of PSMA mRNA and protein in primary renal tumors.* International Journal of Cancer, 1999. **80**(6): p. 799-803.
14. Silver, D.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues.* Clin Cancer Res, 1997. **3**(1): p. 81-5.
15. Heitkötter, B., et al., *Neovascular PSMA expression is a common feature in malignant neoplasms of the thyroid.* Oncotarget, 2018. **9**(11): p. 9867-9874.
16. Kasoha, M., et al., *Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases.* Clin Exp Metastasis, 2017. **34**(8): p. 479-490.
17. Liu, H., et al., *Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium.* Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3629-34.

18. Baccala, A., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms*. *Urology*, 2007. **70**(2): p. 385-90.
19. Bychkov, A., et al., *PSMA expression by microvasculature of thyroid tumors - Potential implications for PSMA theranostics*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5202.
20. Bostwick, D.G., et al., *Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma*. *Cancer*, 1998. **82**(11): p. 2256-2261.
21. Perner, S., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(5): p. 696-701.
22. Minner, S., et al., *High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer*. *Prostate*, 2011. **71**(3): p. 281-8.
23. Nguyen, T., et al., *Uncovering the Role of N-Acetyl-Aspartyl-Glutamate as a Glutamate Reservoir in Cancer*. *Cell reports*, 2019. **27**(2): p. 491-501.e6.
24. Foss, C.A., et al., *GCPH imaging and cancer*. *Curr Med Chem*, 2012. **19**(9): p. 1346-59.
25. Caromile, L.A., et al., *PSMA redirects cell survival signaling from the MAPK to the PI3K-AKT pathways to promote the progression of prostate cancer*. *Sci Signal*, 2017. **10**(470).
26. Perico, M.E., et al., *Prostate-specific membrane antigen (PSMA) assembles a macromolecular complex regulating growth and survival of prostate cancer cells "in vitro" and correlating with progression "in vivo"*. *Oncotarget*, 2016. **7**(45): p. 74189-74202.
27. Colombatti, M., et al., *The prostate specific membrane antigen regulates the expression of IL-6 and CCL5 in prostate tumour cells by activating the MAPK pathways*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4608.
28. Conway, R.E., et al., *Prostate specific membrane antigen produces pro-angiogenic laminin peptides downstream of matrix metalloprotease-2*. *Angiogenesis*, 2013. **16**(4): p. 847-60.
29. Conway, R.E., et al., *Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-mediated laminin proteolysis generates a pro-angiogenic peptide*. *Angiogenesis*, 2016. **19**(4): p. 487-500.
30. Conway, R.E., et al., *Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(14): p. 5310-24.
31. Rovenská, M., et al., *Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs*. *Prostate*, 2008. **68**(2): p. 171-82.
32. Aggarwal, S., et al., *Comparative study of PSMA expression in the prostate of mouse, dog, monkey, and human*. *Prostate*, 2006. **66**(9): p. 903-10.
33. Shafizadeh, T.B. and C.H. Halsted, *gamma-Glutamyl hydrolase, not glutamate carboxypeptidase II, hydrolyzes dietary folate in rat small intestine*. *J Nutr*, 2007. **137**(5): p. 1149-53.
34. Han, L., et al., *Phenotypic characterization of mice heterozygous for a null mutation of glutamate carboxypeptidase II*. *Synapse*, 2009. **63**(8): p. 625-35.
35. Tsai, G., et al., *Early embryonic death of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) homozygous mutants*. *Synapse*, 2003. **50**(4): p. 285-92.
36. Bacich, D.J., et al., *Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate*. *J Neurochem*, 2002. **83**(1): p. 20-9.
37. Gao, Y., et al., *Mice lacking glutamate carboxypeptidase II develop normally, but are less susceptible to traumatic brain injury*. *J Neurochem*, 2015. **134**(2): p. 340-53.
38. Bacich, D.J., et al., *Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase*. *Mamm Genome*, 2001. **12**(2): p. 117-23.
39. Tykvart, J., et al., *Efficient and versatile one-step affinity purification of in vivo biotinylated proteins: expression, characterization and structure analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II*. *Protein Expr Purif*, 2012. **82**(1): p. 106-15.
40. Navrátil, M., et al., *Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-γ-l-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II*. *The FEBS Journal*, 2014. **281**(14): p. 3228-3242.
41. Oliveira, D.S.M., et al., *The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline*. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 2016. **16**(1): p. 8-13.
42. Bacich, D.J., et al., *Mice lacking glutamate carboxypeptidase II are protected from peripheral neuropathy and ischemic brain injury*. *J Neurochem*, 2005. **95**(2): p. 314-23.
43. Finch, C.E. and F.G. Girgis, *Enlarged seminal vesicles of senescent C57BL-6J mice*. *J Gerontol*, 1974. **29**(2): p. 134-8.
44. Lu, X.M., et al., *N-acetylaspartylglutamate protects against transient focal cerebral ischemia in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2000. **408**(3): p. 233-9.
45. Vornov, J.J., et al., *Blockade of NAALADase: a novel neuroprotective strategy based on limiting glutamate and elevating NAAG*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **890**: p. 400-5.

46. Williams, A.J., et al., *Electroencephalogram analysis and neuroprotective profile of the N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase inhibitor, GPI5232, in normal and brain-injured rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(1): p. 48-57.
47. Cai, Z., S. Lin, and P.G. Rhodes, *Neuroprotective effects of N-acetylaspartylglutamate in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia*. Eur J Pharmacol, 2002. **437**(3): p. 139-45.
48. Zhong, C., et al., *NAAG peptidase inhibitor increases dialysate NAAG and reduces glutamate, aspartate and GABA levels in the dorsal hippocampus following fluid percussion injury in the rat*. Journal of Neurochemistry, 2006. **97**(4): p. 1015-1025.
49. Kim, M.J., et al., *Glutamate carboxypeptidase II: an amyloid peptide-degrading enzyme with physiological function in the brain*. Faseb j, 2010. **24**(11): p. 4491-502.
50. Alt, J., et al., *Glutamate carboxypeptidase II is not an amyloid peptide-degrading enzyme*. Faseb j, 2013. **27**(7): p. 2620-5.
51. Kasten, B.B., et al., *Targeting prostate cancer cells with PSMA inhibitor-guided gold nanoparticles*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(2): p. 565-8.
52. Sanna, V., et al., *Targeted nanoparticles encapsulating (-)-epigallocatechin-3-gallate for prostate cancer prevention and therapy*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41573.
53. Nagesh, P.K.B., et al., *PSMA targeted docetaxel-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for prostate cancer*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **144**: p. 8-20.
54. Hrkach, J., et al., *Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile*. Sci Transl Med, 2012. **4**(128): p. 128ra39.
55. Mukherjee, A., et al., *Development and screening of a series of antibody-conjugated and silica-coated iron oxide nanoparticles for targeting the prostate-specific membrane antigen*. ChemMedChem, 2014. **9**(7): p. 1356-60.
56. Kim, D., Y.Y. Jeong, and S. Jon, *A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer*. ACS Nano, 2010. **4**(7): p. 3689-96.
57. Xu, X., et al., *Multifunctional Envelope-Type siRNA Delivery Nanoparticle Platform for Prostate Cancer Therapy*. ACS Nano, 2017. **11**(3): p. 2618-2627.
58. Chen, Z., et al., *PSMA-specific theranostic nanoplex for combination of TRAIL gene and 5-FC prodrug therapy of prostate cancer*. Biomaterials, 2016. **80**: p. 57-67.
59. Banerjee, S.R., et al., *(111)In- and IRDye800CW-Labeled PLA-PEG Nanoparticle for Imaging Prostate-Specific Membrane Antigen-Expressing Tissues*. Biomacromolecules, 2017. **18**(1): p. 201-209.
60. Behnam Azad, B., et al., *Evaluation of a PSMA-targeted BNF nanoparticle construct*. Nanoscale, 2015. **7**(10): p. 4432-42.
61. Chandran, S.S., et al., *Characterization of a targeted nanoparticle functionalized with a urea-based inhibitor of prostate-specific membrane antigen (PSMA)*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(6): p. 974-82.
62. Von Hoff, D.D., et al., *Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(13): p. 3157-63.
63. Huang, B., et al., *PSMA-targeted stably linked "dendrimer-glutamate urea-methotrexate" as a prostate cancer therapeutic*. Biomacromolecules, 2014. **15**(3): p. 915-23.
64. Fan, X., et al., *Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10-3.2-oriented lipid nanobubbles*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 3939-50.
65. Zhu, C., et al., *Nanoconjugation of PSMA-Targeting Ligands Enhances Perinuclear Localization and Improves Efficacy of Delivered Alpha-Particle Emitters against Tumor Endothelial Analogues*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(1): p. 106-113.
66. Packer, D., *The history of the antibody as a tool*. Acta Histochemica, 2021. **123**(4): p. 151710.
67. Chang, S.S., et al., *Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3192-8.
68. Haffner, M.C., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers*. Hum Pathol, 2009. **40**(12): p. 1754-61.
69. Sokoloff, R.L., et al., *A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine*. Prostate, 2000. **43**(2): p. 150-7.
70. Navrátil, V., et al., *DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening*. Nucleic acids research, 2017. **45**(2): p. e10-e10.
71. Troyer, J.K., M.L. Beckett, and G.L. Wright, Jr., *Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) in tissue extracts and body fluids*. Int J Cancer, 1995. **62**(5): p. 552-8.
72. Wang, X., et al., *In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(9): p. 1728-39.
73. McEnaney, P.J., et al., *Chemically synthesized molecules with the targeting and effector functions of antibodies*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(52): p. 18034-43.

74. Nord, K., et al., *Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(8): p. 772-7.
75. Binz, H.K., et al., *Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins*. J Mol Biol, 2003. **332**(2): p. 489-503.
76. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-822.
77. Haupt, K. and K. Mosbach, *Plastic antibodies: developments and applications*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(11): p. 468-75.
78. Wulff, G., *Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1995. **34**(17): p. 1812-1832.
79. Kopecek, J. and P. Kopecková, *HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 122-49.
80. Lu, Z.R., *Molecular imaging of HPMA copolymers: visualizing drug delivery in cell, mouse and man*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 246-57.
81. Wolf, P., et al., *Three conformational antibodies specific for different PSMA epitopes are promising diagnostic and therapeutic tools for prostate cancer*. Prostate, 2010. **70**(5): p. 562-9.
82. Simons, B.W., et al., *PSMA expression in the Hi-Myc model; extended utility of a representative model of prostate adenocarcinoma for biological insight and as a drug discovery tool*. The Prostate, 2019. **79**(6): p. 678-685.
83. Schmittgen, T.D., et al., *Expression pattern of mouse homolog of prostate-specific membrane antigen (FOLH1) in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model*. Prostate, 2003. **55**(4): p. 308-16.
84. Yang, D., et al., *Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice*. Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5857-60.
85. Vorlova, B., et al., *GCP II and its close homolog GCP III: from a neuropeptidase to a cancer marker and beyond*. Front Biosci (Landmark Ed), 2019. **24**: p. 648-687.
86. Chigurupati, S., et al., *Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice*. The Journal of endocrinology, 2008. **199**(2): p. 333-341.
87. Lee, S.K., et al., *S1 pocket of glutamate carboxypeptidase II: a new binding site for amyloid- β degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(4): p. 765-71.
88. Tian, J.-y., et al., *PSMA conjugated combinatorial liposomal formulation encapsulating genistein and plumbagin to induce apoptosis in prostate cancer cells*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021. **203**: p. 111723.
89. Kolishetti, N., et al., *Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(42): p. 17939.
90. Severic, M., et al., *Genetically-engineered anti-PSMA exosome mimetics targeting advanced prostate cancer in vitro and in vivo*. Journal of Controlled Release, 2021. **330**: p. 101-110.
91. Yari, H., G. Nkepan, and V. Awasthi, *Surface Modification of Liposomes by a Lipopolymer Targeting Prostate Specific Membrane Antigen for Theranostic Delivery in Prostate Cancer*. Materials (Basel, Switzerland), 2019. **12**(5): p. 756.
92. Ward, J.H., J.P. Kushner, and J. Kaplan, *Transferrin receptors of human fibroblasts. Analysis of receptor properties and regulation*. Biochemical Journal, 1982. **208**(1): p. 19-26.
93. Sancey, L., et al., *Clustering and internalization of integrin α v β 3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide*. Mol Ther, 2009. **17**(5): p. 837-43.
94. Tsai, B., et al., *Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40*. Embo j, 2003. **22**(17): p. 4346-55.
95. You, J., et al., *Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): p. e1005175.
96. Zackova Suchanova, J., et al., *Retargeting Polyomavirus-Like Particles to Cancer Cells by Chemical Modification of Capsid Surface*. Bioconjugate Chemistry, 2017. **28**(2): p. 307-313.

8. Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

1. Tykvart J, Navrátil V, **Sedlák F**, Corey E, Colombatti M, Fracasso G, Koukolík F, Bařinka C, Šácha P, Konvalinka J. **Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA).** *Prostate.* 2014 Dec;74(16):1674-90. **IF (2014) = 4,051**
2. Šácha P, Knedlík T, Schimer J, Tykvart J, Parolek J, Navrátil V, Dvořáková P, **Sedlák F**, Ulbrich K, Strohalm J, Majer P, Šubr V, Konvalinka J. **iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 Feb 12;55(7):2356-60. **IF (2016) = 11,994**
3. Knedlík T, Vorlová B, Navrátil V, Tykvart J, **Sedlák F**, Vaculín Š, Franěk M, Šácha P, Konvalinka J.: **Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has a similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII.** *FEBS Open Bio.* 2017 Aug 29;7(9):1362-1378. **IF (2017) = 1,81**
4. Vorlová B, **Sedlák F**, Kašpárek P, Šrámková K, Malý M, Zámečník J, Šácha P, Konvalinka J.: **A novel PSMA/GCPII-deficient mouse model shows enlarged seminal vesicles upon aging.** *Prostate.* 2019 Feb;79(2):126-139. **IF (2013) = 3,279**
5. **Sedlák F**, Šácha P, Blechová M, Březinová A, Šafařík M, Šebestík J, Konvalinka J.: **Glutamate carboxypeptidase II does not process amyloid- β peptide.** *FASEB J.* 2013 Jul;27(7):2626-32. **IF (2013) = 3,188**
6. Neburková J, **Sedlák F**, Žáčková Suchanová J, Kostka L, Šácha P, Šubr V, Etrych T, Šimon P, Bařinková J, Kryštufek R, Španielová H, Forstová J, Konvalinka J, Cígler P: **Inhibitor-GCPII Interaction: Selective and Robust System for Targeting Cancer Cells with Structurally Diverse Nanoparticles.** *Mol Pharm.* 2018 Aug 6;15(8):2932-2945. **IF (2013) = 4,65**
7. ÚOHC B AV ČR, ÚMCH AV ČR, PřF UK. **Macromolecular conjugates for visualization and separation of proteins and cells,** Původci: Šácha P, Konvalinka J, Schimer J, Knedlík T, Navrátil V, Tykvart J, **Sedlák F**, Majer P, Cígler P, Šubr V, Ulbrich K, Strohalm J. Evropský patent EP3245514B1. Publikováno 10.července 2019, přihlášeno 14.1.2015. – **Bez IF.**

Ostatní publikace

1. Šlegerová J, Hájek M, Řehoř I, **Sedlák F**, Stursa J, Hrubý M, Cígler P.: **Designing the nanobiointerface of fluorescent nanodiamonds: highly selective targeting of glioma cancer cells.** *Nanoscale*. 2015 Jan 14;7(2):415-20 **IF (2015) = 7,76**
2. Sivá M, Svoboda M, Veverka V, Trempe JF, Hofmann K, Kožíšek M, Hexnerová R, **Sedlák F**, Belza J, Brynda J, Šácha P, Hubálek M, Starková J, Flaisigová I, Konvalinka J, Šašková KG: **Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog.** *Sci Rep*. 2016 Jul 27;6:30443. **IF (2016) = 4,59**
3. Fassmannová D, **Sedlák F**, Sedláček J, Špička I, Grantz Šašková K: **Nelfinavir Inhibits the TCF11/Nrf1-Mediated Proteasome Recovery Pathway in Multiple Myeloma.** *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 25;12(5):1065. **IF (2020) = 6,639**
4. Radocha J, Jelinek T, Pour L, Spicka I, Minarik J, Popkova T, Jungova A, Pavlicek P, Brozova L, Stork M, **Sedlák F**, Krhovska P, Maisnar V, Heindorfer A, Sykora M, Wrobel M, Mikula P, Kessler P, Ullrychova J, Hajek R: **Urine immunofixation negativity is not necessary for complete response in intact immunoglobulin multiple myeloma: Retrospective real-world confirmation.** *Int J Lab Hematol*. 2021 Oct;43(5):e244-e247. **IF (2021) = 2,877**
5. Hejdanková Z, Vaněk V, **Sedlák F**, Procházka J, Diederichs A, Kereiche S, Novotná B, Budešínsky M, Birkuš G, Šašková KG, Cígler P: **Lipid Nanoparticles for Broad-Spectrum Nucleic Acid Delivery.** *Adv. Funct. Mater*. 2021, 31, 2101391. **IF (2020/2021) = 18,808**
6. **Sedlák F**: **Léčba epizody bolesti u pacienta s pokročilým B-buněčným lymfomem.** *Acta Medicinæ*, 2016, vol. 5, s. 34-35. **Bez IF.**
7. Špička I, **Sedlák F**: **Mnohočetný myelom - jsme schopni pacienta v roce 2020 vyléčit?.** *Postgraduální medicína*, 2020, vol. 22, s. 53-58. **Bez IF.**
8. ÚOCHB AV ČR. **Odběrová sada k nasálnímu steru s integrovaným imunochromatografickým testem.** Původci: Pokorný V, Šácha P, Kryštůfek R, **Sedlák F**, Bakeš R. Užité vzor. CZ35263U1, přihlášeno 10.3.2021. **Bez IF.**
9. **Sedlák, F.**, **Jednoduché měření geomagnetického pole,** *Jemná mechanika a optika*, 2005, 50 (5), 155-156. **Bez IF.**