Charles University in Prague, Faculty of Natural Sciences
Department of Biochemistry

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis

Human glutamate carboxypeptidases II and III

Michal Navrátil, MSc

Supervisor: Associate professor Jan Konvalinka, PhD

Prague, 2016

CONTENTS

ABSTRACT 3
1. INTRODUCTION 5
1.1. Glutamate Carboxypeptidase II (GCPII) 5
1.2. Glutamate Carboxypeptidase III (GCPIII) 6
2. AIMS OF THE STUDY 6
3. MATERIALS AND METHODS 7
3.1. DNA Manipulation 7
3.2. Protein Purification 7
3.3. Analytical Techniques for Non-radioactively Assaying Activities of GCPII and GCPIII 7
3.4. X-ray Crystallography and Structure Refinement 8
4. RESULTS 8
4.1. Biochemical Characterization of GCPII and GCPIII 8
4.2. Structural Characterization of GCPII and GCPIII 10
4.3. Novel Lipophilic Inhibitors of GCPII 12
4.4. Tissue Distribution of GCPIII 12
5. DISCUSSION 14
6. CONCLUSIONS 15
7. REFERENCES 16
CURRICULUM VITAE 19
LIST OF PUBLICATIONS 20

ABSTRACT

The herein presented Ph.D. dissertation describes kinetic and structural characterization of human glutamate carboxypeptidases II and III (GCPII and GCPIII) using a complete panel of their natural substrates. These enzymes hydrolyze C-terminal glutamate from their substrates. They share 67 % sequence identity and also similar enzymatic activities.

This thesis quantitatively compares human GCPII and GCPIII in terms of their ability to hydrolyze the substrates N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG), folyl-poly-γ-L-glutamic acids ($FolGlu_n$) and β-citryl-L-glutamate (BCG). We demonstrated that GCPIII hydrolyzes its substrates in a metal-dependent manner, that BCG is a specific substrate of GCPIII, and that NAAG and $FolGlu_n$ are specific substrates of GCPII. We also provide indirect biochemical evidence that GCPIII might feature a heterometallic active-site cluster. Additionally, we characterized the relevance of a surface exosite of GCPII, the arene-binding site (ABS), for the hydrolysis of $FolGlu_n$ substrates using mutagenesis and enzyme kinetics and showed that polymorphic His475Tyr variant of GCPII hydrolyzes $FolGlu_n$ substrates with the same kinetic parameters as the wild-type enzyme.

Furthermore, this thesis focuses on structural aspects of the substrate specificities of GCPII and GCPIII: we present the X-ray structures of inactive mutant of GCPII, Glu424Ala, in complex with its substrates $FolGlu_{1\text{-}3}$ and BCG. The $FolGlu_{1\text{-}3}$ complexes show how ABS residues of GCPII - Arg463, Arg511 and Trp 541 - participate in binding the aromatic pteridine ring of these substrates. These findings are

complemented by high-level quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations which reveal how BCG probably binds to the active site of GCPIII and how a calcium-zinc heterometallic active-site cluster of GCPIII might look like.

Finally, we also quantified the kinetics of the N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamate (NAAG2)-hydrolyzing activity of GCPII and GCPIII. Further, we quantified the tissue distribution of GCPII and GCPIII (in human tissues) both at the mRNA and the protein level, showing highest expression of GCPIII in testes and discussing its possible role as an iron chelator. The thesis is rounded off with structural characterizatin of lipophilic inhibitors of GCPII and the discovery of a moderately specific inhibitor of GCPIII.

1. INTRODUCTION

Human glutamate carboxypeptidases II and III (GCPII and GCPIII) share 67 % sequence identity and they also hydrolyze similar substrates.

1.1. Glutamate Carboxypeptidase II (GCPII)

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) hydrolyzes N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG)[1], folyl-poly-γ-L-glutamic acids ($FolGlu_n$)[2], and N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamate (NAAG2)[3].

It is expressed mainly in prostate, but also in liver, kidney and brain[4]. Its function is to hydrolyze NAAG in brain and $FolGlu_n$ in jejunum (to liberate free folic acid, vitamin B_9), which means that its function in other tissues remains to be elucidated. Interestingly, GCPII is also expressed in tumor neovasculature.

NAAG is a weak agonist of metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3)[5] (and may be also for mGluR2) and it exerts a neuroprotective effect via this receptor, because mGluR3/2 serve to presynaptically inhibit the release of glutamate, the major excitatory neurotransmitter. In agreement with this function, inhibition of GCPII holds promise for treating traumatic brain injury[6] and various neurological conditions, e.g. pain, schizophrenia, anxiety, epilepsy, drug addiction and peripheral neuropathy.

1.2. Glutamate Carboxypeptidase III (GCPIII)

Glutamate carboxypeptidase III (GCPIII) hydrolyzes N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG)[7] and β-citryl-L-glutamate (BCG)[8] in a metal-dependent manner. BCG has been shown to be a specific substrate of mouse GCPIII[8].

Since there is no specific antibody against this enzyme, its expression has been explored only in mouse at the mRNA and protein level. Its expression is the highest in adult testes[9,10] and developing brains[10,11].

The function of BCG, and thus that of GCPIII, is not known. It is only speculated that BCG likely functions as an iron chelator[12].

2. AIMS OF THE STUDY

- Design and analyse novel inhibitors of GCPII potentially crossing blood-brain barrier.
- Structurally and biochemically characterize the folyl-poly-γ-L-glutamate carboxypeptidase activity of GCPII.
- Compare folyl-poly-γ-L-glutamate carboxypeptidase activity of GCPII and GCPIII.
- Find and characterize a specific substrate of GCPIII and analyze its distribution in human tissues.
- Find structural explanation for the distinct specificites of GCPII and GCPIII and for the metal-dependent hydrolytic activity of GCPIII (but not GCPII).

3. MATERIALS AND METHODS

If possible, chemicals of highest available purity were used. For buffers for enzymatic reactions, only ultrapure water was used.

3.1. DNA Manipulation

For the purposes of this study, standard cloning techniques were used.

3.2. Protein Purification

Proteins being the subject of this study were expressed using the commercial AviTag affinity tag, which enabled us to purify human GCPII and GCPIII in just two steps - affinity purification using the Streptavidin Mutein Matrix and gel permeation chromatography.

3.3. Analytical Techniques for Non-radioactively Assaying Activities of GCPII and GCPIII

The hydrolysis products of non-radioactive NAAG, NAAG2, BCG and $FolGlu_n$ substrates were quantified using an ultra performance liquid chromatography method employing a cutting-edge water-stable C18 column with 1.8 μm particles.

3.4. X-ray Crystallography and Structure Refinement

For structural studies on GCPII, we used high-resolution crystallization condition co-developed in our laboratory[13]. Phase problem was solved by molecular replacement method and the models were refined manually using programs Phenix[14] or Refmac[15,16] and Coot[17].

4. RESULTS

4.1. Biochemical Characterization of GCPII and GCPIII

Using our novel chromatographic methods for quantifiying glutamate and $FolGlu_n$, we were able to quantify the NAAG-, NAAG2-, $FolGlu_{1-6}$- and BCG-hydrolyzing activities of GCPII and GCPIII. Additionally, we characterized the metal-dependent activity of GCPIII using BCG, NAAG and $FolGlu_1$, and compared it to GCPII[18] We found that BCG is a specific substrate for GCPIII and its cleavage rate is significantly increased by the presence of Ca^{2+} and Mn^{2+} ions . On the other hand, NAAG and $FolGlu_1$ are specific substrates for GCPII and their hydrolysis is by GCPIII is modulated by Mn^{2+} and Zn^{2+} ions (Figure 1).

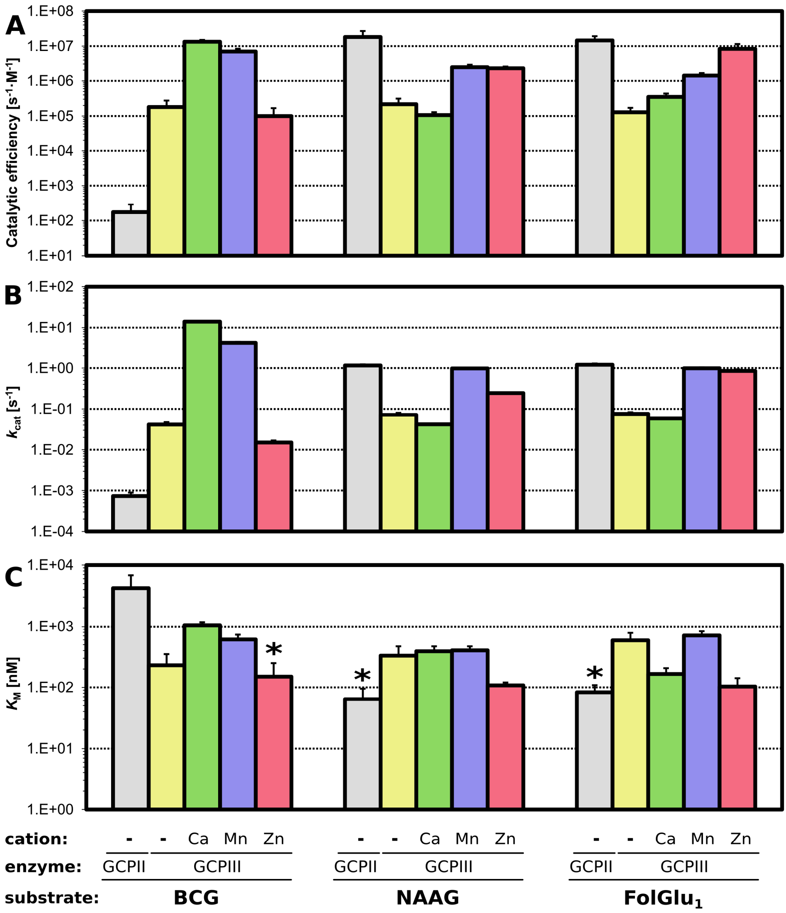


Figure 1: BCG is a highly specific substrate of GCPIII. This comparison highlights the ability of GCPIII to hydrolyze BCG in a Ca^{2+} and Mn^{2+} dependent manner and NAAG and $FolGlu_1$ in a Mn^{2+} and Zn^{2+} dependent manner. Error bars stand for the standard deviation. * indicates, that the K_M values were lower than the lowest substrate concentrations. (A) Catalytic efficiencies. (B) K_M values. (C) k_{cat} values.

Additionally, we performed site-directed mutagenesis experiments to analyze the recently described surface exosite of GCPII, the arene-binding site (ABS). As a result, we confirmed one of its three amino acids (Trp541) to be responsible for its preference for aromatic moieties.
Finally, we provide indirect evidence, that the lower-occupancy zinc atom (Zn2) of GCPIII might be replaced by cations like Ca^{2+} or Mn^{2+}, providing thus a speculative model how these metals could function as co-factors.

4.2. Structural Characterization of GCPII and GCPIII

We successfully obtained X-ray structures of GCPII in complex with $FolGlu_{1/2/3}$[19] (1.65/2.00/1.65 Å resolution) and also BCG[18] (1.85 Å resolution, Figure 2A). This brought insights about how exactly these substrates are bound by GCPII and revealed how the ABS participates in binding aromatic moieties of $FolGlu_{1-3}$ substrates.

Using homology modeling and QM/MM calculations, we also described the most probable binding mode of BCG to GCPIII and a plausible model of GCPIII featuring a homometallic zinc-zinc (Figure 2B) or a heterometallic zinc-calcium active-site cluster.

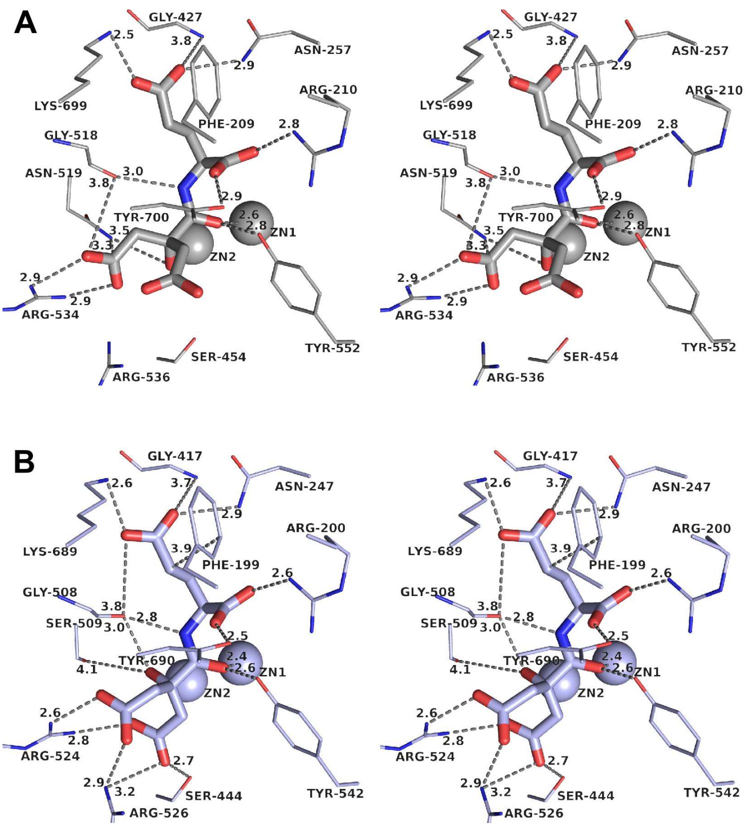


Figure 2: Comparison of the interactome of BCG with active-site residues of GCPII and GCPIII, demonstrated in cross-eye stereo representation. Zinc atoms are shown as spheres. BCG is depicted in stick representation and colored the same as the protein (see below). Binding interactions are represented by gray dashed lines and a number in Å. (A) The GCPII-Glu424Ala-BCG X-ray structure (PDB entry 5F09, manuscript in submission), colored light gray. The citrate moiety interacts only with Arg534 and Asn519. (B) QM/MM model of the GCPIII BCG complex, colored light blue. The citrate moiety interacts with Arg524, Arg526, Ser444 and Ser509 (which substitutes Asn519 of GCPII).

4.3. Novel Lipophilic Inhibitors of GCPII

Based on the results with lipophilic analogues of NAAG like N-acetyl-L-aspartyl-L-methionine, we designed a series of lipophilic GCPII inhibitors and characterized them by X-ray crystallography[20].

We found out that the S1' site binding the glutamate moiety can accomodate diverse lipophilic functionalities like methionine and aminooctanoic or aminononanoic acid. In our X-ray structures, these moieties spatially overlap with glutamate moiety of the GCPII NAAG complex. These results are relevant for further design of inhibitors capable to cross the blood-brain barrier and thus function in the central nervous system.

4.4. Tissue Distribution of GCPIII

Using quantitative real-time polymerase chain reaction, we were able to assess the expression of human GCPIII at the mRNA level (Figure 3A). To obtain similar information at the protein level (Figure 3B), we complemented these results also with quantifying the BCG-hydrolyzing activity in selected human tissues. As a result, we discovered that human GCPIII is most abundant in testes. Other tissues with high expression of GCPIII are ovary and placenta. On the other hand, GCPII is most abundant in prostate, kidney and brain on both mRNA and protein level.

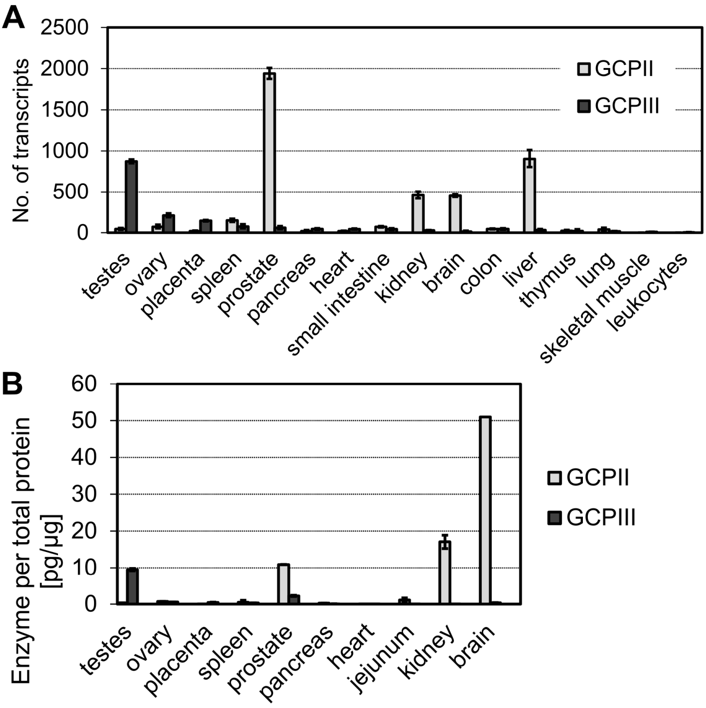


Figure 3: mRNA/protein levels of GCPII and GCPIII in human Clontech tissue cDNA libraries and tissue lysates. Tissues in (A) and (B) are juxtaposed. (A) mRNA. Tissues are ordered from higher to lower content of GCPIII mRNA, whereby the tissues, for which we do not have enzymatic data, are tethered at the end (colon to leukocytes). Error bars represent standard deviation from experiments carried out in triplicate. (B) GCPII and GCPIII at the protein level. Error bars represent standard deviation.

5. DISCUSSION

Our results laid foundations for elucidation of the physiological function of GCPII and GCPIII by providing thorough kinetic and structural data. One of the future questions will be finding out whether BCG really serves as an iron chelator and what would be the exact role of GCPIII in such a function.

Using site-directed mutagenesis approach, we characterized the contribution of the surface exosite of GCPII, the arene-binding site (ABS), for the hydrolysis and binding of $FolGlu_n$ substrates and although its contribution is rather marginal, it can still be exploited for increasing the GCPII to GCPIII selectivity ratio of inhibitors, as shown by a recent work by *Tykvart and Schimer et al.*[21]

Because we were unable to obtain high-resolution data for the GCPIII BCG complex, we tried to do so (successfully) in the case of the GCPII BCG complex. Together with our QM/MM models of GCPIII BCG complexes and biochemical data from thermal shift assays and inhibition studies, we accumulated a solid body of evidence which enables us to conclude that the wobble active-site Zn2 atom may likely be replaced by divalent cations and that at least BCG probably participates in co-chelating this metal in the position of Zn2.

The current level of knowledge indicates that the physiological function of GCPIII may indeed be linked to the hydrolysis of its cognate substrate, BCG, in testes, and that GCPIII might modulate iron metabolism in this tissue. This hypothesis is further supported by the co-localization of the highest expression of GCPIII with the highest abundance of BCG in testes.

6. CONCLUSIONS

- GCPIII hydrolyzes BCG, NAAG and $FolGlu_1$ in a metal-dependent manner.
- BCG is a specific substrate of GCPIII, while NAAG and $FolGlu_1$ are specific for GCPII.
- A surface exosite of GCPII, the arene-bindig site (ABS), is a structural feature most probably responsible for the differences in the hydrolysis of $FolGlu_{1\text{-}6}$ by GCPII and GCPIII.
- The mode of binding of $FolGlu_n$ substrates and β-citryl-L-glutamate to GCPII is similar to that described for the GCPII-NAAG complex. Moreover, folic acid moiety engages the ABS.
- GCPIII cleaves $FolGlu_n$ substrates with similar kinetic parameters as GCPII does.
- Homology modelling and QM/MM calculations demonstrate that BCG binds to GCPIII probably in a very similar manner as it does in the case of GCPII, but its binding is favoured by more interactions with the protein.

7. REFERENCES

1. 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* **262,** 14498–506 (1987).
2. Pinto, J. T., Suffoletto, B. P., Berzin, T. M., Qiao, C. H., Lin, S., Tong, W. P., May, F., Mukherjee, B. & Heston, W. D. Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2,** 1445–51 (1996).
3. Lodder-Gadaczek, J., Becker, I., Gieselmann, V., Wang-Eckhardt, L. & Eckhardt, M. N-Acetylaspartylglutamate Synthetase II Synthesizes N-Acetylaspartylglutamylglutamate. *J Biol Chem* **286,** 16693–16706 (2011).
4. Cunha, A. C., Weigle, B., Kiessling, A., Bachmann, M. & Rieber, E. P. Tissue-specificity of prostate specific antigens: Comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett.* **236,** 229–238 (2006).
5. Nicoletti, E., Bockaert, J., Collingridge, G. L., Conn, P. J., Ferraguti, F., Schoepp, D. D., Wroblewski, J. T. & Pin, J. P. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* **60,** 1017–1041 (2011).
6. Slusher, B. S., Vornov, J. J., Thomas, A. G., Hurn, P. D., Harukuni, I., Bhardwaj, A., Traystman, R. J., Robinson, M. B., Britton, P., Lu, X. C. M., Tortella, F. C., Wozniak, K. M., Yudkoff, M., Potter, B. M. & Jackson, P. F. Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nat. Med.* **5,** 1396–1402 (1999).
7. Hlouchova, K., Barinka, C., Klusak, V., Sacha, P., Mlcochova, P., Majer, P., Rulisek, L. & Konvalinka, J. Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III. *J. Neurochem.* **101,** 682–696 (2007).
8. Collard, F., Vertommen, D., Constantinescu, S., Buts, L. & Van Schaftingen, E. Molecular Identification of beta-Citrylglutamate

Hydrolase as Glutamate Carboxypeptidase 3. *J Biol Chem* **286,** 38220–38230 (2011).
9. Miyake, M., Innami, T. & Kakimoto, Y. A beta-citryl-L-glutamate-hydrolysing enzyme in rat testes. *Biochim Biophys Acta* **760,** 206–14 (1983).
10. Miyake, M., Kume, S. & Kakimoto, Y. Correlation of the level of beta-citryl-L-glutamic acid with spermatogenesis in rat testes. *Biochim Biophys Acta* **719,** 495–500 (1982).
11. Miyake, M. & Kakimoto, Y. Developmental-Changes of N-Acetyl-L-Aspartic Acid, N-Acetyl-Alpha-Aspartylglutamic Acid and Beta-Citryl-L-Glutamic Acid in Different Brain-Regions and Spinal Cords of Rat and Guinea Pig. *J. Neurochem.* **37,** 1064–1067 (1981).
12. Hamada-Kanazawa, M., Kouda, M., Odani, A., Matsuyama, K., Kanazawa, K., Hasegawa, T., Narahara, M. & Miyake, M. beta-Citryl-L-glutamate Is an Endogenous Iron Chelator That Occurs Naturally in the Developing Brain. *Biol. Pharm. Bull.* **33,** 729–737 (2010).
13. Barinka, C., Starkova, J., Konvalinka, J. & Lubkowski, J. A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II. *Acta Crystallogr. Sect. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63,** 150–153 (2007).
14. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **66,** 213–21 (2010).
15. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **53,** 240–55 (1997).
16. Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **67,** 355–67 (2011).

17. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 486–501 (2010).
18. M. Navrátil, Tykvart, J., Schimer, J., Pachl, P., Navrátil, V., Rokob, T. A., Hlouchová, K., Rulíšek, L. & Konvalinka, J. Comparison of the substrate specificity of human glutamate carboxypeptidases II and III: A kinetic, X-ray and QM/MM study. *FEBS J, under revision* (2016).
19. Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C. & Konvalinka, J. Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-L-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *Febs J* **281,** 3228–3242 (2014).
20. Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., Navratil, M., Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L. & Barinka, C. Novel Substrate-Based Inhibitors of Human Glutamate Carboxypeptidase II with Enhanced Lipophilicity. *J. Med. Chem.* **54,** 7535–7546 (2011).
21. Tykvart, J., Schimer, J., Jančařík, A., Bařinková, J., Navrátil, V., Starková, J., Šrámková, K., Konvalinka, J., Majer, P. & Šácha, P. Design of Highly Potent Urea-Based, Exosite-Binding Inhibitors Selective for Glutamate Carboxypeptidase II. *J. Med. Chem.* **58,** 4357–4363 (2015).

CURRICULUM VITAE

Born: Bratislava, Czechoslovakia, November, 10th , 1982.

Employment History:

2007 - present: Research assistant at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic. Topic of the Ph.D. dissertation: Human Glutamate Carboxypeptidases II and III.

Education:

2007 - present: Ph.D. studies (biochemistry), Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague.

2002 - 2007: Master studies (biochemistry), Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic. Thesis: High-affinity Saccharide Ligands for Leukocyte Lectin Receptor CD69. Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague.

1995 - 2002: Billingual Czech German secondary school in Liberec (František Xaver Šalda Gymnasium). School-leaving examination: Mathematics, Physics, Czech and German (examination languages both German and Czech).

Language skills:

Czech (native), German, English

LIST OF PUBLICATIONS

Publications in Peer-reviewed International Journals:

Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., **Navratil, M.**, Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L. & Barinka, C. Novel Substrate-Based Inhibitors of Human Glutamate Carboxypeptidase II with Enhanced Lipophilicity. *J. Med. Chem.* 54, 7535–7546 (2011).

Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C. & Konvalinka, J. Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-L-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *Febs J* 281, 3228–3242 (2014).

Manuscript under Revision:

Navrátil, M., Tykvart, J., Schimer, J., Pachl, P., Navrátil, V., Rokob, T. A., Hlouchová, K., Rulíšek, L., Konvalinka, J. Comparison of the substrate specificity of human glutamate carboxypeptidases II and III: A kinetic, X-ray and QM/MM study. *FEBS J*

Karlova universita v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce

Lidské glutamátkarboxypeptidasy II a III

Mgr. Michal Navrátil

Školitel: Doc. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2016

OBSAH

ABSTRAKT 23
1. ÚVOD 25
1.1. Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII) 25
1.2. Glutamátkarboxypeptidasa III (GCPIII) 26
2. CÍLE PRÁCE 26
3. MATERIÁL A METODIKA 27
3.1. Techniky manipulace DNA 27
3.2. Purifikace proteinů 27
3.3. Analytické techniky pro stanovení aktivity GCPII a GCPIII pomocí neradioaktivních substrátů 27
3.4. Rentgenstrukturní analysa a vytváření modelů 28
4. VÝSLEDKY 28
4.1. Biochemická charakterisace GCPII a GCPIII 28
4.2. Strukturní charakterisace GCPII and GCPIII 30
4.3. Nové lipofilní inhibitory GCPII 32
4.4. Tkáňové rozdělení GCPIII 32
5. DISKUSE 34
6. ZÁVĚRY 35
7. POUŽITÁ LITERATURA 36
CURRICULUM VITAE 39
SEZNAM PUBLIKACÍ 40

ABSTRAKT

Zde presentovaná doktorská disertační práce popisuje kinetickou a strukturní characterisaci lidských glutamátkarboxypeptidas II a III (GCPII a GCPIII) za použití jejich přirozených substrátů. Tyto enzymy odštěpují C-koncový glutamát z jejich substrátů. Proteiny sdílejí 67 % sekvenční identitu a také podobné enzymové aktivity.

Tato disertační práce kvantitativně porovnává lidskou GCPII a GCPIII co se týče jejich schopnosti hydrolysovat endogenní substráty *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG), folyl-poly-γ-L-glutamové kyseliny ($FolGlu_n$) a β-citryl-L-glutamát (BCG). Prokázali jsme, že hydrolysa těchto substrátů pomocí GCPIII je závislá na přítomnosti kationtů kovů, že BCG je specifický substrát GCPIII, a že NAAG a $FolGlu_n$ jsou specifické substráty GCPII. Rovněž přinášíme nepřímé biochemické důkazy o tom, že GCPIII by mohla mít v aktivním místě heterometalický klastr. Také jsme charakterisovali relevanci povrchového vazebného místa v GCPII, takzvaného aromatické skupiny vázajícího místa (ASVM), pro hydrolysu $FolGlu_n$ substrátů za použití metody cílené mutagenese basí DNA a enzymové kinetiky a ukázali jsme, že polymorfní varianta GCPII His475Tyr hydrolysuje substráty $FolGlu_n$ se stejnými kinetickými parametry jako divoký typ.

Dále se tato disertační práce se zaměřuje na strukturní aspekty substrátových specifit GCPII a GCPIII: předkládáme zde krystalové struktury neaktivního mutantu GCPII, Glu424Ala, v komplexu se svými substráty $FolGlu_{1\text{-}3}$ a BCG. $FolGlu_{1\text{-}3}$ komplexy ukazují jak se ASVM zbytky v GCPII - Arg463, Arg511 a Trp 541 - účastní vazby aromatického pteridinového

kruhu těchto substrátů. Tyto nálezy jsou doplněny vyspělými kvantově mechanickými a molekulově mechanickými (QM/MM) výpočty, které ukazují, jak se BCG pravděpodobně váže do aktivního místa GCPIII a jak by Ca-Zn heterometalický klastr v aktivním místě GCPIII mohl vypadat.

Nakonec jsme změřili kinetiku hydrolysy *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamátu (NAAG2) enzymy GCPII a GCPIII. Dále jsme kvantifikovali tkáňové zastoupení GCPII a GCPIII v lidských tkáních, a to jak na úrovni mRNA, tak proteinu, čímž jsme ukázali nejvyšší expresi GCPIII ve varlatech. Spolu s tím je diskutována možná úloha BCG jako chelátoru železa. Tato disertační práce je rovněž doplněna strukturní charakterisací lipofilních inhibitorů GCPII a objevem mírně specifického inhibitoru GCPIII.

1. ÚVOD

Lidská glutamát karboxypeptidasa II a III (GCPII a GCPIII) sdílí 67 % sekvenční identitu a hydrolysují podobné substráty.

1.1. Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII)

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII) hydrolysuje *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG)[1], folyl-poly-γ-L-glutamové kyseliny ($FolGlu_n$)[2] a *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamát (NAAG2)[3].

Je exprimována hlavně v prostatě, ale také v játrech, ledvinách a mozku[4]. Její funkcí je hydrolysovat neurotransmiter NAAG v mozku a $FolGlu_n$ v lačníku (aby uvolnila volnou kyselinu listovou, vitamin B_9), což znamená, že její funkce v ostatních tkáních zůstává neznámá. GCPII je rovněž exprimována v nádorové neovaskulatuře.

NAAG je slabý agonista metabotropních glutamátových receptorů 3 (mGluR3)[5] (a možná také mGluR2) a vykonává neuroprotektivní účinek skrze tento receptor tím, že mGluR3/2 presynapticky inhibují uvolňování glutamátu, hlavního excitačního neurotransmiteru. V souladu s touto funkcí vypadá inhibice GCPII jako slibný kandidát pro léčbu traumatického poranění mozku[6] a různých neurologických obtíží jako například bolest, schizofrenie, úzkostlivost, epilepsie, závislost na drogách a periferní neuropatie.

1.2. Glutamátkarboxypeptidasa III (GCPIII)

Glutamátkarboxypeptidasa III (GCPIII) hydrolysuje *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG)[7] a β-citryl-L-glutamát (BCG)[8] a tato aktivita je závislá na dvojmocných kationtech kovů. U BCG je prokázáno, že je specifickým substrátem myší GCPIII[8].

Protože neexistuje specifická protilátka proti tomuto enzymu, jeho exprese byla zkoumána jen u myší na úrovni mRNA a proteinu. Jeho exprese je nejvyšší v dospělých varlatech[9,10] a vyvíjejícím se mozku[10,11].

Funkce BCG, a tedy i GCPIII, není známa. Spekuluje se, že BCG pravděpodobně funguje jako chelátor železa[12].

2. CÍLE PRÁCE

- Navrhnout a zanalysovat nové inhibitory GCPII, které by mohly procházet hematoencefalickou bariérou.
- Strukturně a biochemicky charakterisovat folyl-poly-γ-L-glutamátkarboxypeptidasovou aktivitu GCPII.
- Porovnat folyl-poly-γ-L-glutamátkarboxypeptidasovou aktivitu GCPII a GCPIII.
- Nalézt a charakterisovat specifický substrát GCPIII a zjistit zastoupení tohoto enzymu v lidských tkáních.
- Nalézt strukturní vysvětlení pro odlišné specifity GCPII a GCPIII a pro závislost hydrolytické aktivity GCPIII na dvojmocných kationtech kovů (v případě GCPII naopak pro její nezávislost).

3. MATERIÁL A METODIKA

Pokud to bylo možné, byly použity chemikálie nejvyšší dostupné čistoty. Pro pufry pro enzymové reakce byla používána pouze ultračistá voda.

3.1. Techniky manipulace DNA

Pro účely této studie byly použity standardní klonovací techniky.

3.2. Purifikace proteinů

Proteiny zkoumané v této studii byly produkovány za použití komerční afinitní kotvy AviTag, což nám umožnilo purifikovat lidskou GCPII a GCPIII v pouhých dvou krocích - afinitní purifikaci za použití nosiče Streptavidin Mutein Matrix a gelové permeační chromatografie.

3.3. Analytické techniky pro stanovení aktivity GCPII a GCPIII pomocí neradioaktivních substrátů

Produkty hydrolysy neradioaktivních substrátů NAAG, NAAG2, BCG a $FolGlu_n$ byly kvantifikovány za použití metody ultra výkonné kapalinové chromatografie využívající pokročilou C18 kolonu o velikosti částic 1.8 μm, které jsou stabilní i ve vodě.

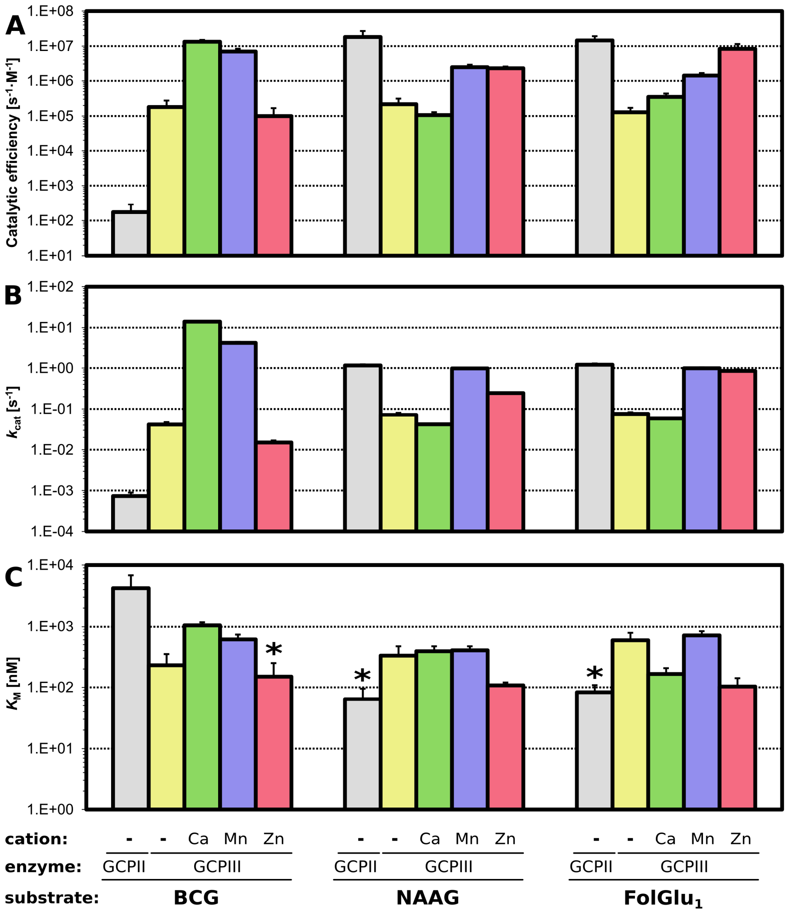
3.4. Rentgenstrukturní analysa a vytváření modelů

Pro strukturní studie GCPII jsme použili naši krystalizační podmínku produkující krystaly difraktující do vysokého rozlišení, spoluvyvinutou v naší laboratoři[13]. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulového nahrazení a konečné modely byly manuálně vytvářeny pomocí programů Phenix[14] nebo Refmac[15,16] a Coot[17].

4. VÝSLEDKY

4.1. Biochemická charakterisace GCPII a GCPIII

Díky nové chromatorafické metodě pro stanovení glutamátu a $FolGlu_n$ jsme byli schopni kvantifikovat NAAG-, NAAG2-, $FolGlu_{1\text{-}6}$- a BCG-hydrolysující aktivitu GCPII a GCPIII. Navíc jsme charakterisovali BCG-, NAAG- a $FolGlu_1$-hydrolysující aktivitu GCPIII závislou na dvojmocných kationtech kovů a porovnali ji s GCPII[18]. Tím jsme ukázali, že BCG je specifický substrát pro GCPIII a že jeho hydrolysa je výrazně urychlena přítomností Ca^{2+} a Mn^{2+} kationtů. Naproti tomu NAAG a $FolGlu_1$ jsou specifické substráty pro GCPII a jejich hydrolysa enzymem GCPIII je modulována přítomností Mn^{2+} a Zn^{2+} kationtů (Obrázek 4Figure 1).



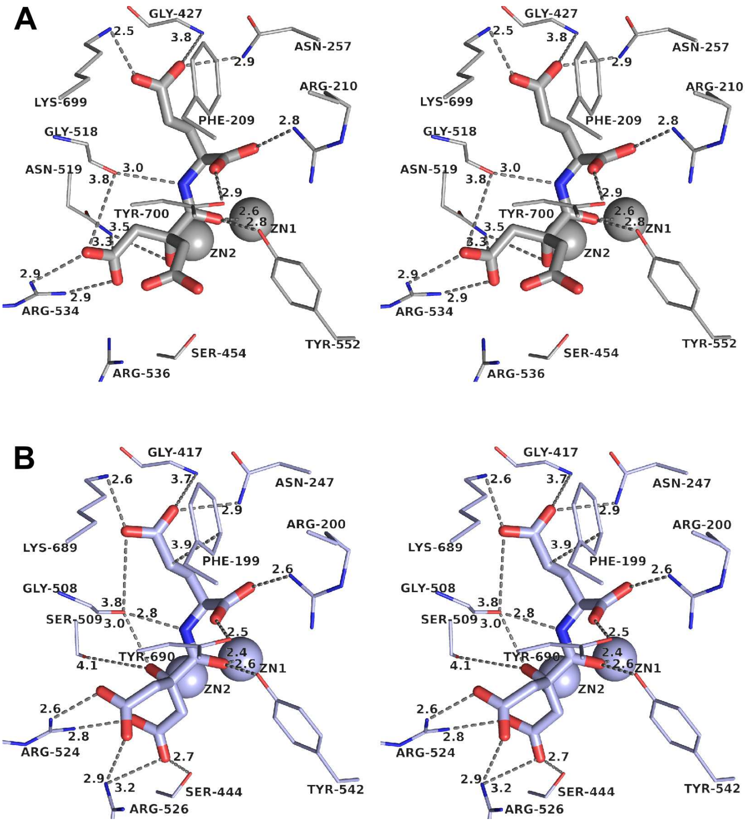
Obrázek 4: BCG je vysoce specifický substrát GCPIII. Toto srovnání ukazuje schopnost GCPIII hydrolysovat BCG v závislosti na Ca^{2+} a Mn^{2+} kationtech a NAAG a $FolGlu_1$ v závislosti na Mn^{2+} a Zn^{2+} kationtech. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. * vyznačuje, že K_M hodnoty byly nižší než nejnižší použitá koncentrace substrátu. (A) Katalytické účinnosti. (B) K_M hodnoty. (C) k_{cat} hodnoty.

Také jsme provedli pomocí cílené mutagenese studii nedávno popsaného povrchového místa GCPII, tzv. aromatické skupiny vázajícího místa (ASVM). Výsledkem bylo potvrzení, že jedna ze tří aminokyselin ASVM (Trp541) je zodpovědná za preferenci ASVM pro aromatické skupiny.
Nakonec přinášime nepřímé důkazy o tom, že zinkový atom s nižší obsazeností u GCPIII (Zn2) by mohl být nahrazen kationty jako např. Ca^{2+} nebo Mn^{2+}, a přinášíme tak model, jak by tyto kovy mohly fungovat jako kofaktory.

4.2. Strukturní charakterisace GCPII and GCPIII

Podařilo se nám získat krystalové struktury GCPII v komplexu s $FolGlu_{1/2/3}$[19] (rozlišení 1.65/2.00/1.65 Å) a také BCG[18] (rozlišení 1.85 Å, Figure 2A), což objasnilo, jak přesně se tyto substráty váží do aktivního místa GCPII a odhalilo jak se ASVM účastní vazby aromatických částí $FolGlu_{1\text{-}3}$ substrátů.

S použitím homologního modelování a technik QM/MM se nám podařilo popsat také nejpravděpodobnější způsob vazby BCG do GCPIII a pravděpodobný model enzymu GCPIII s homometalickým klastrem zinek-zinek (Figure 2B) nebo s heterometalickým klastrem zinek-vápník v aktivním místě.



Obrázek 5: Porovnání interakcí BCG saminokyselinovými zbytky aktivního místa GCPII a GCPIII, ukázané ve stereo pohledu. Atomy zinku jsou zobrazeny jako sféry. BCG je ukázán v tyčinkovém zobrazení a má stejnou barvu jako protein (viz. níže). Vazebné interakce jsou naznačeny šedými čáčkovanými úsečkami a délkou v Å. (A) Rentgenová struktura GCPII Glu424Ala BCG komplexu (PDB položka 5F09, manuskript v revizi), zobrazena v šedé barvě. Citrátová část interaguje pouze s Arg534 a Asn519. (B) QM/MM model GCPIII BCG komplexu ve světle modré barvě. Citrátová část interaguje s Arg524, Arg526, Ser444 a Ser509 (Ser509 nahrazuje Asn519 v GCPII).

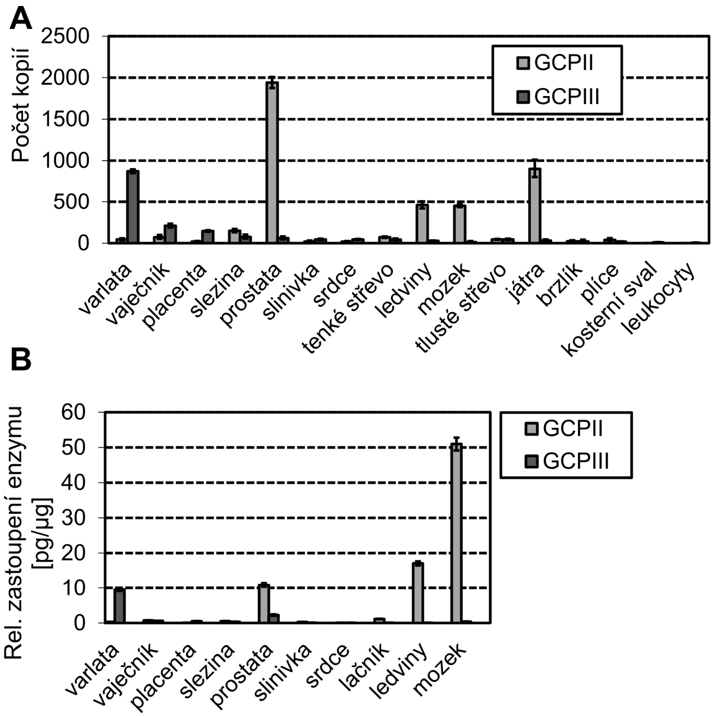
4.3. Nové lipofilní inhibitory GCPII

Na základě výsledku s lipofilními analogy substrátu NAAG jako *N*-acetyl-L-aspartyl-L-methionin jsme navrhli celou řadu lipofilních inhibitorů GCPII a charakterisovali je rentgenstrukturní analysou[20].

Tímto jsme zjistili, že S1' místo určené pro glutamát může vázat různé lipofilní aminokyseliny jako methionin a aminooktanovou nebo aminononaovou kyselinu. Tyto jednotky zaujímají v našich strukturách prakticky stejný prostor jako glutamátová část ve struktuře komplexu GCPII se substrátem NAAG. Tyto výsledky jsou důležité pro další vývoj inhibitorů schopných procházet hematoencefalickou bariérou a fungovat tak v centrálním nervovém systému.

4.4. Tkáňové rozdělení GCPIII

Použitím kvantitativní polymerasové řetězové reakce jsme byli schopni stanovit expresi lidské GCPIII na úrovní mRNA (Figure 3A). Abychom obdrželi podobnou informaci i na úrovni proteinu, doplnili jsme tyto výsledky rovněž stanovením BCG-hydrolysující aktivity ve vybraných lidských tkáních (Figure 3B). Výsledkem bylo zjištění, že také lidská GCPIII je v nejvyšší míře zastoupena ve varlatech. Dalšími tkáněmi s vysokou expresí GCPIII jsou vaječník a placenta. Naproti tomu GCPII je nejvíce zastoupena v prostatě, ledvinách a mozku, a to jak na úrovni mRNA, tak proteinu.



Obrázek 6: mRNA/protein enzymů GCPII a GCPIII v lidských Clontech tkáňových cDNA knihovnách a tkáňových lysátech. Tkáně v (A) a (B) jsou zobrazeny proti sobě. (A) mRNA. Tkáně jsou seřazeny od vyššího k nižšímu obsahu mRNA enzymu GCPIII, přičemž tkáně, pro které nemáme enzymová data, jsou připojena na konci (střevo až leukocyty). Chybové úsečky representují směrodatnou odchylku experimentů provedených v triplikátech. (B) GCPII and GCPIII na úrovní proteinu. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

5. DISKUSE

Naše výsledky položily základ pro objasnění fysiologické funkce GCPII a GCPIII tím, že jsme přinesli důkladná kinetická a strukturní data. Jedna z budoucích otázek bude zjištění jestli BCG opravdu slouží jako chelátor železa a jaká by mohla být přesná role GCPIII v takové funkci.

Naší mutagenační studií jsme charakterisovali příspěvek povrchového místa GCPII, tzv. aromatické skupiny vázajícího místa (ASVM), pro hydrolysu a vazbu $FolGlu_n$ substrátů, a přestože jeho příspěvek je spíše okrajový, stále může být využito pro zvýšení selektivity inhibitorů vůči GCPII oproti GCPIII. To nedávno prokázali *Tykvart a Schimer et al.*[21]

Protože se nám nepodařilo získat strukturu komplexu GCPIII s BCG ve vysokém rozlišení, pokusili jsme se tak učinit (úspěšně) v případě komplexu GCPII s BCG. S pomocí našich QM/MM modelů komplexů GCPIII s BCG a biochemických dat z diferenční skenovací fluorimetrie a inhibičních studií jsme shromáždili poměrně solidní důkazy, na základě kterých se můžeme domnívat, že atom zinku s menší obsazeností v GCPIII (Zn2) pravděpodobně může být nahrazen dvojmocnými kationty, a že přinejmenším BCG se zřejmě podílí na vazbě tohoto kovu v místě původního Zn2 atomu.

Současná úroveň znalostí naznačuje, že fysiologická úloha GCPIII by vskutku mohla souviset s hydrolysou BCG ve varlatech, a že GCPIII by mohla modulovat metabolismus železa v této tkáni. Tato domněnka je dále podporována kolokalisací nejvyšší exprese GCPIII a nejhojnějšího výskytu BCG ve varlatech.

6. ZÁVĚRY

- GCPIII hydrolysuje BCG, NAAG and $FolGlu_1$ způsobem závislým na kationtech kovů.
- BCG je specifický substrát GCPIII, zatímco NAAG a $FolGlu_1$ jsou specifické pro GCPII.
- Povrchové vazebné místo GCPII, aromatické skupiny vázající místo (ASVM), je nejpravděpodobnějším důvodem, proč se liší hydrolysa $FolGlu_{1-6}$ substrátů mezi enzymy GCPII and GCPIII.
- Způsob vazby $FolGlu_n$ substrátů a β-citryl-L-glutamátu do aktivního místa GCPII je podobný tomu, co bylo popsáno pro GCPII-NAAG komplex. Navíc, kyselina listová $FolGlu_n$ substrátů se váže do ASVM.
- GCPIII štěpí $FolGlu_n$ substráty s podobnými kinetickými parametry jako GCPII.
- Homologní modelování a QM/MM výpočty prokazují, že BCG se váže do aktivního místa GCPIII pravděpodobně velmi obdobným způsobem jako v případě GCPII, jen jeho vazba je zlepšena větším počtem interakcí s proteinem.

7. Použitá literatura

1. 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* **262,** 14498–506 (1987).
2. Pinto, J. T., Suffoletto, B. P., Berzin, T. M., Qiao, C. H., Lin, S., Tong, W. P., May, F., Mukherjee, B. & Heston, W. D. Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2,** 1445–51 (1996).
3. Lodder-Gadaczek, J., Becker, I., Gieselmann, V., Wang-Eckhardt, L. & Eckhardt, M. N-Acetylaspartylglutamate Synthetase II Synthesizes N-Acetylaspartylglutamylglutamate. *J Biol Chem* **286,** 16693–16706 (2011).
4. Cunha, A. C., Weigle, B., Kiessling, A., Bachmann, M. & Rieber, E. P. Tissue-specificity of prostate specific antigens: Comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett.* **236,** 229–238 (2006).
5. Nicoletti, E., Bockaert, J., Collingridge, G. L., Conn, P. J., Ferraguti, F., Schoepp, D. D., Wroblewski, J. T. & Pin, J. P. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* **60,** 1017–1041 (2011).
6. Slusher, B. S., Vornov, J. J., Thomas, A. G., Hurn, P. D., Harukuni, I., Bhardwaj, A., Traystman, R. J., Robinson, M. B., Britton, P., Lu, X. C. M., Tortella, F. C., Wozniak, K. M., Yudkoff, M., Potter, B. M. & Jackson, P. F. Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nat. Med.* **5,** 1396–1402 (1999).
7. Hlouchova, K., Barinka, C., Klusak, V., Sacha, P., Mlcochova, P., Majer, P., Rulisek, L. & Konvalinka, J. Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III. *J. Neurochem.* **101,** 682–696 (2007).
8. Collard, F., Vertommen, D., Constantinescu, S., Buts, L. & Van Schaftingen, E. Molecular Identification of beta-Citrylglutamate

Hydrolase as Glutamate Carboxypeptidase 3. *J Biol Chem* **286,** 38220–38230 (2011).
9. Miyake, M., Innami, T. & Kakimoto, Y. A beta-citryl-L-glutamate-hydrolysing enzyme in rat testes. *Biochim Biophys Acta* **760,** 206–14 (1983).
10. Miyake, M., Kume, S. & Kakimoto, Y. Correlation of the level of beta-citryl-L-glutamic acid with spermatogenesis in rat testes. *Biochim Biophys Acta* **719,** 495–500 (1982).
11. Miyake, M. & Kakimoto, Y. Developmental-Changes of N-Acetyl-L-Aspartic Acid, N-Acetyl-Alpha-Aspartylglutamic Acid and Beta-Citryl-L-Glutamic Acid in Different Brain-Regions and Spinal Cords of Rat and Guinea Pig. *J. Neurochem.* **37,** 1064–1067 (1981).
12. Hamada-Kanazawa, M., Kouda, M., Odani, A., Matsuyama, K., Kanazawa, K., Hasegawa, T., Narahara, M. & Miyake, M. beta-Citryl-L-glutamate Is an Endogenous Iron Chelator That Occurs Naturally in the Developing Brain. *Biol. Pharm. Bull.* **33,** 729–737 (2010).
13. Barinka, C., Starkova, J., Konvalinka, J. & Lubkowski, J. A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II. *Acta Crystallogr. Sect. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63,** 150–153 (2007).
14. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **66,** 213–21 (2010).
15. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **53,** 240–55 (1997).
16. Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **67,** 355–67 (2011).

17. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 486–501 (2010).
18. M. Navrátil, Tykvart, J., Schimer, J., Pachl, P., Navrátil, V., Rokob, T. A., Hlouchová, K., Rulíšek, L. & Konvalinka, J. Comparison of the substrate specificity of human glutamate carboxypeptidases II and III: A kinetic, X-ray and QM/MM study. *FEBS J, under revision* (2016).
19. Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C. & Konvalinka, J. Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-L-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *Febs J* **281,** 3228–3242 (2014).
20. Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., Navratil, M., Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L. & Barinka, C. Novel Substrate-Based Inhibitors of Human Glutamate Carboxypeptidase II with Enhanced Lipophilicity. *J. Med. Chem.* **54,** 7535–7546 (2011).
21. Tykvart, J., Schimer, J., Jančařík, A., Bařinková, J., Navrátil, V., Starková, J., Šrámková, K., Konvalinka, J., Majer, P. & Šácha, P. Design of Highly Potent Urea-Based, Exosite-Binding Inhibitors Selective for Glutamate Carboxypeptidase II. *J. Med. Chem.* **58,** 4357–4363 (2015).

CURRICULUM VITAE

Narozen: Bratislava, Československo, 10. listopadu 1982.

Historie zaměstnání:
2007 - současnost: Doktorand na Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, v.v.i. Téma disertační práce: Lidské glutamátkarboxypeptidasy II a III.

Vzdělání:

2007 - současnost: Doktorské studium (biochemie), Katedra Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova universita v Praze.

2002 - 2007: Magisterské studium (biochemie). Diplomová práce: Vysokoafinitní sacharidové ligandy leukocytárního lektinového receptoru CD69. Katedra Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova universita v Praze.

1995 - 2002: Dvojjazyčná česko-německá střední škola v liberci (Gymnázium Františka Xavera Šaldy). Maturitní zkouška: Matematika, Fyzika, Čeština a Němčina (zkoušky v německém i českém jazyce).

Jazykové vzdělání:
Čeština (mateřský jazyk), němčina, angličtina.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace v mezinárodních časopisech:

Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., **Navratil, M.**, Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L. & Barinka, C. Novel Substrate-Based Inhibitors of Human Glutamate Carboxypeptidase II with Enhanced Lipophilicity. *J. Med. Chem.* 54, 7535–7546 (2011).

Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C. & Konvalinka, J. Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-L-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *Febs J* 281, 3228–3242 (2014).

Manuskript v revizi:

Navrátil, M., Tykvart, J., Schimer, J., Pachl, P., Navrátil, V., Rokob, T. A., Hlouchová, K., Rulíšek, L., Konvalinka, J. Comparison of the substrate specificity of human glutamate carboxypeptidases II and III: A kinetic, X-ray and QM/MM study. *FEBS J*