

## ABSTRAKT

Zde presentovaná doktorská disertační práce popisuje kinetickou a strukturní charakterisaci lidských glutamátcarboxypeptidas 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 hydrolyzovat endogenní substráty *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG), folyl-poly- $\gamma$ -L-glutamové kyseliny (FolGlu<sub>n</sub>) a  $\beta$ -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<sub>n</sub> 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<sub>n</sub> substrátů za použití metody cílené mutagenese basí DNA a enzymové kinetiky a ukázali jsme, že polymorfní varianta GCPII His475Tyr hydrolysuje substráty FolGlu<sub>n</sub> 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<sub>1-3</sub> a BCG. FolGlu<sub>1-3</sub> 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.