

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the dissertation thesis



Glutamátcarboxypeptidasa II jako cíl farmaceutického zásahu a
molekulární adresa pro léčbu nádorových onemocnění

Glutamate Carboxypeptidase II as a Drug Target and a
Molecular Address for Cancer Treatment

Tomáš Knedlík

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2017

Abstrakt

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII), známá také jako membránový antigen specifický pro prostatu (PSMA) je membránová metalopeptidasa, jež je hojně exprimovaná na buňkách karcinomu prostaty. GCPII si dále získala pozornost vědců svou aktivitou v mozku, kde štěpí neurotransmitter *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG). Touto aktivitou se GCPII může podílet na řadě mozkových poruch, neboť NAAG vykazuje neuroprotektivní účinky. Díky tomu se GCPII stala prostředkem pro zobrazování a potenciální cílenou léčbu nádorů prostaty stejně jako pro léčbu mozkových poruch.

Nádory prostaty celosvětově představují druhé nejčastější mužské nádorové onemocnění. Nádory prostaty jsou ovšem život ohrožující pouze při opuštění samotné prostaty a rozšíření do jiných tkání. Z tohoto důvodu bylo enormní úsilí vloženo do detekce nádorů v lépe léčitelných stupních a léčby agresivních metastatických nádorů resistantních na standardní léčbu. Pacienti procházející konvenční terapií trpí poměrně závažnými vedlejšími účinky, a proto jsou hledány účinnější způsoby léčby. Tyto nové postupy zahrnují selektivní směřování na nádorové antigeny, jež jsou mnohonásobně více produkovány nádorovými buňkami. GCPII představuje tento cíl, jenž by mohl být použit pro detekci pokročilých stupňů malignity nádoru či jako molekulární adresa pro cílené doručování léčiv přímo do nádorové tkáně.

Studie uvedené v této práci se zaměřují na GCPII jako potenciální diagnostický a terapeutický cíl a dále na vývoj nových molekulárních nástrojů pro studium role GCPII. Z těchto důvodů jsme zhodnotili potenciál GCPII stát se sérovým markerem nádorů prostaty a určili její koncentraci v krvi zdravé populace. Vzhledem k tomu, že vývoj nových terapeutik vyžaduje modelové organismy, důkladně jsme charakterizovali myši GCPII. Nakonec jsme vyvinuli polymerní konjugáty dekorované inhibitory GCPII, které by se mohly stát nástroji pro transport léčiv do buněk exprimujících GCPII. Tyto konjugáty mohou ovšem sloužit i jako mimetika protilátek, umožňující selektivní cílení zvolených proteinů, jejich izolaci a vizualizaci *in vitro* a *in vivo*. Tento nový chemicko-biologický nástroj, nazvaný iBodies, má tak uplatnění i mimo oblast nádorového antigenu GCPII.

Cíle práce

- Vyvinout metodu pro detekci a kvantifikaci GCPII v lidské krvi. Ověřit, zdali jiné enzymy přispívají ke specifické aktivitě GCPII. Dále analyzovat původ a možnou funkci GCPII v krvi a určit, zdali množství GCPII v krvi koreluje s věkem či pohlavím (Publikace I).
- Připravit a charakterizovat myší GCPII po stránce její enzymové aktivity, inhibičního profilu, substrátové specifity a distribuce v myších tkáních. Následně porovnat obdržené výsledky s lidskou GCPII a rozhodnout, zdali jsou myši vhodným modelem pro studie zaměřené na GCPII (Publikace II).
- Vyvinout polymerní konjugáty schopné rozpoznávat a vázat GCPII v běžných biochemických metodách. Poté připravit tyto konjugáty také pro další enzymy i proteiny a ověřit možnost jejich univerzálního použití (Publikace III).

Seznam publikací

Publikace zahrnuté v disertační práci:

- I. Knedlik T, Navratil V, Vik V, Pacik D, Sacha P, Konvalinka J: Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in human blood. *Prostate* 2014, 74(7):768-780.
- II. Knedlik T, Vorlova B, Navratil V, Tykvart J, Sedlak F, Vaculin S, Franek M, Sacha P, Konvalinka J: Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII. *FEBS Open Bio* 2017, 7(9):1362-1378.
- III. Sacha P, Knedlik T, Schimer J, Tykvart J, Parolek J, Navratil V, Dvorakova P, Sedlak F, Ulbrich K, Strohalm J, Majer P, Subr V, Konvalinka J: iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016, 55(7):2356-2360.

Publikace nezahrnuté v disertační práci:

- I. Dvorakova P, Busek P, Knedlik T, Schimer J, Etrych T, Kostka L, Stollinova Sromova L, Subr V, Sacha P, Sedo A, Konvalinka J: Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. *J Med Chem* 2017, přijato.
- II. Tykvart J, Sacha P, Barinka C, Knedlik T, Starkova J, Lubkowski J, Konvalinka J: 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):106-115.
- III. Navratil V, Schimer J, Tykvart J, Knedlik T, Vik V, Majer P, Konvalinka J, Sacha P: DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(2):e10.

Publikace I: Detekce a kvantifikace glutamátcarboxypeptidasy II v lidské krvi

Úvod a motivace studie

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII), mezi urology známá jako membránový antigen specifický pro prostatu (PSMA), je membránová metalopeptidasa hojně exprimována v lidské prostatě a přibližně ještě 10krát více v karcinomu prostaty [1-3]. Ačkoliv je její role ve zdravé prostatě či ve vývoji nádorů prostaty neznámá, je GCPII již více než 20 let pokládána za diagnostický a terapeutický cíl. Radioaktivně značená protilátka proti GCPII (¹¹¹In-7E11; obchodní název ProstaScint) je jediným prostředkem pro detekci exprese GCPII v lidském organismu a určení rozsahu nádoru prostaty, jenž byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) [4, 5].

GCPII byla detekována také v lidské krvi. Výsledky pocházející od několika skupin jsou ovšem nekonzistentní a hodnoty GCPII v krvi se výrazně liší [6-12]. V lidské plazmě byl vedle GCPII identifikován také další enzym (plazmatická glutamátcarboxypeptidasa, PGCP), u něž byla pozorována aktivita specifická pro GCPII spočívající v hydrolyze *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG), endogenního substrátu GCPII [13, 14].

Pro vyjasnění této situace jsme se rozhodli určit koncentraci GCPII v lidské krvi pomocí její specifické enzymové aktivity štěpící endogenní substrát NAAG. Dále jsme hodlali zjistit, zdali se množství GCPII v krvi liší mezi zdravými lidmi.

Shrnutí výsledků a závěry

V této práci jsme objasnili problém týkající se přítomnosti a množství GCPII v lidské krvi. Dále jsme zjistili, že jiná krevní metalopeptidasa, plazmatická glutamátcarboxypeptidasa, nepřispívá ke specifické aktivitě GCPII.

Nejprve jsme připravili dva konstrukty PGCP (mající purifikační značku Avi-tag umístěnou buď na svém N-konci, či C-konci), exprimovali

je v hmyzích buňkách a vyčistili pomocí afinitní chromatografie. Následně jsme ověřili, že připravené a vyčištěné proteiny byly správně sbalené a enzymově aktivní – oba konstrukty štěpily substrát PGCP (L-seryl-L-methionin) [13, 14]. V kontrastu s předchozími publikacemi, žádný připravený konstrukt PGCP neštěpil NAAG, a tedy aktivita PGCP neinterferovala s aktivitou GCPII.

Poté jsme využili specifické enzymové aktivity GCPII štěpící NAAG pro detekci a následnou kvantifikaci GCPII v lidské plazmě. Analyzovali jsme vzorky plazmy od tří zdravých jedinců a zjistili jsme aktivitu štěpící NAAG ve všech třech. Tato aktivita byla navíc inhibovatelná pomocí 2-(fosfonomethyl)pentandiové kyseliny (2-PMPA; kanonický selektivní inhibitor GCPII) a dalších selektivních inhibitorů GCPII. Tyto výsledky silně naznačovaly, že pouze GCPII je zodpovědná za pozorovanou aktivitu. Dále jsme prokázali přítomnost GCPII v krvi přímo pomocí imunoprecipitace GCPII ze zředěné krevní plazmy použitím specifické protilátky proti GCPII.

Nakonec jsme shromáždili vzorky krevní plazmy od zdravých jedinců a určili množství přítomné GCPII (Tab. 1). Koncentrace GCPII se pohybovala mezi 1,3 až 17,2 ng/ml; poněkud překvapivě jsme detekovali GCPII taktéž v ženské plazmě, což poukazuje na zdroj GCPII mimo prostatu. Geometrický průměr koncentrace GCPII v plazmě byl 3,2 ng/ml; pouze pro muže: 3,7 ng/ml; a pouze pro ženy: 2,0 ng/ml. Nezjistili jsme žádnou korelaci mezi množstvím GCPII a věkem či pohlavím dobrovolníků.

Můj příspěvek k práci

V tomto článku jsem provedl většinu uvedených experimentů. Připravil jsem oba konstrukty lidské plazmatické glutamátcarboxypeptidasy (PGCP), exprimoval je v hmyzích buňkách, vyčistil a otestoval jejich enzymovou aktivitu. Taktéž jsem prokázal přítomnost GCPII v lidské krvi a kvantifikoval její množství v krvi u dobrovolníků bez diagnostikovaného nádoru prostaty. Také jsem napsal návrh manuskriptu.

Tab. 1: Množství GCPII v krevní plazmě zdravých dobrovolníků.

Pomocí specifické enzymové aktivity GCPII jsme stanovili koncentraci GCPII v heparinové plazmě zdravých dobrovolníků (bez diagnostikovaného nádoru prostaty). Vzorky byly změřeny v duplikátu ve třech nezávislých experimentech; výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm standardní odchylka. Rekombinantní extracelulární GCPII byla použita jako standard aktivity hydrolyzující NAAg. Mezi množstvím GCPII a věkem či pohlavím dobrovolníků nebyla zjištěna žádná korelace.

	Věk (roky)	GCPII v plazmě (ng/ml)
žena 1	22	1,4 \pm 0.3
žena 2	31	1,3 \pm 0.3
žena 3	43	1,9 \pm 0.3
žena 4	46	4,3 \pm 0.3
muž 1	20	3,7 \pm 0.6
muž 2	22	4,0 \pm 0.6
muž 3	24	2,3 \pm 0.4
muž 4	25	5,7 \pm 0.8
muž 5	26	1,8 \pm 0.3
muž 6	26	1,4 \pm 0.3
muž 7	27	1,3 \pm 0.3
muž 8	27	3,4 \pm 0.7
muž 9	28	4,6 \pm 0.7
muž 10	28	1,5 \pm 0.3
muž 11	33	3,2 \pm 0.5
muž 12	34	17,2 \pm 5.0
muž 13	45	2,4 \pm 0.6
muž 14	50	3,0 \pm 0.4
muž 15	52	9,9 \pm 1.0

Publikace II: Charakterizace a tkáňová distribuce myší glutamátcarboxypeptidasy II

Úvod a motivace studie

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) je membránový antigen hojně exprimovaný v karcinomu prostaty [1-3]. Zároveň se GCPII může podílet na glutamátové excitotoxicitě v mozku [15]. Z těchto důvodů se GCPII stala slibným diagnostickým markerem nádoru prostaty a také potenciálním terapeutickým cílem pro léčbu karcinomu prostaty a nervových poruch spojených se zvýšeným množstvím glutamátu v centrální nervové soustavě [16, 17].

Pro vývoj a následné testování nových terapeutik je nezbytné mít vhodný zvířecí model. Myši obvykle představují nejvhodnější kandidáty, zatímco potkani a prasata jsou druhou volbou. Před několika lety naše laboratoř zveřejnila studii [18], která porovnávala lidskou, potkaní a prasečí GCPII; bohužel, myší GCPII nebyla ve studii zahrnuta, i když myši jsou nejčastěji používaným zvířetem pro výzkum GCPII.

Myší GCPII je velmi podobná svému lidskému protějšku (91% podobnost na aminokyselinové úrovni). Myší GCPII vykazuje obě enzymové aktivity lidské GCPII: aktivitu štěpící *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) a foláthydrolasovou aktivitu. Proteiny se ovšem mohou lišit ve své tkáňové distribuci, jelikož myší GCPII nebyla detekována v myší prostatě [19]. Proto jsme provedli studii, která se zaměřila na enzymovou aktivitu myší GCPII a její detailní tkáňovou distribuci.

Shrnutí výsledků a závěry

V této studii jsme detailně porovnali myší GCPII s jejím lidským protějškem. Zaměřili jsme se zejména na expresní profil myší GCPII, poněvadž ten představuje klíčový aspekt pro vývoj nových protinádorových a neuroprotektivních léčiv založených na GCPII.

Nejprve jsme připravili rekombinantní myší GCPII a následně jsme charakterizovali její enzymovou aktivitu pomocí obou endogenních

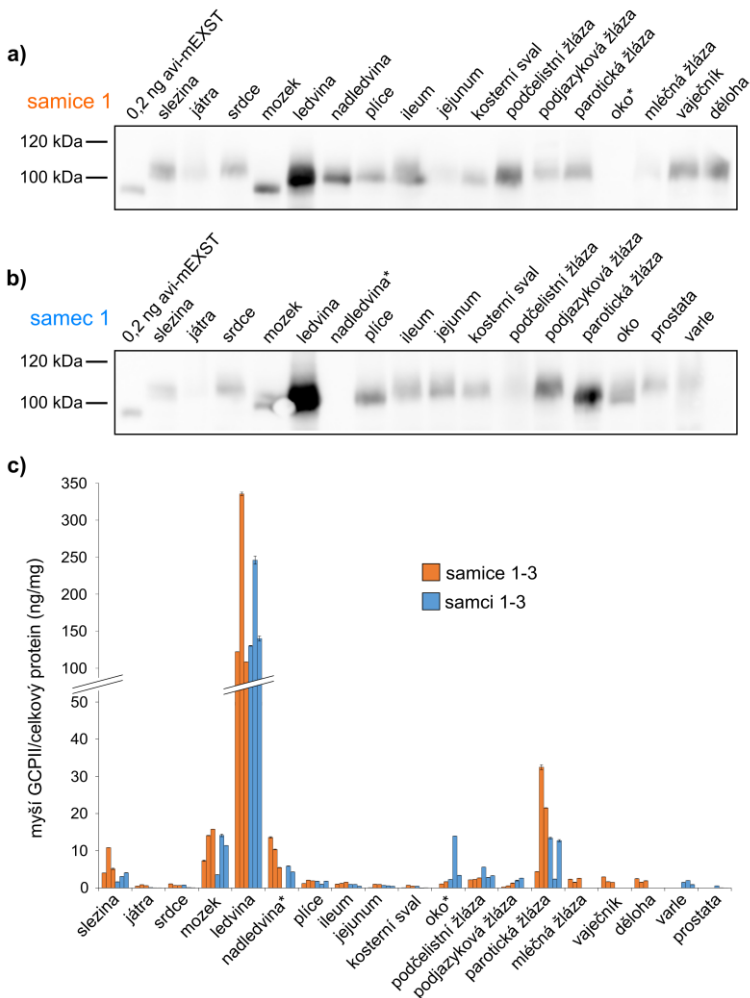
substrátů GCPII: NAAG (substrát GCPII v mozku) a pteroyl-di-L-glutamát (modelový substrát polyglutamylovaných folátů GCPII v tenké střevo). Při porovnání s lidskou GCPII jsme nepozorovali zásadní rozdíly mezi porovnávanými enzymy – myší GCPII vykazuje sice nižší katalytickou účinnost, ale podobnou substrátovou specifitu jako lidská GCPII. Pomocí sady deseti běžně používaných selektivních inhibitorů GCPII jsme analyzovali inhibiční profil obou enzymů, který prokázal podobné inhibiční konstanty pro většinu inhibitorů.

Dále jsme se zaměřili zejména na distribuci GCPII v myších tkáních. Shromáždili jsme vzorky tkání pocházející od 6 myší (3 samice a 3 samci) a poté jsme stanovili množství GCPII pomocí dvou nezávislých metod – pomocí western blotu (Obr. 1a,b) a enzymové aktivity GCPII (Obr. 1c). Největší množství GCPII jsme detekovali v myší ledvině, mozku a slinných žlázách; naopak jsme nezjistili žádnou GCPII v myší prostatě (Obr. 1), což je ve shodě s předchozími studiemi.

Naše výsledky ukazují, že enzymová aktivita obou proteinů je podobná, a tudíž myší GCPII je vhodnou náhradou za lidskou GCPII při vývoji nových inhibitorů GCPII. Nicméně při vývoji nových metod cíleného doručování protinádorových léčiv (a použití myší jako zvířecího modelu) se musí zohlednit rozdílná tkáňová distribuce obou proteinů.

Můj příspěvek k práci

V této studii jsem připravil, exprimoval a vyčistil rekombinantní myší GCPII. Dále jsem provedl velkou část experimentů zahrnující analýzu její enzymové aktivity a inhibičního profilu a dále distribuci proteinu GCPII v myších tkáních. Také jsem napsal návrh manuskriptu.



Obr. 1: Distribuce GCPII v myších tkáních.

a, b) Analýza tkáňové distribuce myší GCPII u samice (a) a samce (b) pomocí western blotu. GCPII byla vizualizována pomocí specifické protilátky proti GCPII (GCP-04) [20]. Rekombinantní myší extracelulární GCPII byla použita jako standard (avi-mGCPII); do gelu bylo naneseno 50 μ g celkových proteinů. c) Expresní profil GCPII v myších tkáních určený dle kvantifikace specifické aktivity GCPII za použití [3 H]NAAG jako substrátu a avi-mGCPII jako standardu. Každý vzorek byl změřen v duplikátu, za použití 1-50 μ g celkových proteinů v reakci. Pro stanovení byly použity stejné vzorky tkání jako v případě western blotu. Hvězdička (*) představuje chybějící vzorek (oko samice 1, nadledvina samce 1).

Publikace III: iBodies: polymerní mimetika protilátek substituovaná funkčními molekulami

Úvod a motivace studie

Monoklonální protilátky způsobily revoluci v biochemii a nyní představují nepostradatelné nástroje pro biomedicínu a terapii. Pro GCPII existuje několik dostupných protilátek, avšak jejich použití může trpět různými problémy, mezi které patří omezená stabilita a obtíže při jejich chemické modifikaci. Pro jiné proteiny může být dokonce nemožné připravit protilátky s dostatečnou citlivostí a selektivitou.

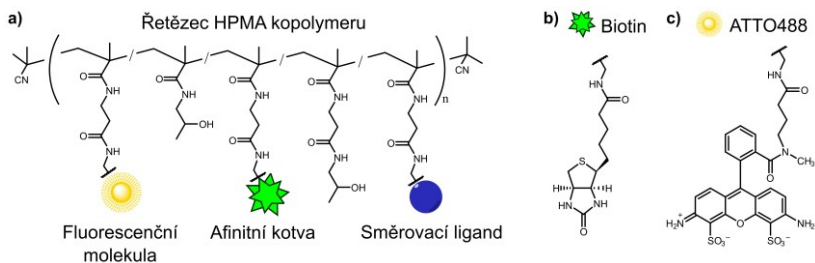
Selektivní inhibitory enzymů mohou být další volbou pro směrování na konkrétní proteiny. Pro GCPII existuje několik skupin selektivních inhibitorů, které se používají pro vizualizaci GCPII jak *in vitro*, tak *in vivo* [21]. Většina laboratoří pracujících s určitými enzymy vlastní několik různě selektivních a účinných inhibitorů.

Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli zkombinovat tyto přístupy dohromady a vytvořili jsme syntetická mimetika protilátek, která jsme nazvali iBodies. Tyto konjugáty jsou založeny na hydrofilním kopolymeru z *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), který je substituován třemi různými nízkomolekulárními ligandy [22]: směrovacím ligandem (většinou inhibitory enzymů), zobrazovací sondou a afinitní kotvou (Obr. 2). Tyto ligandy zajišťují selektivní cílení konjugátu na určitý protein, jeho vizualizaci a případnou izolaci.

Naším cílem bylo vyvinout nový biochemický nástroj pro studium fyziologických funkcí GCPII. Během vývoje jsme si uvědomili, že tato univerzální polymerní platforma může být „snadno“ využita a adaptována pro prakticky libovolný protein, pro který je znám inhibitor či jiný ligand.

Shrnutí výsledků a závěry

V této studii jsme vyvinuli nová polymerní mimetika protilátek s využitím inhibitorů jako směrovacích ligandů (Obr. 2). Jako náš primární cíl a modelový protein jsme si vybrali GCPII.



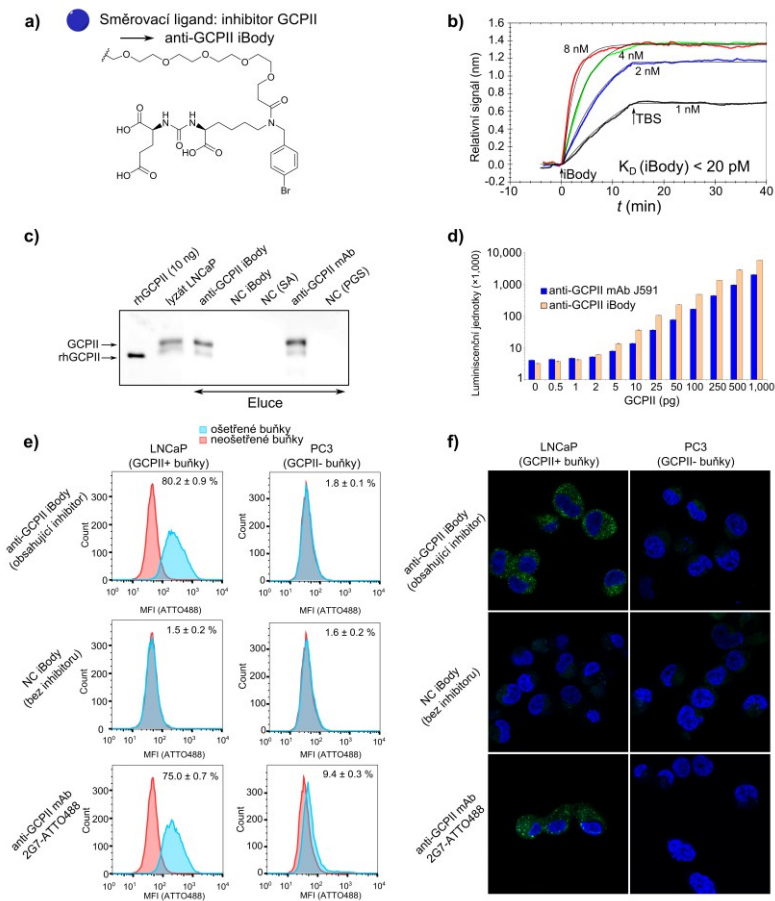
Obr. 2: Schematická struktura iBodies.

iBodies jsou polymerní mimetika protilátek. a) iBodies se skládají z kopolymeru založeného na *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), jenž je substituován různými malými molekulami pro různé funkce: směrovacím ligandem (tj. selektivními inhibitory enzymů), zobrazovací sondou (fluorescenčními molekulami) a afinitní kotvou; b) afinitní kotva biotin; c) fluorescenční molekula ATTO488.

Nejprve byl na HPMA kopolymer konjugován známý selektivní inhibitor GCPII, který tak fungoval jako směrovací ligand a zajišťoval selektivní rozpoznávání GCPII (Obr. 3a). Na kopolymer byl připojen také biotin (fungující jako afinitní kotva) a ATTO488 (pro vizualizaci konjugátu). Získaný konjugát (anti-GCPII iBody) byl poté testován v několika biochemických metodách pro zhodnocení jeho vlastností a aplikovatelnosti a univerzálnosti.

Vazba konjugátu na GCPII byla nejprve analyzována pomocí inhibice enzymové aktivity GCPII a povrchové plasmonové rezonance, která odhalila velmi nízkou disociační konstantu interakce (Obr. 3b). Poté jsme přešli k *in vitro* metodám jako je „imunoprecipitace“ (izolace GCPII z buněčného lyzátu a krevního séra; Obr. 3c) a ELISA (limit detekce 1 pg GCPII; Obr. 3d) a. Následně jsme ověřili vhodnost konjugátu pro selektivní vizualizaci GCPII na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie (Obr. 3e) a konfokální mikroskopie (Obr. 3f).

Všechny tyto zmíněné metody prokázaly, že konjugát proti GCPII je výbornou náhradou za protilátky proti GCPII v běžných biochemických aplikacích.



Obr. 3: Použití konjugátu (iBody) proti GCPII v biochemických metodách.

a) Selektivní inhibitor GCPII fungující jako směrovací ligand. b) Analýza interakce mezi GCPII a konjugátem anti-GCPII pomocí SPR. c) Imunoprecipitace GCPII z lysátu buněk LNCaP pomocí konjugátu anti-GCPII či monoklonální protilátky (mAb) J591 [23]. Jako negativní kontrola byl použit konjugát bez inhibitoru GCPII (NC iBody), čistá streptavidin-agarosa (NC(SA)) či čistá protein G-sepharosa (NC(PGS)). Jako standard byla použita rekombinantní GCPII (rhGCPII). d) ELISA s využitím specifické protilátky 2G7 jako záhytové protilátky a buď konjugátu anti-GCPII, nebo biotinylované protilátky J591 jako detekčního agens. e) Analýza buněk exprimujících a neexprimujících GCPII (LNCaP a PC-3) pomocí průtokové cytometrie. Buňky byly inkubovány buď s konjugátem anti-GCPII či protilátkou 2G7 značenou ATTO488 (2G7-ATTO488). Jako negativní kontrola byl použit konjugát bez inhibitoru GCPII (NC iBody). f) Analýza buněk LNCaP and PC-3 pomocí konfokální mikroskopie; buňky byly inkubovány s konjugátem anti-GCPII, protilátkou 2G7-ATTO488 či NC iBody.

Dále jsme prokázali univerzálnost této platformy a vyvinuli jsme konjugáty cílicí i další enzymy: HIV-1 proteasu (pomocí selektivního inhibitoru založeného na komerčně dostupném ritonaviru) a skupinu proteas (pomocí inhibitoru všech aspartátových proteas – pepstatinu A). Abychom ukázali, že konjugáty mohou být vytvořeny proti prakticky každému proteinu, pro který je znám selektivní inhibitor či jiný ligand, připravili jsme konjugáty vázající proteiny označené polyhistidinovou kotvou za použití komplexu nitrilotrioctové kyseliny (NTA) a nikelnatých kationtů.

Závěrem lze říci, že tyto polymerní konjugáty představují modulární a univerzální biochemický nástroj, který může být použit jako syntetická, chemicky stabilní a lehce modifikovatelná náhrada protilátek v mnoha biochemických metodách pro různé proteiny.

Můj příspěvek k práci

V tomto komplexním článku jsem byl zodpovědný za biochemickou část projektu. Provedl jsem většinu biochemických experimentů, které analyzovaly aplikovatelnost a funkčnost připravených konjugátů v biochemických metodách. Použití konjugátů jsem testoval v několika metodách: od enzymové kinetiky a povrchové plasmonové rezonance po experimenty s buněčnými kulturami s využitím konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie. Mimo to jsem vedl bakalářské a magisterské studenty, kteří významně přispěli k této studii. Napsal jsem také návrh článku.

Seznam literatury

1. Lapidus, R. G., Tiffany, C. W., Isaacs, J. T., and Slusher, B. S. (2000) *Prostate* **45**, 350-354
2. Mhawech-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F. R., and Penetrante, R. (2007) *Histopathology* **50**, 472-483
3. Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P. M., Jr., Wang, C. Y., and Haas, G. P. (2006) *World J. Surg.* **30**, 628-636
4. Kahn, D., Williams, R. D., Seldin, D. W., Libertino, J. A., Hirschhorn, M., Dreicer, R., Weiner, G. J., Bushnell, D., and Gulfo, J. (1994) *J. Urol.* **152**, 1490-1495
5. Haseman, M. K., Reed, N. L., and Rosenthal, S. A. (1996) *Clin. Nucl. Med.* **21**, 704-713
6. Xiao, Z., Adam, B. L., Cazares, L. H., Clements, M. A., Davis, J. W., Schellhammer, P. F., Dalmasso, E. A., and Wright, G. L., Jr. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6029-6033
7. Beckett, M. L., Cazares, L. H., Vlahou, A., Schellhammer, P. F., and Wright, G. L. (1999) *Clin. Cancer Res.* **5**, 4034-4040
8. Murphy, G. P., Kenny, G. M., Ragde, H., Wolfert, R. L., Boynton, A. L., Holmes, E. H., Misrock, S. L., Bartsch, G., Klocker, H., Pointner, J., Reissigl, A., McLeod, D. G., Douglas, T., Morgan, T., and Gilbaugh, J. (1998) *Urology* **51**, 89-97
9. Murphy, G. P., Maguire, R. T., Rogers, B., Partin, A. W., Nelp, W. B., Troychak, M. J., Ragde, H., Kenny, G. M., Barren, R. J., 3rd, Bowes, V. A., Gregorakis, A. K., Holmes, E. H., and Boynton, A. L. (1997) *Prostate* **33**, 281-285
10. Murphy, G. P., Tino, W. T., Holmes, E. H., Boynton, A. L., Erickson, S. J., Bowes, V. A., Barren, R. J., Tjoa, B. A., Misrock, S. L., Ragde, H., and Kenny, G. M. (1996) *Prostate* **28**, 266-271
11. Rochon, Y. P., Horoszewicz, J. S., Boynton, A. L., Holmes, E. H., Barren, R. J., 3rd, Erickson, S. J., Kenny, G. M., and Murphy, G. P. (1994) *Prostate* **25**, 219-223
12. Troyer, J. K., Beckett, M. L., and Wright, G. L. (1995) *Int. J. Cancer* **62**, 552-558
13. Gingras, R., Richard, C., El-Alfy, M., Morales, C. R., Potier, M., and Pshezhetsky, A. V. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11742-11750
14. Zajc, T., Suban, D., Rajkovic, J., and Dolenc, I. (2011) *Protein Expr. Purif.* **75**, 119-126
15. Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., and Coyle, J. T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14498-14506
16. Neale, J. H., Olszewski, R. T., Gehl, L. M., Wroblewska, B., and Bzdega, T. (2005) *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 477-484
17. Zhou, J., Neale, J. H., Pomper, M. G., and Kozikowski, A. P. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 1015-1026
18. Rovenska, M., Hlouchova, K., Sacha, P., Mlcochova, P., Horak, V., Zamecnik, J., Barinka, C., and Konvalinka, J. (2008) *Prostate* **68**, 171-182
19. Bacich, D. J., Pinto, J. T., Tong, W. P., and Heston, W. D. (2001) *Mamm Genome* **12**, 117-123
20. Sacha, P., Zamecnik, J., Barinka, C., Hlouchova, K., Vicha, A., Mlcochova, P., Hilgert, I., Eckschlagler, T., and Konvalinka, J. (2007) *Neuroscience* **144**, 1361-1372
21. Ferraris, D. V., Shukla, K., and Tsukamoto, T. (2012) *Curr. Med. Chem.* **19**, 1282-1294
22. Subr, V., and Ulbrich, K. (2006) *Reactive & Functional Polymers* **66**, 1525-1538
23. Chang, S. S., Reuter, V. E., Heston, W. D. W., Bander, N. H., Grauer, L. S., and Gaudin, P. B. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3192-3198

Curriculum vitae

Mgr. Tomáš Knedlík

Narozen: 4. dubna 1986 v Ostravě, Česká republika

Vzdělání

- **2010-nyní** Doktorské studium na Katedře biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita v Praze. Disertační práce "*Glutamátkarboxypeptidasa II jako cíl terapeutického zásahu a molekulární adresa pro léčbu nádorových onemocnění*" pod vedením doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., na Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR.
- **2008-2010** Magisterský titul na Katedře biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita v Praze. Diplomová práce "*Klonování, exprese a biochemická charakterizace myši glutamátkarboxypeptidasy II*" pod vedením doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., na Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR.
- **2005-2008** Bakalářský titul na Katedře biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita v Praze. Bakalářská práce "*Myši glutamátkarboxypeptidasa II: klonování, exprese a aktivita*" pod vedením doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., na Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR.

Publikace:

Autor či spoluautor 6 vědeckých publikací v zahraničních recenzovaných časopisech.

Ústní (UP) a plakátové (PP) prezentace na konferencích:

- Basel Life Science Week 2016 (Basilej, Švýcarsko, 2016, PP)
- BioVaria 2016 (Mnichov, Německo, 2016, UP & PP)
- 1st Biospot konference (Praha, 2016, UP & PP)
- 9th General Meeting of The International Proteolysis Society (Penang, Malajsie, 2015, UP)
- International Proteolysis Society 2015 Early Career Scientist Forum (Penang, Malajsie, 2015)
- 34th FEBS konference (Praha, 2009, PP)

Certifikáty:

září 2011

First Certificate in English: stupeň A (Council of Europe: úroveň C1, Cambridge ESOL: úroveň 2)

Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII), also known as prostate-specific membrane antigen (PSMA), is a membrane metallopeptidase overexpressed on most prostate cancer cells. Additionally, GCPII also attracted neurologists' attention because it cleaves neurotransmitter *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG). Since NAAG exhibits neuroprotective effects, GCPII may participate in a number of brain disorders, which were shown to be ameliorated by GCPII selective inhibitors. Therefore, GCPII has become a promising target for imaging and prostate cancer targeted therapy as well as therapy of neuronal disorders.

Globally, prostate cancer represents the second most prevalent cancer in men. However, prostate tumors are life-threatening only if they spread from the prostate and start to spread to other tissues. Therefore, considerable efforts have been made to discover tumors earlier at more curable stages as well as to target aggressive metastatic tumors that have already invaded other tissues and become resistant to standard treatment. Since patients undergoing a conventional therapy suffer from severe side effects, more effective ways of treatment are being searched for. Novel approaches include selective targeting of tumor antigens, overexpressed on tumor cells. GCPII represents such a target that may be used either for imaging of advanced cancers or as an address for prostate-targeted drug delivery.

The studies presented in the thesis focused on GCPII as a potential diagnostic and therapeutic target as well as development of novel molecular tools for studying the role of GCPII in various tissues. Therefore, we evaluated GCPII potential to become a serum marker of prostate cancer and determined its blood concentration among healthy population. Since development of novel therapeutics requires a model organism, we characterized mouse GCPII. Finally, we developed polymer conjugates decorated with GCPII inhibitors that might become a tool for an active drug delivery to cells expressing GCPII. These conjugates might also serve as antibody mimetics enabling selective targeting of desired proteins, their isolation and *in vitro* and *in vivo* visualization. This novel chemical tool, called iBodies, also has the application outside of the area of GCPII.

Aims of the thesis

- To develop a method for the detection and quantitation of GCPII in the human blood. To verify if other enzymes contribute to GCPII activity. To analyze the origin and function of GCPII in the blood and determine if GCPII levels in the blood correlate with age, sex or, eventually, prostate cancer stage (Publication I).
- To prepare and characterize mouse GCPII regarding its enzyme activity, inhibition profile, substrate specificity and, importantly, tissue distribution in mice. To compare the results with human GCPII and elucidate if mouse is a suitable animal model for GCPII-based therapies (Publication II).
- To design and develop polymer conjugates capable of GCPII targeting in common biochemical methods. To prepare these polymer-based antibody mimetics also for other enzymes and proteins and verify their universal and versatile applicability (Publication III).

List of publications

Publications included in the thesis

- I. Knedlik T, Navratil V, Vik V, Pacik D, Sacha P, Konvalinka J: Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in human blood. *Prostate* 2014, 74(7):768-780.
- II. Knedlik T, Vorlova B, Navratil V, Tykvart J, Sedlak F, Vaculin S, Franek M, Sacha P, Konvalinka J: Mouse glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has similar enzyme activity and inhibition profile but a different tissue distribution to human GCPII. *FEBS Open Bio* 2017, 7(9):1362-1378.
- III. Sacha P, Knedlik T, Schimer J, Tykvart J, Parolek J, Navratil V, Dvorakova P, Sedlak F, Ulbrich K, Strohalm J, Majer P, Subr V, Konvalinka J: iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016, 55(7):2356-2360.

Publications not included in the thesis

- I. Dvorakova P, Busek P, Knedlik T, Schimer J, Etrych T, Kostka L, Stollinova Sromova L, Subr V, Sacha P, Sedo A, Konvalinka J: Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. *J Med Chem* 2017, accepted.
- II. Tykvart J, Sacha P, Barinka C, Knedlik T, Starkova J, Lubkowski J, Konvalinka J: 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):106-115.
- III. Navratil V, Schimer J, Tykvart J, Knedlik T, Vik V, Majer P, Konvalinka J, Sacha P: DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(2):e10.

Publication I: Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in the human blood

Background

Glutamate carboxypeptidase II is strongly expressed in the human prostate and, interestingly, approximately 10-fold overexpressed in prostate cancer [1-3]. Even though its role in the prostate or prostate cancer progression (if any) is not known, GCPII's potential to become a diagnostic and/or therapeutic target was recognized 20 years ago. An ¹¹¹indium-antibody conjugate raised against GCPII, trade name ProstaScint™, became the first (and unfortunately also the last) detection agent to image GCPII expression and thus the extent of prostate cancer, which was approved by the FDA [4, 5].

GCPII, better known as prostate-specific membrane antigen (PSMA) among urologists, was also searched in the human blood. GCPII was detected in the human blood by several groups, however, the obtained results were inconsistent and GCPII levels in the blood differed significantly [6-12]. Besides GCPII, another metallopeptidase (plasma glutamate carboxypeptidase, PGCP) was identified in the plasma and reported to possess NAAG-hydrolyzing activity [13, 14].

To make the situation clear, we decided to detect and determine GCPII concentration in human blood via its NAAG-hydrolyzing activity. Furthermore, we were interested if GCPII levels in the blood vary among healthy volunteers.

Results and conclusions

We shed light upon conflicting reports on presence of GCPII in the human blood and its possible correlation with prostate cancer progression. Moreover, we analyzed if another protease, plasma glutamate carboxypeptidase, may contribute to the GCPII activity.

First, we cloned two PGCP constructs (containing an Avi-tag placed either at its C-terminus, or N-terminus), expressed them in insect

cells and purified them via affinity chromatography. We then verified the proteins are properly folded and active enzymes – both constructs cleaved a cognate substrate of PGCP (L-seryl-L-methionine) [13, 14]. In contrast with previous report, neither construct cleaved NAAG, the endogenous substrate of GCPII.

Having proved that PGCP does not contribute to the enzyme activity of GCPII, we used NAAG-hydrolyzing assay for detection and subsequent quantification of GCPII in the human blood. We analyzed three plasma samples from healthy individuals and observed NAAG-hydrolyzing activity in all of them. The activity was sensitive to 2-PMPA and other selective GCPII inhibitors, suggesting that solely GCPII is responsible for the activity. Furthermore, we confirmed presence of GCPII in the blood by immunoprecipitation of GCPII from the diluted blood plasma using biotinylated monoclonal antibody raised against native GCPII.

Finally, we collected samples of blood plasma from healthy individuals and determined GCPII concentration in their blood (Tab. 2). The GCPII levels ranged between 1.3 and 17.2 ng/ml; slightly surprisingly, we detected GCPII also in the female samples, which suggests non-prostatic origin of GCPII. The geometrical mean of the GCPII levels in the blood plasma was 3.2 ng/ml; for men only: 3.7 ng/ml; and female only: 2.0 ng/ml. We observed no correlation between GCPII concentration and age of the volunteers.

My contribution

In this paper, I conducted all the experiments presented. I prepared two constructs of human plasma glutamate carboxypeptidase, expressed and purified them in insect cells and tested them for their enzymatic activity. I also showed presence of glutamate carboxypeptidase II in the human blood and quantified its concentration in the blood of volunteers not diagnosed with prostate cancer. I also wrote a draft of the manuscript.

Tab. 2: GCPII levels in the blood plasma of healthy volunteers.

Using GCPII-specific radioenzymatic assay, GCPII concentration in the heparin blood plasma of healthy volunteers was determined. The samples were measured in duplicates in three separate experiments and the results are mean \pm standard deviation. Recombinant extracellular GCPII was used as a standard of NAAG-hydrolyzing activity. No correlation between GCPII levels and age or sex was observed.

	Age (years)	GCPII in plasma (ng/ml)
female 1	22	1.4 \pm 0.3
female 2	31	1.3 \pm 0.3
female 3	43	1.9 \pm 0.3
female 4	46	4.3 \pm 0.3
male 1	20	3.7 \pm 0.6
male 2	22	4.0 \pm 0.6
male 3	24	2.3 \pm 0.4
male 4	25	5.7 \pm 0.8
male 5	26	1.8 \pm 0.3
male 6	26	1.4 \pm 0.3
male 7	27	1.3 \pm 0.3
male 8	27	3.4 \pm 0.7
male 9	28	4.6 \pm 0.7
male 10	28	1.5 \pm 0.3
male 11	33	3.2 \pm 0.5
male 12	34	17.2 \pm 5.0
male 13	45	2.4 \pm 0.6
male 14	50	3.0 \pm 0.4
male 15	52	9.9 \pm 1.0

Publication II: Biochemical characterization and tissue distribution of mouse glutamate carboxypeptidase II

Motivation of the study

Glutamate carboxypeptidase II, which is overexpressed on prostate carcinoma cells [1-3] and also implicated in glutamate excitotoxicity in the brain [15], became an interesting diagnostic marker of prostate cancer and a possible therapeutic target both for prostate cancer and neuronal disorders connected with increased levels of glutamate in the central nervous system [16, 17].

For development and subsequent testing of novel therapeutics, it is necessary to have a suitable animal model. Mice represent usually the most promising candidates, while rats and pigs are the second choice. Several years ago, a study comparing human, rat and pig GCPII was performed in our laboratory [18], however, the mouse ortholog was not included, although mice are the most widely used animals in the GCPII-focused research.

Mouse GCPII is highly similar to its human counterpart (91% of amino acid similarity). Mouse GCPII was shown to possess both enzyme activities of human GCPII: NAAG-hydrolyzing activity in the brain and folate hydrolase activity in the small intestine. On the other hand, its absence in the mouse prostate is in sharp contrast to the tissue distribution of human GCPII [19]. Therefore, we set to perform a thorough study assessing mouse GCPII enzyme activity and tissue distribution, which had been needed.

Results and conclusions

In this paper, we prepared recombinant mouse GCPII and compared it in detail with the human ortholog. We focused particularly on the expression pattern of mouse GCPII, since this is highly relevant aspect for the development of new anticancer and neuroprotective therapies based on GCPII.

First, we characterized the enzyme activity of mouse and human GCPII using both endogenous substrates: NAAG (brain) and pteroyl-di-L-glutamate (small intestine). We discovered no striking differences between the compared enzymes – mouse GCPII possessed lower catalytic efficiency but similar substrate preferences compared to the human enzyme. We also analyzed inhibition profile of both enzymes using a panel of ten common GCPII inhibitors, showing comparable inhibition constants for the majority of inhibitors.

We put a strong focus upon GCPII distribution in mouse tissues. We collected tissue samples from six mice (3 females and 3 males) and determined GCPII expression levels using two independent assays – western blotting (Fig. 1a,b) and GCPII enzyme activity assay (Fig. 1c). We detected highest GCPII expression in the mouse kidney, brain and salivary glands. We did not detect GCPII in the mouse prostate, which is in agreement with previous studies (Fig. 1).

Taken together, our results show that there are no significant differences in enzyme activities of both proteins. Thus, mouse GCPII is a proper substitute for human GCPII in the development of novel inhibitors. Nevertheless, different expression patterns must be considered when using mice as an animal model for development of targeted anticancer drug delivery approaches.

My contribution

I expressed and purified recombinant mouse glutamate carboxypeptidase II. I performed majority of the experiments, including analysis of its enzyme activity and inhibition profile and distribution of the GCPII protein in mouse tissues. I also wrote a draft of the manuscript.

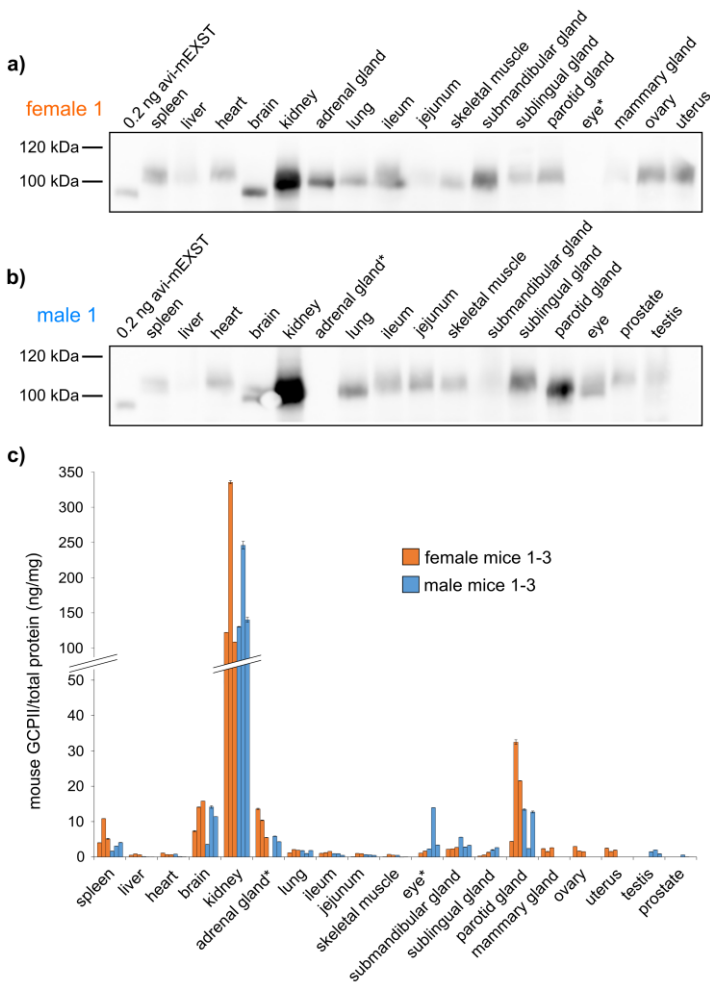


Fig. 1: Expression profile of GCPII in mice.

a, b) Western blot analysis of GCPII distribution in mouse female and male tissues, respectively. GCPII was visualized by monoclonal antibody GCP-04 [20], followed by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody. Recombinant mouse extracellular GCPII was used as a standard (avi-mGCPII) and 50 μ g of total protein was loaded. c) Expression profile of GCPII in mice tissues determined by quantification of GCPII-specific NAAG-hydrolyzing activity by radioenzymatic assay using [3 H]NAAG as a substrate and avi-mGCPII as a standard. Each tissue sample was measured in duplicate using 1-50 μ g total protein in the reaction; the assay was performed with the same tissue samples used in the western blot analysis. The asterisk (*) represents the missing sample (female 1 eye, male 1 adrenal gland).

Publication III: iBodies: modular synthetic antibody mimetics based on hydrophilic polymers decorated with functional moieties

Background

Monoclonal antibodies caused a revolution in biochemistry and now represent indispensable tools for biomedicine and therapy. As for GCPII, there is a number of antibodies available, however, their use might suffer from several disadvantages, such as difficulty of chemical modification and limited stability. For other proteins, it may be even impossible to prepare antibodies with sufficient binding potency and selectivity towards the target.

Apart from antibodies, specific enzyme inhibitors may be another choice for targeting a protein of interest. In the field of GCPII, there are several groups of potent and specific inhibitors, which are already used as low-molecular-weight molecules for GCPII imaging both *in vitro* and *in vivo* [21]. Almost every laboratory studying a particular enzyme owns a number of more or less potent and selective inhibitors.

Therefore, we combined these two approaches together and developed synthetic antibody mimetics, which we called iBodies. The iBodies are based on water-soluble *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer decorated with three various low-molecular-weight ligands [22]: a targeting ligand (usually an enzyme inhibitor), an imaging probe and an affinity anchor (Fig. 2). The ligands ensure selective targeting of a protein of interest, visualization of the conjugate and enable its isolation.

Our initial goal was to develop a novel biochemical tool to study GCPII physiological functions; however, during the development we realized we had in our hands universal platform that could be “easily” adapted virtually for all proteins, for which a targeting ligand is known.

Results and conclusions

In this study, we developed novel polymer-based antibody mimetics, using enzyme inhibitors as targeting ligands (Fig. 2). We chose glutamate carboxypeptidase II as a model protein and our primary goal.

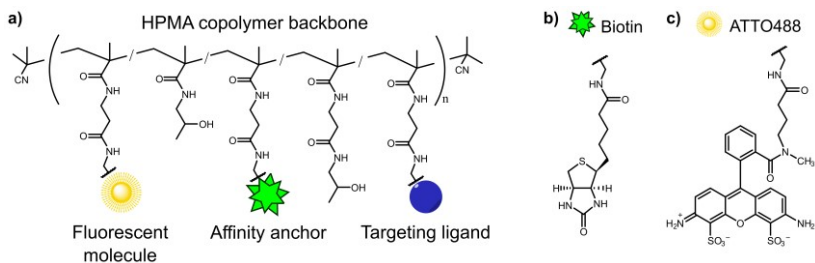


Fig. 2: Schematic structure of iBodies.

The iBodies are polymer-based antibody mimetics. a) The iBodies consist of an *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer, which is substituted with various small molecules for distinct functions: an imaging probe, affinity anchor and targeting ligand (selective enzyme inhibitors); b) affinity anchor biotin; c) fluorescent molecule ATTO488.

A previously described GCPII-specific inhibitor was conjugated to HPMA copolymer, serving as targeting ligand and ensuring selective recognition of GCPII (Fig. 3a). Besides the inhibitor molecules, ATTO488 (functioning as an imaging probe) and biotin (for isolation/immobilization of the conjugate) were attached to the copolymer backbone. The obtained conjugate, an anti-GCPII iBody, was then tested in a number of biochemical applications to evaluate its properties and applicability.

The binding to GCPII was analyzed using GCPII enzyme activity inhibition assay and further by surface plasmon resonance, which revealed remarkably low dissociation constant of the interaction (Fig. 3b). Therefore, we proceeded to *in vitro* methods such as “immunoprecipitation” (isolation of GCPII from cell lysates and the blood serum; Fig. 3c) and sandwich ELISA (reaching limit of detection as low as 1 pg GCPII; Fig. 3d). Having succeeded, we also verified the suitability of the iBody as a tool for a specific GCPII visualization on GCPII positive cells using flow cytometry (Fig. 3e) and confocal microscopy (Fig. 3f). All above-mentioned methods showed that anti-GCPII iBody is an excellent substitute for anti-GCPII antibodies in common biochemical applications.

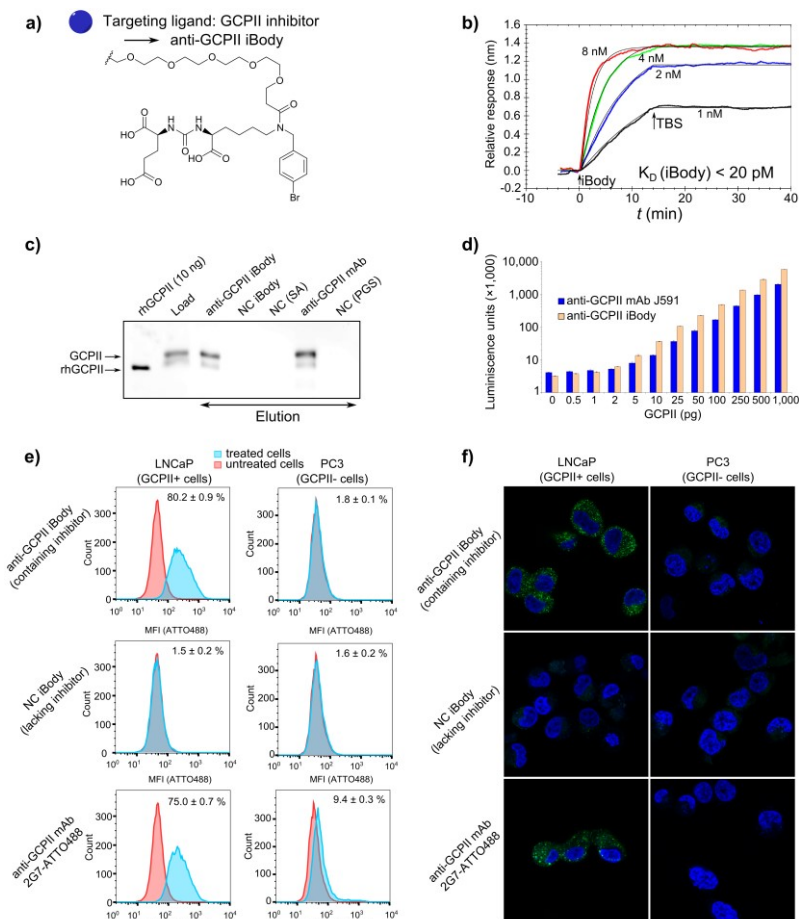


Fig. 3: Applications of anti-GCPII iBody in biochemical methods.

a) Selective GCPII inhibitor. b) SPR analysis of the interaction between GCPII and anti-GCPII iBody. c) Western blot analysis of GCPII “immunoprecipitation” from LNCaP cell lysate using anti-GCPII iBody or monoclonal antibody (mAb) J591 [23]. As negative controls, iBody lacking the GCPII inhibitor (NC iBody) and blank streptavidin agarose (NC(SA)) or blank protein G sepharose (NC(PGS)) were used. As a standard, extracellular GCPII was used (rhGCPII). d) ELISA using GCPII-specific mAb J591 as a capturing antibody and anti-GCPII iBody or biotinylated mAb J591 as a detecting agent. e) Flow cytometry of cells expressing and not expressing GCPII (LNCaP and PC-3, respectively). Cells were incubated with either anti-GCPII iBody or anti-GCPII mAb 2G7 labeled with ATTO488 (2G7-ATTO488). As a negative control, iBody lacking the GCPII inhibitor was used (NC iBody). f) Microscopy analysis of LNCaP and PC-3 cells, incubated with anti-GCPII iBody, mAb 2G7-ATTO488 or NC iBody.

Furthermore, we showed universality of the approach and developed iBodies targeting other enzymes: HIV-1 protease (using HIV-specific inhibitor based on commercially available inhibitor ritonavir) and group of enzymes (using class-specific inhibitor of all aspartic proteases – pepstatin A). To demonstrate that iBodies can be created towards virtually any target, for which a ligand is known, we prepared iBodies targeting His-tagged proteins, using nickel/cobalt-loaded nitrilotriacetic acid (NTA) derivative.

Altogether, iBodies represent a modular and versatile biochemical tool, which can be used as a non-animal-based, chemically stable and easily modifiable antibody mimetic suitable for use in a number of biochemical applications.

My contribution

In this complex paper, I was responsible for the biochemical part of the project. I conducted majority of the experiments that evaluated applicability and functionality of the prepared conjugates in biochemical methods. I tested all conjugates in a number of applications ranging from enzyme inhibition assay and surface plasmon resonance to cell culture experiments using flow cytometry and confocal microscopy. Besides, I also supervised undergraduate students, who significantly contributed to the paper. I also wrote a draft of the manuscript.

References

1. Lapidus, R. G., Tiffany, C. W., Isaacs, J. T., and Slusher, B. S. (2000) *Prostate* **45**, 350-354
2. Mhawech-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F. R., and Penetrante, R. (2007) *Histopathology* **50**, 472-483
3. Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P. M., Jr., Wang, C. Y., and Haas, G. P. (2006) *World J. Surg.* **30**, 628-636
4. Kahn, D., Williams, R. D., Seldin, D. W., Libertino, J. A., Hirschhorn, M., Dreicer, R., Weiner, G. J., Bushnell, D., and Gulfo, J. (1994) *J. Urol.* **152**, 1490-1495
5. Haseman, M. K., Reed, N. L., and Rosenthal, S. A. (1996) *Clin. Nucl. Med.* **21**, 704-713
6. Xiao, Z., Adam, B. L., Cazares, L. H., Clements, M. A., Davis, J. W., Schellhammer, P. F., Dalmasso, E. A., and Wright, G. L., Jr. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6029-6033
7. Beckett, M. L., Cazares, L. H., Vlahou, A., Schellhammer, P. F., and Wright, G. L. (1999) *Clin. Cancer Res.* **5**, 4034-4040
8. Murphy, G. P., Kenny, G. M., Ragde, H., Wolfert, R. L., Boynton, A. L., Holmes, E. H., Misrock, S. L., Bartsch, G., Klocker, H., Pointner, J., Reissigl, A., McLeod, D. G., Douglas, T., Morgan, T., and Gilbaugh, J. (1998) *Urology* **51**, 89-97
9. Murphy, G. P., Maguire, R. T., Rogers, B., Partin, A. W., Nelp, W. B., Troychak, M. J., Ragde, H., Kenny, G. M., Barren, R. J., 3rd, Bowes, V. A., Gregorakis, A. K., Holmes, E. H., and Boynton, A. L. (1997) *Prostate* **33**, 281-285
10. Murphy, G. P., Tino, W. T., Holmes, E. H., Boynton, A. L., Erickson, S. J., Bowes, V. A., Barren, R. J., Tjoa, B. A., Misrock, S. L., Ragde, H., and Kenny, G. M. (1996) *Prostate* **28**, 266-271
11. Rochon, Y. P., Horoszewicz, J. S., Boynton, A. L., Holmes, E. H., Barren, R. J., 3rd, Erickson, S. J., Kenny, G. M., and Murphy, G. P. (1994) *Prostate* **25**, 219-223
12. Troyer, J. K., Beckett, M. L., and Wright, G. L. (1995) *Int. J. Cancer* **62**, 552-558
13. Gingras, R., Richard, C., El-Alfy, M., Morales, C. R., Potier, M., and Pshezhetsky, A. V. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11742-11750
14. Zajc, T., Suban, D., Rajkovic, J., and Dolenc, I. (2011) *Protein Expr. Purif.* **75**, 119-126
15. Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., and Coyle, J. T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14498-14506
16. Neale, J. H., Olszewski, R. T., Gehl, L. M., Wroblewska, B., and Bzdega, T. (2005) *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 477-484
17. Zhou, J., Neale, J. H., Pomper, M. G., and Kozikowski, A. P. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 1015-1026
18. Rovenska, M., Hlouchova, K., Sacha, P., Mlcochova, P., Horak, V., Zamecnik, J., Barinka, C., and Konvalinka, J. (2008) *Prostate* **68**, 171-182
19. Bacich, D. J., Pinto, J. T., Tong, W. P., and Heston, W. D. (2001) *Mamm Genome* **12**, 117-123
20. Sacha, P., Zamecnik, J., Barinka, C., Hlouchova, K., Vicha, A., Mlcochova, P., Hilgert, I., Eckschlagler, T., and Konvalinka, J. (2007) *Neuroscience* **144**, 1361-1372
21. Ferraris, D. V., Shukla, K., and Tsukamoto, T. (2012) *Curr. Med. Chem.* **19**, 1282-1294
22. Subr, V., and Ulbrich, K. (2006) *Reactive & Functional Polymers* **66**, 1525-1538
23. Chang, S. S., Reuter, V. E., Heston, W. D. W., Bander, N. H., Grauer, L. S., and Gaudin, P. B. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3192-3198

Curriculum vitae

Tomáš Knedlík, MSc.

Born: April 4, 1986 in Ostrava, Czech Republic

Education:

- **2010 - present** Ph.D. study at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague. Dissertation thesis "*Glutamate Carboxypeptidase II as a Drug Target and a Molecular Address for Cancer Treatment*" under supervision of Dr. J. Konvalinka at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences.
- **2008 - 2010** M.Sc. degree at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague. Diploma thesis "*Cloning, expression and biochemical characterization of mouse glutamate carboxypeptidase II*" under supervision of Dr. J. Konvalinka at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences.
- **2005-2008** Bc. degree at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague. Bachelor thesis "*Mouse glutamate carboxypeptidase II: cloning, expression and activity*" under supervision of Dr. J. Konvalinka at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences.

Publications:

Co-author of 6 publications in peer-reviewed international journals.

Conference oral (OP) and poster (PP) presentations:

- Basel Life Science Week 2016 (Basel, Switzerland, 2016; PP, 3rd best poster award)
- BioVaria 2016 (Munich, Germany, 2016; OP & PP)
- 1st Biospot Conference (Prague, Czech Republic, 2016; OP & PP)
- 9th General Meeting of The International Proteolysis Society 2015 (Penang, Malaysia, 2015; OP)
- The International Proteolysis Society Early Career Scientist Forum 2015 (Penang, Malaysia, 2015)
- 34th FEBS Congress (Prague, Czech Republic, 2009; PP)

Certificates:

September 2011

First Certificate in English – Grade A (Council of Europe Level C1, Cambridge ESOL Level 2)