

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními a imobilizovanými kinázami

Bc. Eliška Šťovíčková

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Šťovíčková**

Osobní číslo: **C15637**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními
a imobilizovanými kinázami**

Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- ” Fosforylace proteinů - funkce, význam in vivo, popis enzymové reakce.
 - ” Využití metod pro detekci fosforylací - celková fosforylace, specifické fosforylační místa.
 - ” Enzymy podílející se na fosforylaci - kinázy, fosfatázy.
 - ” Přehled kináz významných při fosforylace diagnosticky a terapeuticky významných proteinů.
- Charakterizace kináz pro in vitro aplikace.

” Význam tau proteinu a myelinového bazického proteinu a jejich fosforylovaných forem u neurodegenerativních chorob.

Experimentální část:

- ” Imobilizace enzymů/proteinů na magnetické částice.
- ” Stanovení aktivity solubilní a vázané formy vybraných kináz.
- ” Fosforylace nízkomolekulárních substrátů a vybraných proteinů pomocí imobilizovaných kináz.
- ” Průkaz fosforylace analytů pomocí elektroforetických metod a pomocí hmotnostní spektrometrie.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti: **Mgr. Lenka Hromádková**

Katedra biologických a biochemických věd

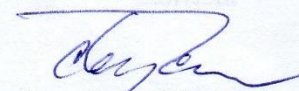
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Nesouhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Eliška Šťovíčková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D., dále Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D., Mgr. Lence Hromádkové a Mgr. Rudolfu Kupčíkovi za odborné vedení, cenné rady, ochotu a velkou pomoc při zpracování diplomové práce. Také děkuji všem pracovníkům laboratoře za vstřícnost a ochotu pomoci. Poděkování patří také mým nejbližším za podporu během mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá zavedením metody pro fosforylaci peptidů a proteinů pomocí solubilních a imobilizovaných kináz. Vybranými kinázami pro fosforylaci byla proteinkináza A a glykogen syntáza kináza-3. V rámci práce byla vybrána a optimalizována metoda pro průkaz a kontrolu účinnosti fosforylace peptidů a proteinů.

KLÍČOVÁ SLOVA

fosforylace, kinázy, fosfoproteiny, proteinkináza A, glykogen syntáza kináza-3

TITLE

Phosphorylation of recombinant proteins by soluble and immobilized kinases

ANNOTATION

This thesis deals with the implementation of method for phosphorylation of peptides and proteins by soluble and immobilized kinases. The selected kinases for phosphorylation were proteinkinase A and glycogen synthase kinase-3. This thesis include selection and optimalization of method for detection and controlling effectiveness of phosphorylation of peptides and proteins.

KEYWORDS

phosphorylation, kinases, phosphoproteins, proteinkinase A, glycogen synthase kinase-3

OBSAH

0. ÚVOD	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1. Proteiny a význam posttranslačních modifikací.....	13
1.1.1. Fosforylace proteinů.....	13
1.1.2. Kinázy.....	14
1.1.3. Fosfatázy.....	16
1.2. Charakterizace vybraných kináz významných při fosforylaci diagnosticky významných proteinů	16
1.2.1. Cyklin-dependentní kinázy (CDK).....	16
1.2.2. Glykogen syntáza kinázy-3 (GSK-3)	17
1.2.3. Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK)	18
Kinázy p38.....	18
c-Jun N-terminální kinázy (JNK)	19
Extracelulárně regulované kinázy (ERK)	19
1.2.4. Duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (DYRK).....	19
1.2.5. Kasein kinázy (CK)	20
1.2.6. Tau tubulin kinázy (TTBK).....	21
1.2.7. Fosforyláza kinázy (PhK).....	21
1.2.8. Proteinkinázy A (PKA)	21
1.2.9. Proteinkinázy B (PKB).....	22
1.2.10. Proteinkinázy C (PKC).....	23
1.2.11. Src tyrosin kinázy (Src)	23
1.3. Metody detekce fosforylovaných proteinů.....	24
1.3.1. Radioaktivní značení fosfoproteinů izotopem ³² P nebo ³³ P	24
1.3.2. Metody využívající fosfo-specifické protilátky.....	25
1.3.3. Metody pro barvení/značení fosfoproteinů	27
Metoda barvení fosfoproteinů pomocí Stains-All	27
Metoda barvení fosfoproteinů pomocí Pro-Q Diamond	28
Metoda značení fosfoproteinů pomocí Phos-tag	29
Metoda značení fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO.....	30
1.3.4. Metody pro obohacení a analýzu fosforylovaných proteinů/peptidů	31
Metoda obohacení fosfoproteinů pomocí imunoprecipitace	31
Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů	32

Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů se sekvenční elucí.....	32
Hydrofilní interakční chromatografie	32
Afinitní elektroforéza na imobilizovaných iontech kovů	33
Afinitní chromatografie na oxidu titaničitém	33
Afinitní chromatografie na oxidu zirkoničitém	33
Obohacení fosfopeptidů na destičce	34
Afinitní zachycení na polymeru funkcionalizovaném kovovými ionty.....	35
Iontově výměnná chromatografie na silném katexu a silném anexu	35
1.3.5. Hmotnostní spektrometrie se zaměřením na analýzu fosfopeptidů.....	36
1.4. Charakterizace vybraných diagnosticky významných fosfoproteinů	38
1.4.1. Neurofibromin	38
1.4.2. Prionový protein (PrP).....	38
1.4.3. Huntingtin.....	39
1.4.4. α -synuklein	39
1.4.5. Myelinový bazický protein.....	40
1.4.6. Tau protein.....	40
Struktura a izoformy tau proteinu	41
Význam tau proteinu u neurodegenerativních chorob	42
Posttranslační modifikace tau proteinu	43
Fosforylace tau proteinu	44
Přehled kináz fosforylujících tau protein.....	45
Přehled fosfatáz defosforylujících tau protein	46
Metody detekce fosforylovaného tau proteinu	46
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	48
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
3.1. Potřebné vybavení.....	49
3.2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a glycinu	53
3.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu	54
3.4. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu s s přísadkou močoviny	56
3.5. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza	57
3.6. Barvení gelů roztokem Coomassie G-250 Stain	58
3.7. Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra	59
3.8. Barvení gelů pomocí ProteoSilver™ Silver Stain Kit	60

3.9. Polosuchý tzv. „semi-dry“ westernový přenos proteinů na membránu	61
3.10. Bodový přenos tzv. „dot-blot“ proteinů na membránu	61
3.11. Barvení membrán roztokem Ponceau S	62
3.12. Barvení membrán roztokem koloidního zlata	62
3.13. Detekce fosfoproteinů na membráně s využitím specifických protilátek	63
3.14. Uvolnění vázaných protilátek z membrány.....	64
3.15. Uvolnění vázaných protilátek z membrány s využitím 2-merkptoethanolu.....	64
3.16. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu	65
3.17. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu.....	66
3.18. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v uspořádání na mikrotitrační destičce.....	66
3.19. Odsolení vzorků a analýza (fosfo)proteinů/peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie	68
3.20. Imobilizace TPCK-trypsinu na magnetické částice	69
3.21. Stanovení aktivity imobilizovaného TPCK-trypsinu	70
3.22. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetické částice	70
3.23. Stanovení aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu	71
3.24. Imobilizace alkalické fosfatázy na magnetické částice.....	72
3.25. Stanovení aktivity imobilizované alkalické fosfatázy.....	73
3.26. Rozvolnění, redukce a alkylace myelinového bazického proteinu	74
3.27. Štěpení myelinového bazického proteinu dvěma proteolytickými enzymy vázanými na nosič.....	75
3.28. Stanovení míry fosforylace krátkých peptidů pomocí solubilních kináz v čase	75
3.29. Imobilizace vybraných kináz na magnetické částice	76
3.30. Stanovení míry fosforylace krátkých peptidů pomocí imobilizovaných kináz v čase.....	77
3.31. Stanovení operační stability imobilizovaných kináz.....	77
3.32. Stanovení skladovací – operační stability imobilizovaných kináz	78
3.33. Fosforylace proteinu tau-441 solubilními kinázami	78
3.34. Fosforylace proteinu tau-441 imobilizovanou proteinkinázou A	79
3.35. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku kyseliny trifluoroctové	79
3.36. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku deoxycholátu sodného	80

3.37. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku Tweenu 20.....	80
3.38. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku Tritonu® X-100.....	81
3.39. Štěpení proteinu tau-441 trypsinem	81
3.40. Obohacení fosfopeptidů	82
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	84
4.1. Separace vybraných proteinů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a glycinu	84
4.2. Výběr analytické metody detekce vybraných krátkých peptidů a jejich fosforylace.....	85
4.2.1. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu	85
4.2.2. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu s přídavkem močoviny.....	86
4.2.3. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí metody bodového přenosu na membránu	87
4.3. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO	88
4.3.1. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu.....	89
4.3.2. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu	90
4.3.3. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v uspořádání na mikrotitrační destičce	93
4.4. Imobilizace modelových enzymů na magnetické částice a stanovení jejich aktivity	95
4.4.1. Imobilizace TPCCK-trypsinu na magnetické částice a stanovení jeho aktivity	95
4.4.2. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetické částice a stanovení jeho aktivity	96
4.4.3. Imobilizace alkalické fosfatázy na magnetické částice a stanovení její aktivity.....	97
4.5. Štěpení myelinového bazického proteinu imobilizovanými proteolytickými enzymy ..	98
4.6. Fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí proteinkinázy A.....	102
4.6.1. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí solubilní proteinkinázy A v čase	102
4.6.2. Porovnání míry fosforylace peptidových substrátů kemptid poskytnutých dvěma výrobcí.....	104
4.6.3. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí imobilizované proteinkinázy A v čase	107
4.6.4. Zhodnocení vlivu promývacích roztoků na aktivitu vázané proteinkinázy A.....	111

4.6.5. Zhodnocení vlivu roztoků detergentů na aktivitu vázané proteinkinázy A.....	113
4.6.6. Stanovení operační stability imobilizované proteinkinázy A.....	113
4.6.7. Stanovení skladovací – operační stability imobilizované proteinkinázy A.....	114
4.7. Fosforylace peptidového substrátu pomocí GSK-3	116
4.7.1. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pomocí imobilizované GSK-3 v čase	116
4.7.2. Stanovení skladovací – operační stability imobilizované GSK-3	118
4.8. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinu tau-441	119
4.9. Enzymová fosforylace proteinu tau-441	120
4.9.1. Fosforylace proteinu tau-441 pomocí solubilní PKA a GSK-3.....	120
4.9.2. Fosforylace proteinu tau-441 pomocí imobilizované PKA.....	125
5. ZÁVĚR	131
6. SEZNAM ZKRATEK	132
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	137

0. ÚVOD

Fosforylace je posttranslační modifikace proteinů, kterou zprostředkovávají enzymy označované kinázy. Fosforylace ovlivňuje funkce proteinů, dále regulaci mnoha buněčných procesů, například regulaci buněčného cyklu, proliferace a diferenciaci buněk, regulaci buněčného přežití a apoptózy buněk a další.

Změny ve fosforylaci proteinů často souvisí s patologickými stavy ve tkáních a mohou vést ke vzniku závažných onemocnění, například neurodegenerativních chorob, celé řady nádorových onemocnění včetně krevních malignit, onemocnění spjatých s autoimunitní reakcí organismu apod. Studium těchto procesů na molekulární úrovni a hledání možností jejich ovlivnění je z pohledu praktické medicíny velice aktuální. Jedině na základě pochopení těchto dějů probíhajících na úrovni buňky, tkání, orgánů nebo celého organismu lze navrhnout a poté ověřit kvalitativně nové terapeutické postupy. S tím souvisí i požadavky na vhodné analytické metody a metody monitorující proces fosforylace cílových molekul probíhající *in vivo* v organismu nebo *in vitro* v laboratoři. Ověřené postupy jsou poté využity též pro regulovanou a kontrolovanou fosforylaci a přípravu vhodných standardů a reagensů pro diagnostiku, ať již v rámci výzkumu, případně klinických studií.

Diplomová práce se zabývá popisem *in vivo* fosforylace proteinů a charakterizací vybraných významných kináz z hlediska jejich struktury, regulace, výskytu a funkce. Součástí práce je také přehled metod vhodných pro detekci fosforylovaných proteinů. Další část práce je věnována charakterizaci vybraných diagnosticky významných fosfoproteinů.

Diplomová práce se zabývá zavedením vhodné metody pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů/proteinů, budoucích standardů pro diagnostické metody. Fosforylace probíhá za účasti solubilních forem kináz nebo pomocí nosičů s imobilizovanými enzymy na pevné fázi. V rámci práce byla zavedena metoda kovalentní vazby vybraných kináz na povrch magnetických částic spolu se stanovením jejich enzymové aktivity. Dále byla zavedena a experimentálně ověřena metoda pro kontrolu účinnosti *in vitro* fosforylace vybraných peptidů a proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie, jako vhodné detekční metody.

1. TEORETICKÁ ČÁST

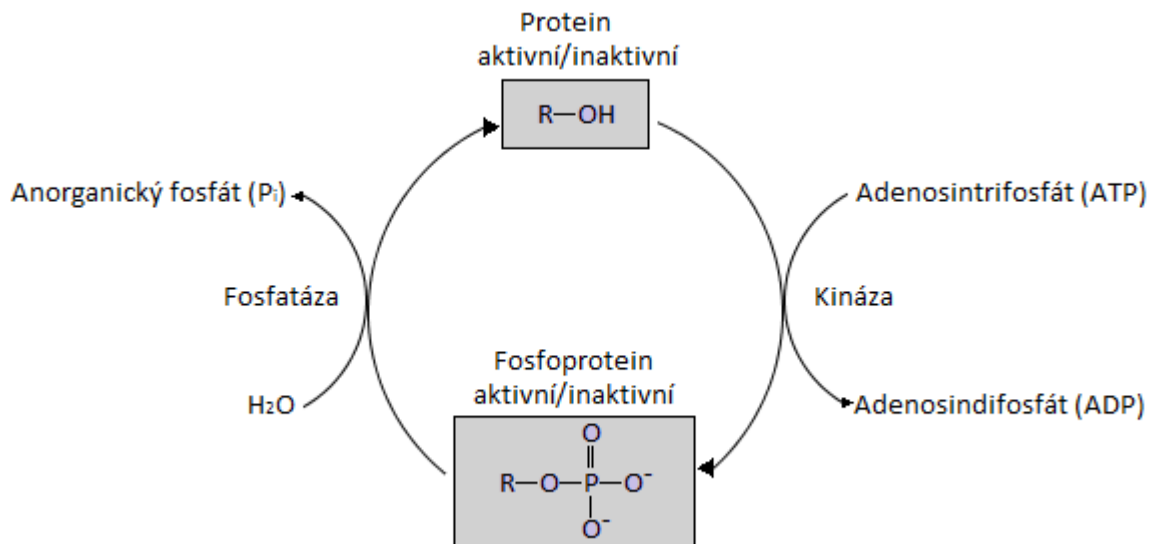
1.1. Proteiny a význam posttranslačních modifikací

Proteiny plní v organismu mnoho funkcí, které zahrnují především funkci katalytickou, strukturální, transportní, signalizační a regulační. Proteiny jsou syntetizovány při procesu translace na ribozomech, které zprostředkovávají spojení aminokyselin v sekvenci určené mediátorovou RNA (mRNA). Primární struktura proteinů je dána sekvencí aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Sekundární struktura proteinů je představována α -helixy a β -skládanými listy. Dle terciární struktury lze proteiny rozdělit na globulární a fibrilární. Kvarterní struktura proteinů složených ze dvou a více polypeptidových řetězců je dána vzájemným uspořádáním jejich podjednotek v jeden funkční celek (Lodish, 2004).

Proteiny podléhají různým posttranslačním modifikacím, ke kterým dochází jednak na volných $-\text{NH}_2$ a $-\text{COOH}$ skupinách, ale také na dalších funkčních skupinách proteinů. Mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů lze řadit fosforylaci, acetylaci, glykosylaci, hydroxylaci, metylaci a jiné. V jejich důsledku může být ovlivněna konformace a funkce jednotlivých proteinů (Lodish, 2004).

1.1.1. Fosforylace proteinů

Fosforylace patří mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů. Fosforylace proteinů je katalyzována enzymy nazývanými kinázy a je založena na přenosu fosfátové skupiny získané nejčastěji z adenosintrifosfátu (ATP) na hydroxylovou skupinu serinu, threoninu nebo tyrosinu. Naopak defosforylace fosforylovaných proteinů je katalyzována enzymy nazývanými fosfatázy. Schematické znázornění průběhu fosforylace a defosforylace proteinů je uvedeno na Obrázku 1. V důsledku fosforylace dochází ke změnám náboje, a tedy konformace proteinů (Lodish, 2004). Fosforylace se podílí zejména na regulaci funkcí proteinů, dále na regulaci mezibuněčné komunikace, ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk, metabolismus, pohyb nebo apoptózu buněk (Manning, 2002).



Obrázek 1 Schematické znázornění průběhu fosforylace a defosforylace proteinů (Lodish, 2004, modifikováno)

1.1.2. Kinázy

Kinázy jsou enzymy zprostředkovávající přenos fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu (ATP) nebo guanosintrifosfátu (GTP) na specifický proteinový substrát. Z tohoto důvodu kinázy náleží do enzymové třídy transferáz. Fosforylace je lokalizována v katalytickém místě kinázy, které umožňuje jednak vazbu ATP nebo GTP a jednak vazbu specifického proteinového substrátu (Martin, 2013a).

Dosud bylo u člověka popsáno celkem 518 kináz. Na základě sekvenční podobnosti katalytických domén bylo 478 kináz zařazeno mezi typické kinázy, které lze rozdělit do 8 skupin. Kinázy fosforylující proteiny na serinu a threoninu tvoří skupinu proteinkináz obsahující CDK, MAPK, GSK-3 a CLK rodiny (CMGC), skupinu kasein kináz 1 (CK1), skupinu Ca^{2+} /kalmodulin-dependentních proteinkináz (CAMK), skupinu proteinkináz obsahující PKA, PKG a PKC rodiny (AGC), skupinu homologů kvasinkových kináz Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 (STE) a skupinu dalších proteinkináz. Kinázy fosforylující proteiny na tyrosinu tvoří skupinu tyrosinových kináz (TK). Skupina tyrosinových kináz like (TKL) zahrnuje různé kinázy s vlastnostmi podobnými se serin/threonin kinázami i tyrosin kinázami. Přehled vybraných rodin kináz náležících do jednotlivých skupin typických kináz je uveden v Tabulce 1 – 3. Zbýlých 40 kináz tvoří skupinu atypických kináz (Cell Signaling Technology, 2017; Manning, 2002).

Tabulka 1 Přehled vybraných rodin kináz náležících do skupin CMGC, CK1 a CAMK (Cell Signaling Technology, 2017; Manning, 2002)

Skupina proteinkináz obsahující CDK, MAPK, GSK-3 a CLK rodiny (CMGC)
Cyklin-dependentní kinázy (CDK)
Glykogen syntáza kinázy-3 (GSK-3)
Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK)
Duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (DYRK)
Cdc2-like kinázy (CLK)
Cyklin-dependentní kinázy like (CDKL)
Serin-arginin proteinkinázy pro sestřihový faktor (SRPK)
Skupina kasein kináz 1 (CK1)
Kasein kinázy 1 (CK1)
Tau tubulin kinázy (TTBK)
Kinázy spojené s vakcinií (VRK)
Skupina Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentních proteinkináz (CAMK)
Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentní proteinkinázy 1 (CaMK1)
Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentní proteinkinázy 2 (CaMK2)
Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentní proteinkinázy like (CAMKL)
Fosforyláza kinázy (PhK)
Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentní serin proteinkinázy (CASK)
Proteinkinázy asociované se smrtí (DAPK)
Kinázy lehkého řetězce myosinu (MLCK)
Testis-specifické serin kinázy (TSSK)
Proteinkinázy D (PKD)
Doublecortin- a CAMK-like kinázy (DCAMKL)
MAPK-aktivované proteinkinázy (MAPKAPK)

Tabulka 2 Přehled vybraných rodin kináz náležících do skupin AGC a TK (Cell Signaling Technology, 2017; Manning, 2002)

Skupina proteinkináz obsahující PKA, PKG a PKC rodiny (AGC)
Proteinkinázy A (PKA)
Proteinkinázy B (PKB)
Proteinkinázy C (PKC)
Proteinkinázy N (PKN)
Proteinkinázy G (PKG)
Proteinkinázy myotonické dystrofie (DMPK)
Kinázy regulované sérem a glukokortikoidy (SGK)
Ribozomální protein S6 kinázy (RSK)
Receptorové kinázy spojené s G proteinem (GRK)
S mikrotubuly asociované serin/threonin kinázy (MAST)
Skupina tyrosinových kináz (TK)
Src tyrosin kinázy (Src)
Abl tyrosin kinázy (Abl)
Tec tyrosin kinázy (Tec)

Tabulka 3 Přehled vybraných rodin kináz náležících do skupin TKL, STE a skupiny dalších proteinkináz (Cell Signaling Technology, 2017; Manning, 2002)

Skupina tyrosinových kináz like (TKL)
Kinázy směsných linií (MLK)
Kinázy asociované s receptorem pro interleukin-1 (IRAK)
Proteinkinázy interagující s receptorem (RIPK)
Skupina homologů kvasinkových kináz Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 (STE)
Kinázy mitogenem aktivovaných proteinkináz (STE7/MAPKK)
Kinázy kináz mitogenem aktivovaných proteinkináz (STE11/MAPKKK)
Kináza kináz kináz mitogenem aktivovaných proteinkináz (STE20/MAPKKKK)
Skupina dalších proteinkináz
Kasein kinázy 2 (CK2)
Polo-like kinázy (PLK)
Kinázy Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentních proteinkináz (CAMKK)

1.1.3. Fosfatázy

Fosfatázy lze rozdělit do 4 rodin. Rodina fosfoproteinfosfatáz (PPP) zahrnující proteinfosfatázu 1 (PP1), proteinfosfatázu 2A (PP2A), proteinfosfatázu 2B (PP2B), proteinfosfatázu 4 (PP4), proteinfosfatázu 5 (PP5), proteinfosfatázu 6 (PP6) a proteinfosfatázu 7 (PP7) a rodina metal-dependentních proteinfosfatáz (PPM) umožňují defosforylaci proteinů fosforylovaných na serinu, případně threoninu. Rodina protein tyrosin fosfatáz (PTP) umožňuje defosforylaci proteinů fosforylovaných na tyrosinu. Poslední rodinu tvoří fosfatázy využívající katalýzu založenou na aspartátu (Moorhead, 2009).

1.2. Charakterizace vybraných kináz významných při fosforylaci diagnosticky významných proteinů

V této kapitole jsou blíže charakterizovány z hlediska struktury, regulace, výskytu a funkce vybrané významné kinázy zahrnující cyklin-dependentní kinázy (CDK), glykogen syntáza kinázy-3 (GSK-3), mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (DYRK), kasein kinázy (CK), tau tubulin kinázy (TTBK), fosforyláza kinázy (PhK), proteinkinázy A (PKA), proteinkinázy B (PKB), proteinkinázy C (PKC) a Src tyrosin kinázy (Src) (Martin, 2013a).

1.2.1. Cyklin-dependentní kinázy (CDK)

CKD zahrnují 13 izoforem označovaných CDK1 – CDK13 (De Vivo, 2011). Molekulová hmotnost izoforem CDK je v rozmezí 30 – 40 kDa a jejich sekvenční homologie dosahuje 40 % (Hardcastle, 2002). CDK jsou katalytické podjednotky a cykliny jsou

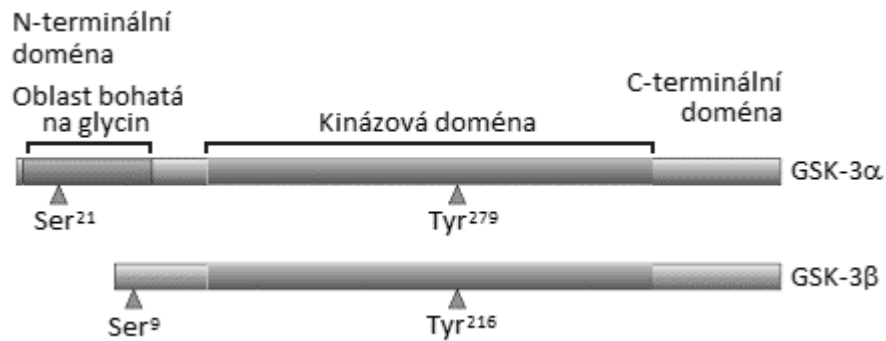
regulační podjednotky komplexů CDK-cyklin (Jeffrey, 1995). CDK jsou složeny z N-terminální globulární domény tvořené β -skládanými listy a jedním α -helixem potřebným pro interakci CDK s cyklinem a z C-terminální globulární domény, která je tvořena především z α -helixů a obsahuje aktivační smyčku, která začíná motivem Asp-Phe-Gly a je místem, kde dochází k fosforylaci prostřednictvím CDK-aktivační kinázy (CAK). Mezi globulárními doménami se nachází místo obsahující ATP a umožňující vazbu substrátu (De Vivo, 2011). Pro aktivaci CDK je nezbytná vazba cyklinů a v některých případech je pro úplnou aktivaci nutná také fosforylace threoninových zbytků v CDK podjednotce prostřednictvím CAK (Jeffrey, 1995), která je složena ze tří podjednotek (CDK7, cyklin H a MAT1) (Lolli, 2005). CDK2 může být aktivována vazbou cyklinů A, B a E a následně fosforylací pomocí CAK (Li, 2015). CDK5 je aktivována tvorbou komplexů s p35 nebo p39, které jsou exprimovány například v neuronech. Pro aktivaci CDK5 již není nutná fosforylace aktivační smyčky (De Vivo, 2011).

CDK se podílí zejména na regulaci cyklu buněčného dělení, proliferace a transkripce. Významnou úlohu při apoptóze má CDK2 a v nervových buňkách se uplatňuje především CDK5 (Gray, 1999).

1.2.2. Glykogen syntáza kinázy-3 (GSK-3)

GSK-3 zahrnuje dvě savčí izoformy označované GSK-3 α a GSK-3 β . Molekulová hmotnost izoformy GSK-3 α dosahuje 51 kDa. Menší izoforma GSK-3 β má molekulovou hmotnost 47 kDa. Struktura GSK-3 je charakteristická přítomností C-terminální domény a kinázové domény s 98% sekvenční homologií mezi izoformami, další částí je N-terminální doména, která v případě izoformy GSK-3 α zahrnuje navíc oblast bohatou na glycin, jak je znázorněno na Obrázku 2 (Doble, 2003). Aktivace GSK-3 je umožněna fosforylací tyrosinu lokalizovaného v aktivační smyčce. V případě GSK-3 α se jedná o Tyr²⁷⁹, zatímco u izoformy GSK-3 β je fosforylován Tyr²¹⁶ (Cole, 2004). Naopak inhibice aktivity GSK-3 je způsobena fosforylací prostřednictvím proteinkinázy B (PKB) nebo proteinkinázy A (PKA) na Ser²¹ v případě GSK-3 α a na Ser⁹ v případě GSK-3 β (Fang, 2000). Příklad *in vitro* fosforylace peptidového substrátu pomocí GSK-3 β uvedl Bowley (2005).

GSK-3 je přítomna ve všech savčích tkáních. Mezi významné funkce GSK-3 patří regulace metabolismu glykogenu, dále regulace proliferace a diferenciaci buněk a syntézy proteinů (Frame, 2001).



Obrázek 2 Schematické znázornění struktury GSK-3 (Doble, 2003, modifikováno)

1.2.3. Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK)

MAPK zahrnují p38, c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a extracelulárně regulované kinázy (ERK). p38 a JNK jsou současně považovány za stresem aktivované proteinkinázy (SAPK) (Yang, 2007). SAPK patří do rodiny MAPK, ovšem jejich aktivace je umožněna prostřednictvím buněčného stresu, kterým může být například chemický a tepelný šok nebo působení UV záření. Další možnost aktivace SAPK spočívá v působení cytokinů na povrchové receptory buněk, například interleukinu-1 (Goedert, 1997). p38 a JNK se uplatňují především při regulaci zánětlivých reakcí a při apoptóze, zatímco ERK jsou významné zejména pro diferenciaci, proliferaci a přežívání buněk (Yang, 2007).

Kinázy p38

p38 je podrodinou MAPK a u savců zahrnuje 4 izoformy označované p38 α , p38 β , p38 γ a p38 δ (Remy, 2010). Všechny izoformy p38 mají molekulovou hmotnost 38 kDa a homologie jejich aminokyselinových sekvencí dosahuje 60 % (Cuenda, 2007). Kinázy p38 jsou složeny ze dvou domén oddělených místem umožňujícím vazbu substrátu. N-terminální doména obsahuje vazebné místo pro adeninový kruh ATP. C-terminální doména tvoří vazebné místo pro hořčík a fosforylační místo (Wilson, 1996). Aktivace p38 je zprostředkována dvojitou fosforylací motivu Thr-Gly-Tyr v případě buněčného stresu nebo za působení cytokinů. Aktivaci p38 zprostředkovávají MAPK kinázy označované MKK3 a MKK6, které jsou prostřednictvím fosforylace aktivovány příslušnými MAPK kinázami (MAPKKK) (Thornton, 2009).

Izoformy p38 α a p38 β se vyskytují téměř ve všech tkáních. Izoforma p38 γ se nachází zejména ve svalové tkáni a izoforma p38 δ je přítomna především v kůži, tenkém střevě a ledvinách (Hui, 2007). Funkce kináz p38 zahrnuje regulaci normálních imunitních reakcí

a zánětlivých reakcí, dále například regulaci buněčného cyklu, diferenciaci, proliferaci a apoptózu (Cuenda, 2007).

c-Jun N-terminální kinázy (JNK)

JNK je podrodinou MAPK a u savců zahrnuje 3 izoformy označované JNK1, JNK2 a JNK3 (Bogoyevitch, 2010). JNK jsou složeny ze dvou domén s aktivním místem ve tvaru štěrbinu (Davis, 2000). Aktivace JNK probíhá v reakci na buněčný stres a je regulována dvojitou fosforylací motivu Thr-X-Tyr prostřednictvím MAPK kináz zahrnujících MKK4 a MKK7, které jsou aktivovány fosforylací příslušnými MAPKKK (Tournier, 1999).

Izoformy JNK1 a JNK2 jsou exprimovány ve všech tkáních. Izoforma JNK3 je přítomna zejména v mozku, dále například v srdeční tkáni nebo varlatech (Bode, 2007). JNK se podílí na regulaci buněčných procesů, zahrnujících například buněčný růst, diferenciaci, transformaci nebo apoptózu (Wada, 2004).

Extracelulárně regulované kinázy (ERK)

ERK jsou podrodinou MAPK a zahrnují p44 (ERK1), p42 (ERK2) a p38 ERK (Pei, 2002). Struktura ERK je složena z N-terminální domény propojené s větší C-terminální doménou, přičemž vazba ATP je lokalizována v prohlubni mezi doménami (Cobb, 1995). ERK1 a ERK2 jsou aktivovány prostřednictvím Ras/Raf/MEK/ERK kaskády (Jiang, 2000), jejíž význam spočívá mimo jiné v ovlivnění aktivity proteinů regulujících apoptózu. Ras je malý protein, který váže GTP a aktivuje kaskádu Raf/MEK/ERK. Raf je serin/threonin kináza (McCubrey, 2007). Aktivaci ERK1 a ERK2 zprostředkovává ERK1/2 kináza prostřednictvím specifické fosforylace threoninu a tyrosinu v regulačních místech (Jiang, 2000).

ERK1 a ERK2 se vyskytují zejména v neuronech, dendritech, axonech a také v astrocytech (Ferrer, 2001). Hlavní význam ERK1 a ERK2 spočívá v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci, dále v regulaci buněčného přežití nebo apoptózu (Wortzel, 2011).

1.2.4. Duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (DYRK)

Rodina DYRK zahrnuje pět lidských kináz dělených do dvou tříd. Do třídy I náleží izoformy DYRK1A a DYRK1B, zatímco do třídy II patří izoformy DYRK2, DYRK3 a DYRK4 (Soundararajan, 2013). Všechny izoformy DYRK jsou složeny z homologní kinázové domény a přilehlé DYRK homologní oblasti. Aktivace DYRK je zprostředkována autofosforylací druhého tyrosinu motivu Tyr-X-Tyr, který je u všech izoform lokalizovaný v aktivační smyčce (Lochhead, 2005).

DYRK plní důležité funkce zejména při regulaci neurogeneze, dále se účastní například regulace buněčné diference, buněčného přežití, RNA splicingu a apoptózy (Soundararajan, 2013).

1.2.5. Kasein kinázy (CK)

Rodiny kasein kináz 1 a 2 (CK1, CK2) patří mezi první popsané proteinkinázy (Knippschild, 2005). CK1 zahrnuje u savců 7 monomerních izoform označovaných CK1 α , CK1 β , CK1 γ_1 , CK1 γ_2 , CK1 γ_3 , CK1 δ a CK1 ϵ a lišících se molekulovou hmotností v rozsahu 38 – 53 kDa (Giamas, 2007; Cheong, 2011). N-terminální kinázové domény jednotlivých izoform CK1 jsou homologní z 53 – 98 %, zatímco C-terminální domény se významně liší. Mezi doménami se nachází katalytická štěrba pro vazbu ATP a substrátu (Cheong, 2011). CK1 využívají jako donor fosfátu výhradně ATP (Knippschild, 2005). Regulace CK1 není založena na fosforylaci aktivační smyčky, ale může být zprostředkována PKA fosforylací (Cheong, 2011), jejímž příkladem je fosforylace CK1 δ na Ser³⁷⁰ (Giamas, 2007), dále asociací CK1 s regulačními proteiny 14-3-3 (Clokie, 2009) nebo autoinhibicí (Cheong, 2011).

CK1 jsou exprimovány ve všech tkáních (Knippschild, 2005) a jejich hlavní funkcí je regulace buněčné proliferace, DNA reparační a rekombinace a apoptózy (Giamas, 2007).

CK2 je tetramer složený ze dvou katalytických podjednotek CK2 α (42 kDa) nebo CK2 α' (38 kDa) a dvou regulačních podjednotek CK2 β (28 kDa) (Yao, 2012; Ahmad, 2008). Asociací podjednotek mohou vzniknout tři různé izoformy CK2 označované $\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha'\beta\beta$ a $\alpha'\alpha'\beta\beta$ (Yao, 2012). CK2 je na rozdíl od CK1 schopná využít jako donor fosfátu nejen ATP, ale také GTP (Litchfield, 2003). Na regulaci CK2 se podílí různé mechanismy, které zahrnují například regulovanou expresi a asociaci podjednotek CK2. Další možností regulace CK2 je interakce s molekulami, jejímž příkladem je interakce s Pin1. V případě některých mechanismů regulace se na aktivaci CK2 podílí fosforylace CK2, avšak některé mechanismy fosforylaci nepotřebují (Litchfield, 2003).

CK2 je exprimována ve všech lidských tkáních (Yao, 2012), přičemž k její nadměrné expresi dochází v nádorových a leukemických buňkách (Graham, 2000). Význam CK2 spočívá zejména v buněčném růstu a proliferaci ale také například v supresi apoptózy (Ahmad, 2008).

1.2.6. Tau tubulin kinázy (TTBK)

TTBK zahrnuje dvě izoformy označované TTBK1 a TTBK2 (Kitano-Takahashi, 2007). TTBK1 je složena z 1321 aminokyselin a tvoří N-terminální kinázovou doménu obsahující P-smyčku a α C-helix, dále polyglutamátovou doménu a C-terminální doménu obsahující Asp-Phe-Gly motiv a aktivační smyčku (Kiefer, 2014). TTBK2 je složena z 1244 aminokyselin. Kinázové domény TTBK1 a TTBK2 dosahují 88% sekvenční homologie (Ikezu, 2014).

TTBK1 se vyskytuje v mozku, především v cytoplasmě kortikálních a hipokampálních neuronů (Sato, 2006). TTBK2 je exprimována v mozku, zejména v Purkyňových buňkách mozečku, granulárních buňkách, hipokampu, středním mozku a substantia nigra (Houlden, 2007) i v dalších tkáních zahrnujících například srdeční a svalovou tkáň, thymus, slezinu a ledviny (Bouskila, 2011). TTBK1 je významná zejména pro aktivaci CDK5 a GSK-3 β . TTBK2 se podílí například na embryogenezi, dále se uplatňuje při regulaci mitózy nebo při přežívání buněk (Ikezu, 2014).

1.2.7. Fosforyláza kinázy (PhK)

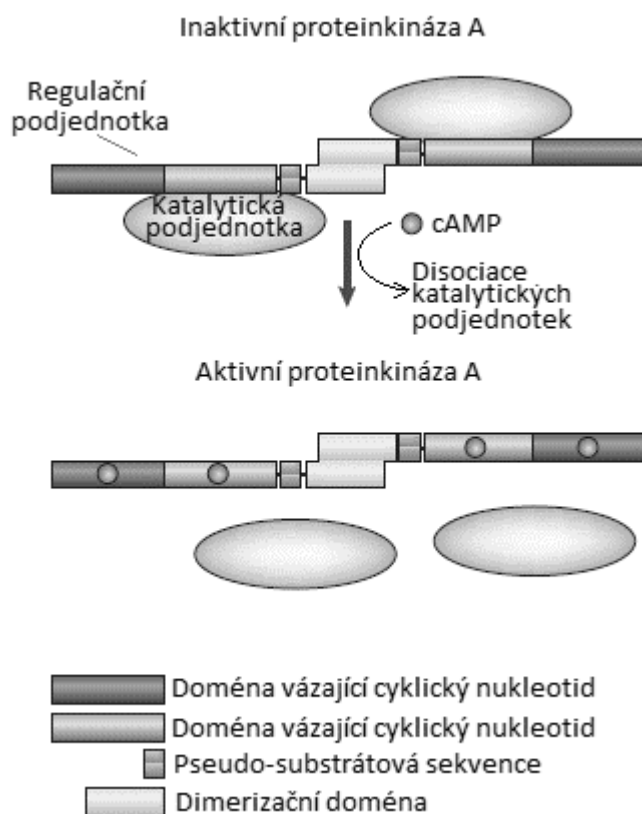
PhK obsahuje katalytickou podjednotku γ a tři regulační podjednotky označované α , β a δ . V molekule PhK se vyskytují čtyři molekuly každé ze zmíněných podjednotek a celková molekulová hmotnost dosahuje 1300 kDa (Brushia, 1999). PhK je Ca²⁺-dependentní enzym, jehož aktivace je umožněna zejména fosforylací prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinázy (Paudel, 1993).

PhK je exprimována zejména v kosterním svalu, dále například v srdečním svalu a mozkové tkáni (Chamberlain, 1987). Význam PhK spočívá zejména v regulaci glykogenolýzy. PhK přítomná v mozkové tkáni se podílí na regulaci nervových funkcí (Paudel, 1993).

1.2.8. Proteinkinázy A (PKA)

PKA je heterotetramer tvořící dvě izoformy označované PKA typu I a PKA typu II, které jsou složeny ze dvou stejných katalytických podjednotek a dvou stejných regulačních podjednotek (Del Gobbo, 2016). Katalytické podjednotky jsou označovány C α , C β a C γ a umožňují vazbu MgATP a substrátu (Skalhegg, 1997). Isoformy PKA typu I obsahují regulační podjednotky R1A nebo R1B a izoformy PKA typu II jsou složeny z regulačních podjednotek R2A nebo R2B (Del Gobbo, 2016). PKA je cAMP-dependentní proteinkináza,

jejíž aktivace je založena na oddělení dvou katalytických podjednotek od dimeru regulačních podjednotek v přítomnosti cAMP. Základem je vazba cAMP na dvě místa lokalizovaná na každé regulační podjednotce, v jejímž důsledku dochází k disociaci za vzniku dimeru regulačních podjednotek a dvou aktivních katalytických podjednotek (Skalhegg, 1997). Na Obrázku 3 je schematicky znázorněna struktura a aktivace PKA (Rehmann, 2007).



Obrázek 3 Schematické znázornění struktury a aktivace proteinkinázy A (Rehmann, 2007, modifikováno)

PKA se vyskytuje ve všech savčích buňkách (Taylor, 2012). Regulační podjednotky R1A a R2A se nachází ve všech tkáních. Pro regulační podjednotku R1B je charakteristický výskyt v mozkové tkáni a lymfocytech. Regulační podjednotka R2B se vyskytuje zejména v mozkové a tukové tkáni (Del Gobbo, 2016). PKA se podílí například na regulaci buněčné diferenciace, proliferace a paměti (Taylor, 2012).

1.2.9. Proteinkinázy B (PKB)

PKB zahrnuje tři lidské izoformy označované PKB α , PKB β a PKB γ (Nicholson, 2002). Isoformy PKB obsahují N-terminální doménu, centrální kinázovou doménu a C-terminální regulační doménu (Hanada, 2004). Předpokladem pro aktivaci PKB je například působení

hormonů nebo růstových faktorů. Aktivace PKB je zprostředkována fosforylací Thr³⁰⁸ následovanou další fosforylací místa lokalizovaného v regulační doméně (Nicholson, 2002).

Izoformy PKB α a PKB β se vyskytují ve všech tkáních. PKB β se vyskytuje zejména v tukové tkáni a kosterním svalu. PKB γ se nachází především v mozkové tkáni (Hanada, 2004). PKB se podílí zejména na regulaci imunitních procesů, dále například na regulaci buněčné proliferace a apoptózy, případně tumorigenezi (Dhawan, 2002). Důležitou vlastností PKB je také schopnost fosforylovat GSK-3 (Didichenko, 1996).

1.2.10. Proteinkinázy C (PKC)

PKC zahrnuje u savců 12 izoform dělených do tří podskupin označovaných klasické PKC obsahující izoformy α , β_I , β_{II} a γ , dále nové PKC zahrnující izoformy δ , ϵ , η , a θ a poslední podskupinou jsou atypické PKC s izoformami ζ a λ/ι (Alkon, 2007). Struktura charakteristická pro všechny izoformy PKC obsahuje C-terminální katalytickou doménu a N-terminální regulační doménu, která zahrnuje C1 motivy vázající fosfatidylserin a diacylglycerol a C2 doménu umožňující vazbu Ca²⁺ (Xu, 2004). Pro aktivaci klasických PKC je nezbytná přítomnost Ca²⁺ a diacylglycerolu, zatímco aktivace nových PKC vyžaduje pouze diacylglycerol. Aktivace atypických PKC je umožněna prostřednictvím klasických, případně nových PKC (Koivunen, 2006).

Izoformy PKC se vyskytují ve všech tkáních (Koivunen, 2006) a plní významné funkce v buňkách imunitního systému, a to zejména v lymfocytech, mastocytech a makrofázích (Xu, 2004). PKC se podílí nejen na regulaci růstu a proliferace buněk, ale také například na regulaci buněčné smrti (Freeley, 2011).

1.2.11. Src tyrosin kinázy (Src)

Src exprimované v centrálním nervovém systému zahrnují Src, Fyn, Lck, Lyn a Yes (Scales, 2011). Struktura kináz rodiny Src zahrnuje C-terminální doménu, kinázovou doménu, linker, dále SH2 doménu, SH3 doménu a N-terminální doménu (Parsons, 2004). Předpokladem pro aktivaci Src je například působení růstových faktorů. Src mohou být dále aktivovány prostřednictvím defosforylace Tyr⁵²⁷ příslušnou fosfatázou, případně vazbou určitých proteinů na SH2 nebo SH3 doménu (Brown, 1996).

Kinázy Src, Fyn a Yes se vyskytují ve všech tkáních, zatímco pro kinázu Lck je charakteristická exprese v mozkové tkáni a T-lymfocytech a kináza Lyn se nachází zejména

v mozkové tkáni a B-lymfocytech. Významnou funkcí rodiny Src je například regulace buněčného růstu a diferenciaci nebo přežívání buněk (Parsons, 2004).

1.3. Metody detekce fosforylovaných proteinů

Pro detekci fosforylovaných proteinů lze využít řadu metod, jejichž přehled je uveden v Tabulce 4. Každá z těchto metod je vhodná pro určitý typ analýz a má své přednosti, případně zápory.

Tabulka 4 Přehled metod detekce fosforylovaných proteinů (Jia, 2012; Bahk, 2013; Iliuk, 2012; Jabbari, 2014; Qiao, 2007)

Metody detekce fosforylovaných proteinů	
Radioaktivní značení fosfoproteinů izotopem ^{32}P nebo ^{33}P	
Metody využívající fosfo-specifické protilátky	
Metody pro barvení/značení fosfoproteinů	Stains-All
	Pro-Q Diamond
	Phos-tag
	pIMAGO
Metody pro obohacení a analýzu fosforylovaných proteinů/peptidů	Metoda obohacení fosfoproteinů pomocí imunoprecipitace
	Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (IMAC)
	IMAC se sekvenční elucí (SIMAC)
	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)
	Afinitní elektroforéza na imobilizovaných iontech kovů (IMAEP)
	Afinitní chromatografie na TiO_2
	Afinitní chromatografie na ZrO_2
	Obohacení fosfopeptidů na destičce
	PolyMAC
Iontově výměnná chromatografie na silném katexu (SCX) a silném anexu (SAX)	
Hmotnostní spektrometrie (MS)	

1.3.1. Radioaktivní značení fosfoproteinů izotopem ^{32}P nebo ^{33}P

Pro vysoce senzitivní detekci fosforylovaných proteinů je vhodné jejich radioaktivní značení izotopem anorganického fosforu ^{32}P nebo ^{33}P . Princip metody je založen na kinázami zprostředkovaném přenosu fosforylových skupin obsahujících tyto izotopy na proteiny (Jia, 2012), následné separaci vzniklých fosfoproteinů pomocí 1D nebo 2D gelové elektroforézy (Delom, 2006) a autoradiografické detekci (Jia, 2012; Delom, 2006).

Tvorba fosfoproteinů se začleněným izotopem ^{32}P je *in vitro* umožněna inkubací s $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Funchal, 2003), zatímco pro utváření značených fosfoproteinů *in vivo* je nezbytná inkubace buněk s $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ortofosfátem}$ (Smal, 2006). Příklad značení fosfoproteinů

in vivo popisuje metoda diferenciálního značení fosfoproteinů (DIPPL), jejíž princip je založen na odlišném značení buněk v závislosti na aktivitě určité kinázy. V případě inaktivní kinázy jsou buňky značeny ^{32}P . Pokud je kináza aktivní, jsou buňky označeny ^{33}P . Po smíchání buněčných extraktů jsou pomocí 2D gelové elektroforézy, využívající v první dimenzi izoelektrickou fokusaci na imobilizovaném pH gradientu a ve druhé dimenzi polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), proteiny separovány. Detekce emise izotopu ^{32}P i ^{33}P umožňuje zobrazení proteinů značených oběma izotopy. Použití dvou acetátových fólií umístěných mezi gelem a detekční deskou způsobuje selektivní blokaci emise ^{33}P (Wytttenbach, 2006). Je důležité zmínit, že fosforylační místa proteinů se mohou lišit při fosforylaci *in vitro* a *in vivo* (Delom, 2006).

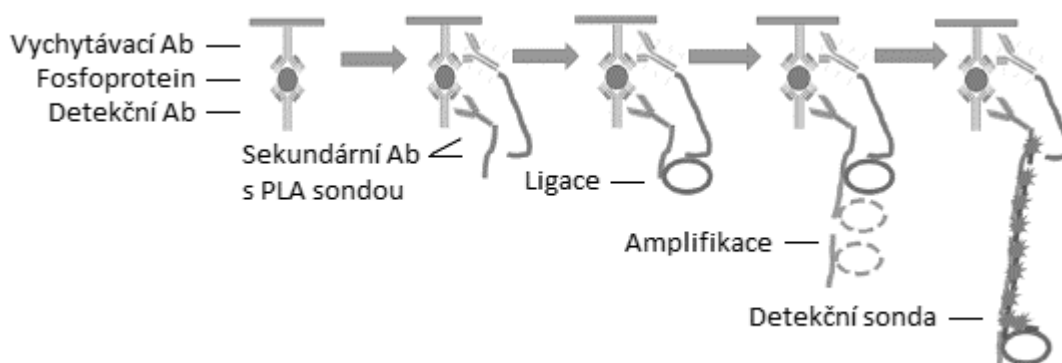
Radioaktivní značení fosfoproteinů pomocí ^{32}P především v kombinaci s metodami hmotnostní spektrometrie a Edmanova sekvenování umožňuje analýzu a přesné určení fosforylačních míst fosfoproteinů (Campbell, 2002). Nevýhody radioaktivního značení fosfoproteinů zahrnují zejména práci s nebezpečným radioaktivním materiálem (Iliuk, 2012). Proto byla vyvinuta metoda, která kombinuje značení fosfátové skupiny fosfoproteinů pomocí stabilního izotopu $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{ATP}$ s hmotnostní spektrometrií a je vhodná pro specifickou a kvantitativní analýzu fosforylačních míst bez nutnosti využití radioizotopu (Molden, 2014).

1.3.2. Metody využívající fosfo-specifické protilátky

Dalším přístupem pro senzitivní detekci fosfoproteinů je využití protilátek rozpoznávajících fosforylované formy serinu, threoninu nebo tyrosinu (Kaufmann, 2001), případně protilátek proti specifickým fosforylovaným aminokyselinám konkrétních proteinů (Bertrand, 2010). Metody využívající fosfo-specifické protilátky zahrnují například přenosové techniky s imunochemickou detekcí. Provedení westernového přenosu je založeno na separaci fosfoproteinů pomocí SDS-PAGE nebo 2D gelové elektroforézy a následném přenosu na nitrocelulósovou (NC) nebo polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu. Po blokaci mohou být membrány inkubovány se specifickou monoklonální nebo polyklonální primární protilátkou. V dalším kroku jsou membrány inkubovány se sekundární protilátkou značenou nejčastěji křenovou peroxidázou (HRP). Vizualizaci fosfoproteinů umožňuje detekce chemiluminiscence. (Petry, 2014; Bertrand, 2010; Kaufmann, 2001; Goedert, 1994).

Vysoce senzitivní kvantifikaci specifické fosforylace proteinů v komplexních vzorcích umožňuje metoda ELISA-PLA, jejíž schematické uspořádání je znázorněno na Obrázku 4. Metoda je založena na sendvičovém komplexu tvořeném imobilizovanou vycytávací

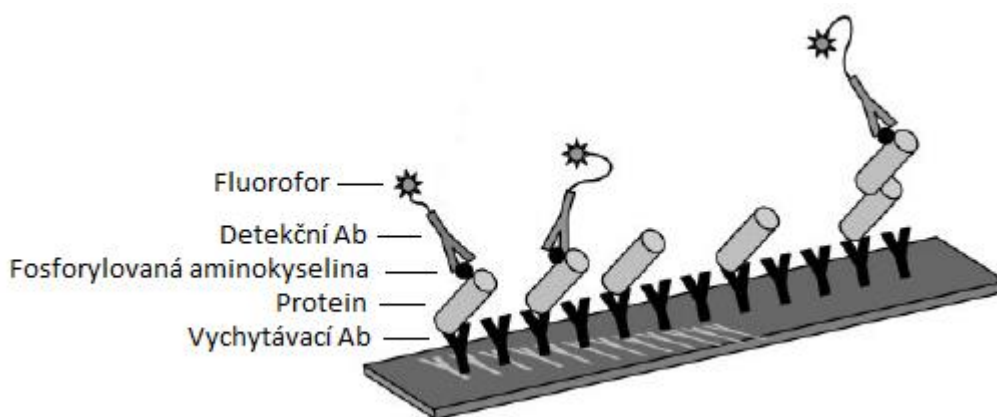
protilátkou proti danému antigenu, navázaným proteinem a detekční fosfo-specifickou protilátkou. K oběma sekundárním protilátkám je připojena odlišná PLA sonda (oligonukleotid) a následuje DNA hybridizace a ligace, amplifikace signálu a detekce pomocí značené detekční sondy (Tong, 2016).



Obrázek 4 Metoda ELISA-PLA, Ab – protilátka (Tong, 2016, modifikováno)

Metoda pro detekci fosfoproteinů v buňkách pomocí imunofluorescenční mikroskopie využívá fosfo-specifické primární protilátky a sekundární protilátky značené fluoroforem (Bertrand, 2010).

Byla popsána také metoda využívající mikročip pro detekci fosfoproteinů za účasti specifických protilátek (Obrázek 5). Principem metody je imobilizace protilátek rozpoznávajících určité proteiny na mikročip, který je poté inkubován s buněčným extraktem obsahujícím sledované fosfoproteiny a následně s fluorescenčně značenými protilátkami proti fosforylovaným aminokyselinám, například fosfotyrosinu. Výhodou zmíněného uspořádání metody je nízká spotřeba reagentů a možnost automatizace (Gembitsky, 2004).



Obrázek 5 Schéma mikročipu pro detekci fosfoproteinů za účasti specifických protilátek, Ab – protilátka (Gembitsky, 2004, modifikováno)

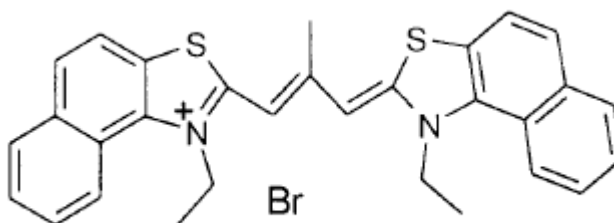
Hlavní výhodou všech metod využívajících fosfo-specifické protilátky je vysoká specifita a senzitivita závislá především na kvalitě používaných protilátek (Jia, 2012). Nevýhodou je vysoká cena těchto protilátek (Iliuk, 2012).

1.3.3. Metody pro barvení/značení fosfoproteinů

Komerčně dostupné techniky pro barvení/značení fosfoproteinů umožňující posouzení celkové míry fosforylace proteinů zahrnují čtyři odlišné metody označované Stains-All, Pro-Q Diamond, Phos-tag a pIMAGO (Iliuk, 2012).

Metoda barvení fosfoproteinů pomocí Stains-All

Barvivo Stains-All obsahující kationické karbokyaniny (Green, 1973) je znázorněno na Obrázku 6 (Kovalska, 2002) a je vhodné pro detekci fosfoproteinů separovaných na polyakrylamidovém gelu (Green, 1973). Princip metody spočívá v modrém zbarvení velmi kyselých proteinů zahrnujících fosfoproteiny a proteiny vázající Ca^{2+} , ale také nukleových kyselin DNA a RNA. Pro méně kyselé proteiny je charakteristické červené zbarvení (Steinberg, 2003).



Obrázek 6 Struktura barviva Stains-All (Kovalska, 2002)

Hlavní nevýhody při barvení fosfoproteinů pomocí barviva Stains-All jsou nízká senzitivita a nedostatečná stabilita na světle (Goldberg, 1997). Pro odstranění těchto nedostatků byla vyvinuta metoda kombinující barvení fosfoproteinů po separaci na polyakrylamidovém gelu pomocí Stains-All s následnou inkubací v roztoku dusičnanu stříbrného (Myers, 1996). Zatímco samotné barvení Stains-All umožňuje detekci fosfoproteinů v množství menším než 100 ng, kombinace Stains-All s inkubací v dusičnanu stříbrném umožňuje detekci méně než 1 ng fosfoproteinů (Goldberg, 1997). Optimalizace postupu provedení metody Stains-All vedla nejen ke zvýšení senzitivity s možností detekce fosfoproteinů v množství až 0,5 – 1 ng, ale také ke zvýšení selektivity, rychlosti provedení metody a stability barvení na světle (Cong, 2013).

Metoda barvení fosfoproteinů pomocí Pro-Q Diamond

Metoda Pro-Q Diamond je vhodná pro detekci proteinů, které obsahují fosforylovanou formu serinu, threoninu nebo tyrosinu (Steinberg, 2003). Principem barvení pomocí Pro-Q Diamond je nekovalentní vazba tohoto ligandu na fosfátovou skupinu fosfoproteinů (Goodman, 2004). Metoda je založena na separaci fosfoproteinů pomocí SDS-PAGE nebo 2D gelové elektroforézy, následné fixaci, inkubaci gelu v barvicím roztoku a jeho odbarvení. Vizualizaci fosforylovaných proteinů umožňuje detekce fluorescence, jejíž intenzita souvisí s mírou fosforylace proteinů. Pro-Q Diamond má excitační maximum při vlnové délce 555 nm a emisní maximum při 580 nm. Fosfoproteiny je možné při tomto uspořádání metody kvantifikovat v rozsahu 1 ng – 1 µg (Steinberg, 2003). Barvení Pro-Q Diamond je vhodné také pro detekci fosfoproteinů, které byly separovány pomocí elektroforézy a následně transferovány na PVDF nebo NC membránu. Mez detekce fosfoproteinů se v tomto případě pohybuje v rozmezí 2 – 4 ng (Goodman, 2004). Hlavní výhody metody Pro-Q Diamond zahrnují vysokou fosfo-specificitu a senzitivitu (Steinberg, 2003), rychlost a snadné provedení metody (Steinberg, 2003; Goodman, 2004).

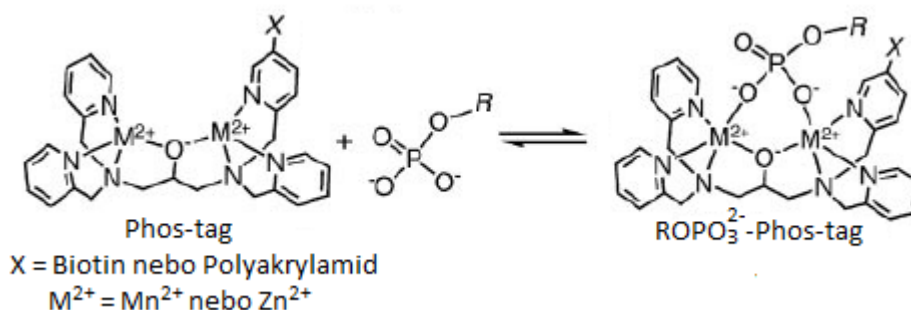
Metodu Pro-Q Diamond je možné provést v kombinaci s barvením SYPRO Ruby, které umožňuje detekci celkových proteinů a poměr signálů získaných z obou metod tedy poskytuje informaci o míře fosforylace proteinů vzhledem k jejich množství (Schulenberg, 2003). Metoda Pro-Q Diamond je také kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (Steinberg, 2003).

Metoda označovaná jako detekce fluorescence ve zkumavce (FDIT) využívá barvení Pro-Q Diamond pro vysoce specifickou a senzitivní detekci fosfoproteinů. Princip metody spočívá v inkubaci roztoku fosforylovaného proteinu s Pro-Q Diamond ve zkumavce za tmy a následné peletaci fosfoproteinu s navázaným Pro-Q Diamond chladným acetonem. Po centrifugaci je odstraněn supernatant obsahující nenavázaný Pro-Q Diamond. Peleta je poté rozpuštěna ve vodě a umístěna na černou mikrotitrační destičku ke změření fluorescence. Výhodou metody FDIT je nízká spotřeba reagensů, vysoká reprodukovatelnost a rychlost provedení metody (Jin, 2016).

Metodu Pro-Q Diamond je možné použít také ve spojení s mikročipy pro selektivní a senzitivní detekci a kvantifikaci celkové fosforylace proteinů. Mez detekce fosfoproteinů závisí na množství fosforylovaných aminokyselin a pohybuje se v rozmezí 312 – 625 fg (Martin, 2003).

Metoda značení fosfoproteinů pomocí Phos-tag

Phos-tag je označení pro alkokidem přemostěné dvoujaderné kovové komplexy, které obsahují Zn^{2+} nebo Mn^{2+} ionty (Kinoshita, 2015; Kinoshita, 2006) a umožňují detekci přítomných fosforylovaných forem serinu, threoninu, tyrosinu nebo histidinu fosfoproteinů (Barbieri, 2008). Na Obrázku 7 je znázorněna struktura molekuly Phos-tag a vazba fosfátové skupiny fosfoproteinů. Princip separace fosfoproteinů na gelu pomocí SDS-PAGE je založen na využití Mn^{2+} -Phos-tagů navázaných na polyakrylamid, které umožňují vazbu fosfátu fosfoproteinů (Kinoshita, 2006). Další možnost provedení metody je založena na transferu elektroforeticky separovaných fosfoproteinů na PVDF membránu a využití biotinylovaného Zn^{2+} -Phos-tagu, který umožňuje vazbu fosfátové skupiny fosfoproteinů. Prostřednictvím streptavidinu konjugovaného s HRP je následně umožněna chemiluminiscenční detekce. Výhodnou zmíněného postupu je dosažení senzitivní a specifické detekce fosfoproteinů (Kinoshita, 2006).



Obrázek 7 Struktura molekuly Phos-tag a znázornění záchytu fosfátové skupiny fosfoproteinů (Kinoshita, 2006, modifikováno)

Pro separaci a detekci izoform fosfoproteinů se stejným počtem fosfátových skupin je vhodné využití SDS-PAGE s Mn^{2+} -Phos-tagy navázanými na polyakrylamid s následným westernovým přenosem a detekcí pomocí fosfo-specifických protilátek (Kinoshita, 2008). Modifikace metody SDS-PAGE s Mn^{2+} -Phos-tagy a s následným westernovým přenosem umožňuje také rychlou separaci a detekci izotypů fosfoproteinů o molekulové hmotnosti větší než 200 kDa (Kinoshita, 2009).

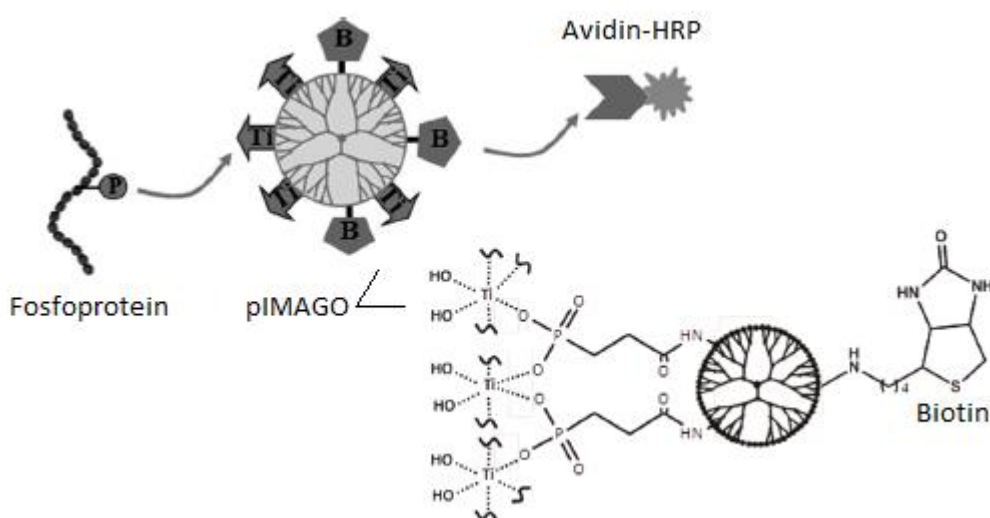
Metoda SDS-PAGE s Mn^{2+} -Phos-tagy navázanými na polyakrylamid v prostředí zásaditého pH je ovšem vhodná pouze pro separaci určitých fosfoproteinů. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda SDS-PAGE s Zn^{2+} -Phos-tagy v prostředí neutrálního pH Bis-Tris pufru s následným barvením pomocí SYPRO Ruby nebo westernovým přenosem a využitím fosfo-specifických protilátek (Kinoshita, 2011). Tato metoda ovšem není vhodná

pro detekci fosfoproteinů o vysoké molekulové hmotnosti, proto byla popsána metoda SDS-PAGE s Zn^{2+} -Phos-tagy v prostředí neutrálního pH pufru Tris-kyselina octová. Oba výše zmíněné pufrы lze využít také při provedení dvourozměrné fluorescenční diferenční gelové elektroforézy (2D fluorescence DIGE), která je kombinací klasické SDS-PAGE v první dimenzi a SDS-PAGE s Zn^{2+} -Phos-tagy v prostředí neutrálního pH v dimenzi druhé (Kinoshita, 2012).

Komerčně dostupné SuperSep Phos-tag gely o neutrálním pH a s navázanými Zn^{2+} -Phos-tagy jsou vhodné pro SDS-PAGE v kombinaci nejen s Tris-glycinovým, ale také s Tris-tricinovým elektroforetickým pufrem. Výhodou použití druhého zmíněného pufru je možnost dosažení lepší detekce fosforylovaných peptidů a proteinů o nízké molekulové hmotnosti, a to v rozsahu 8,8 – 35 kDa (Kinoshita-Kikuta, 2012).

Metoda značení fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO

Vysoce specifickou detekci a kvantifikaci celkové fosforylace proteinů umožňuje metoda založená na využití solubilního nanopolymeru (dendrimeru) na bázi polyamidoaminu označovaného pIMAGO, který obsahuje jednak Ti^{4+} ionty nezbytné pro selektivní vazbu fosfátových skupin fosfoproteinů, ale také biotinové skupiny potřebné pro senzitivní detekci nejčastěji na principu spektrometrie nebo chemiluminiscence. Struktura reagensie pIMAGO je znázorněna na Obrázku 8. Metodou pIMAGO lze detekovat fosfoproteiny v množství menším než 100 pg (Iliuk, 2011; Iliuk, 2012).



Obrázek 8 Struktura reagensie pIMAGO a znázornění principu provedení metody (Iliuk, 2011; Iliuk, 2012, modifikováno)

Metoda pIMAGO může být provedena v uspořádání na mikrotitrační destičce. Princip metody je založen na imobilizaci fosforylovaných proteinů na povrch jamek destičky prostřednictvím pasivní adsorpce a následné blokaci neobsazených míst. Vazba reagensie pIMAGO na fosfátové skupiny imobilizovaných fosfoproteinů je poté zprostředkována Ti^{4+} ionty. Následně biotinové skupiny navázané reagensie pIMAGO umožňují vazbu nejčastěji HRP konjugované s avidinem, přičemž je detekce provedena po přidání chromogenního nebo chemiluminiscenčního substrátu. Další možností je vazba fluoroforu konjugovaného s avidinem umožňující fluorescenční detekci (Iliuk, 2011; Iliuk, 2015).

Detekce fosforylovaných proteinů pomocí dendrimeru pIMAGO může být provedena také v uspořádání na membráně po westernovém přenosu. Metoda je založena na separaci fosfoproteinů pomocí SDS-PAGE a jejich přenosu na PVDF nebo NC membránu. Následuje blokace membrány, vazba reagensie pIMAGO na fosfátové skupiny fosfoproteinů a chemiluminiscenční, případně fluorescenční detekce (Iliuk, 2012; Iliuk, 2015).

1.3.4. Metody pro obohacení a analýzu fosforylovaných proteinů/peptidů

Pro zvýšení senzitivity detekce fosfoproteinů a fosfopeptidů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) je v některých případech nezbytné jejich předchozí obohacení. Důvodem je zejména malé množství a nedostatečná účinnost ionizace fosfoproteinů a fosfopeptidů ve srovnání s nefosforylovanými proteiny a peptidy (Tichy, 2011).

Metoda obohacení fosfoproteinů pomocí imunoprecipitace

Metoda pro izolaci a obohacení proteinů fosforylovaných na tyrosinu je založena na imunoprecipitaci s využitím protilátek proti fosfotyrosinu imobilizovaných na agarózových kuličkách a následné eluci navázaných fosfoproteinů pomocí fenylfosfátu (Steen, 2002). Zvýšení selektivity a senzitivity imunoprecipitace proteinů fosforylovaných na tyrosinu lze dosáhnout použitím imunoprecipitačního pufru, který obsahuje definované množství neiontového detergentu n-oktyl glukosidu (Zhang, 2006). Obohacení proteinů fosforylovaných na serinu nebo threoninu pomocí imunoprecipitačních metod bylo komplikované z důvodu nedostatku protilátek proti fosfoserinu a fosfothreoninu, nicméně již bylo popsáno několik fosfoserin a fosfothreonin specifických protilátek, které lze k tomuto účelu použít (Grønborg, 2002).

Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů

Metoda afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (IMAC) je vhodná pro obohacení fosfopeptidů a fosfoproteinů před hmotnostní spektrometrií (Thingholm, 2009; Machida, 2007). Principem metody je vznik koordinační vazby mezi imobilizovaným kovovým iontem, kterým může být Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+} nebo Zn^{2+} a elektron donorovou fosfátovou skupinou fosfoproteinů. Imobilizace kovových iontů je zprostředkována ligandem, který je kovalentně vázaný na nosiči na bázi agarózy nebo pryskyřice. Příkladem používaných ligandů je kyselina iminodioctová a kyselina nitriloctová. Eluce navázaných fosfoproteinů je umožněna fosfátovým pufrům o alkalickém pH (Machida, 2007; Thingholm, 2009; Posewitz, 1999). Metoda IMAC může být v off-line uspořádání na mikrokolonkách v pipetových špičkách nebo v kolonkách pro HPLC, což umožňuje rychlé, selektivní a reprodukovatelné obohacení fosfoproteinů pro následnou analýzu a identifikaci (Ruprecht, 2015). Pro detekci malých množství fosfoproteinů je z důvodu omezení ztrát vzorku vhodné on-line spojení kolonek IMAC s hmotnostním spektrometrem (Nuwaysir, 1993).

Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů se sekvenční elucí

Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů se sekvenční elucí (SIMAC) je další metoda pro obohacení fosfopeptidů, která využívá IMAC mikrokolonky a umožňuje sekvenční separaci monofosforylovaných peptidů a mnohonásobně fosforylovaných peptidů přítomných v biologických vzorcích. Princip metody je založen na eluci monofosforylovaných peptidů za kyselých podmínek, zatímco eluce mnohonásobně fosforylovaných peptidů je možná za bazických podmínek (Thingholm, 2008). Vysoce specifického obohacení fosfopeptidů lze dosáhnout kombinací tří metod, které zahrnují TiO_2 obohacení fosfopeptidů, následnou sekvenční separaci monofosforylovaných peptidů a mnohonásobně fosforylovaných peptidů pomocí SIMAC a frakcionaci monofosforylovaných peptidů pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) (Engholm-Keller, 2012).

Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) umožňuje selektivní obohacení fosfopeptidů. Metoda je založena na tvorbě vodíkových vazeb mezi peptidy a hydrofilní stacionární fází. Vzhledem k tomu, že retence peptidů závisí na jejich hydrofilních vlastnostech, je retence fosfopeptidů z důvodu přítomnosti silně hydrofilních fosfátových

skupin větší než v případě peptidů nefosforylovaných. Eluci zajišťuje mobilní fáze o zvyšující se polaritě. Vysoké selektivity lze dosáhnout následným obohacením fosfopeptidů pomocí metody IMAC (McNulty, 2008).

Afinitní elektroforéza na imobilizovaných iontech kovů

Afinitní elektroforéza na imobilizovaných iontech kovů (IMAEP) je vhodná pro obohacení fosfoproteinů přítomných v biologických vzorcích. Metoda je založena na využití FeCl_3 , který je imobilizován v polyakrylamidovém gelu během jeho polymerace a je nezbytný pro zachycení fosfoproteinů. Následně je provedena separace zachycených fosfoproteinů pomocí elektroforézy a jejich eluce prostřednictvím elučního pufru s obsahem uhličitanu sodného a pomocí elektroeluce (Jabbari, 2014).

Afinitní chromatografie na oxidu titaničitém

Afinitní chromatografie na oxidu titaničitém (TiO_2) umožňuje selektivní obohacení a izolaci fosfopeptidů. Metoda je založena na zachycení fosfopeptidů na sférických částicích oxidu titaničitého za kyselých podmínek, například v přítomnosti kyseliny octové. Eluce fosfopeptidů z kolonky je poté umožněna bazickým elučním pufrem s obsahem hydrogenuhličitanu amonného (Pinkse, 2004). Pro zvýšení selektivity zachycení fosfopeptidů na mikrokolkách s TiO_2 lze použít kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou (2,5-DHB) (Larsen, 2005; Thingholm, 2006) nebo roztok kyseliny ftalové obsahující acetonitril a kyselinu trifluoroctovou. Eluce monofosforylovaných i mnohonásobně fosforylovaných peptidů je následně umožněna pomocí bazického elučního pufru obsahujícího hydroxid amonný (Thingholm, 2006). Výhodou této obohacovací metody je rychlé provedení a možnost automatizace (Pinkse, 2004).

Afinitní chromatografie na oxidu zirkoničitém

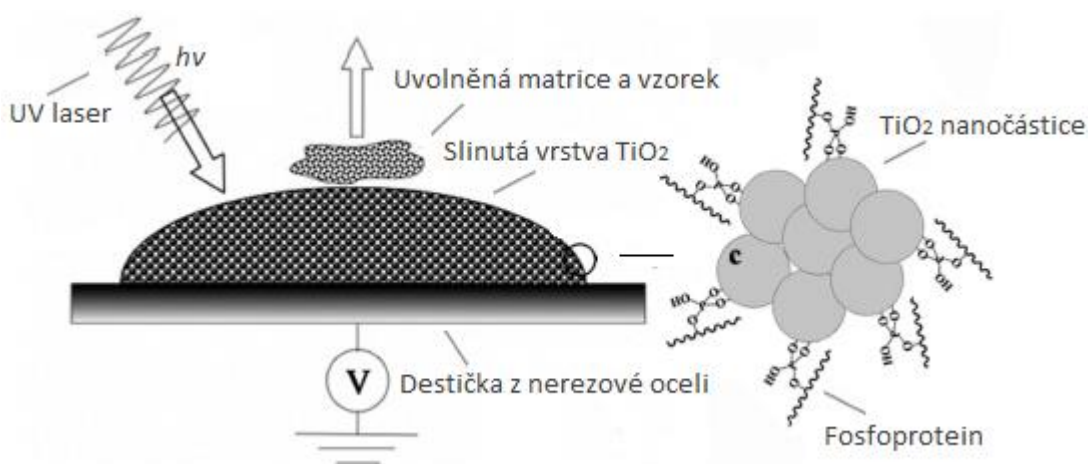
Afinitní chromatografie na oxidu zirkoničitém (ZrO_2) umožňuje vysoce selektivní obohacení a izolaci zejména monofosforylovaných peptidů. Naopak vyšší selektivitu pro obohacení mnohonásobně fosforylovaných peptidů vykazuje výše zmíněná afinitní chromatografie na TiO_2 (Kweon, 2006). Specifické obohacení fosfopeptidů lze provést také s využitím nanočástic ZrO_2 . Metoda je založena na inkubaci produktů štěpení fosfoproteinů zředěných kyselým pufrem s obsahem kyseliny octové a acetonitrilu s nanočásticemi ZrO_2 , přičemž jsou fosfopeptidy zachyceny na těchto nanočásticích. Po centrifugaci a odstranění supernatantu lze zachycené fosfopeptidy eluovat pomocí sonikace v přítomnosti bazického

elučního pufru obsahujícího hydroxid amonný. Výhodou použití nanočástic ZrO_2 je větší specifický povrch ve srovnání s mikročásticemi a s tím související větší kapacita pro vzorek (Zhou, 2007).

Obohacení fosfopeptidů na destičce

Metody pro obohacení fosfopeptidů přímo na destičce umožňující následnou detekci pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím laserové desorpce/ionizace za přítomnosti matrice a analyzátoru doby letu (MALDI-TOF MS) mají řadu výhod zahrnujících snadné a rychlé provedení, malou spotřebu vzorku a snížení jeho ztrát a nízkou mez detekce fosfopeptidů (Qiao, 2007; Eriksson, 2010; Zhou, 2006).

Metoda pro vysoce senzitivní a selektivní obohacení fosfopeptidů přímo na modifikované MALDI destičce (Obrázek 9) je založena na koordinační interakci mezi fosfátovou skupinou fosfopeptidů a slinutými nanočásticemi TiO_2 tvořícími spoty na destičce z nerezové oceli. Produkty štěpení fosfoproteinů jsou zředěny pufrům obsahujícím kyselinu 2,5-DHB a aplikovány na spoty, přičemž dochází k zachycení fosfopeptidů na nanočásticích TiO_2 . Po vymytí nefosforylovaných peptidů jsou zachycené fosfopeptidy eluovány za bazických podmínek pomocí vodného roztoku amoniaku. Kyselina 2,5-DHB slouží jako matrice pro MALDI-TOF MS analýzu fosfopeptidů (Qiao, 2007).



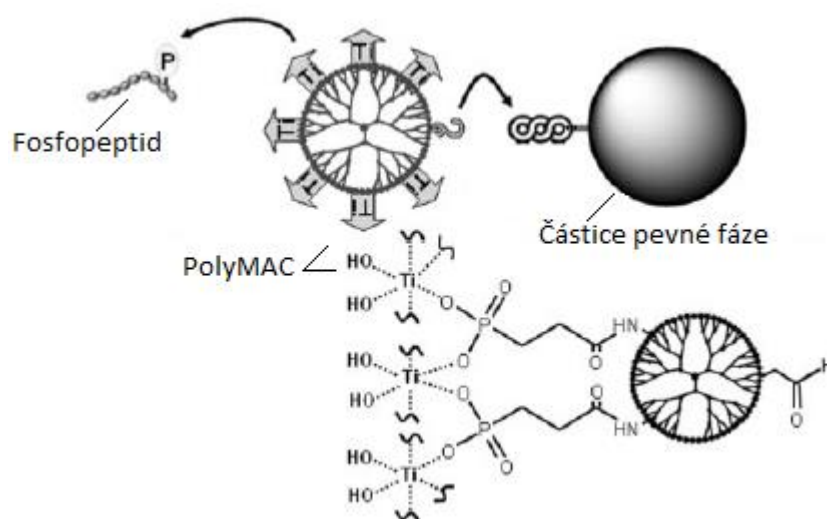
Obrázek 9 Schéma obohacovací metody na MALDI destičce modifikované nanočásticemi TiO_2 (Qiao, 2007, modifikováno)

Další metoda pro selektivní a senzitivní obohacení fosfopeptidů na modifikované destičce je založena na využití slinuté tenké mezoporézní vrstvy anatasu TiO_2 tvořící spoty na konduktivním skleněném povrchu a následné detekci na TiO_2 zachycených fosfopeptidů pomocí MALDI-TOF MS (Eriksson, 2010).

Vysoce specifické a senzitivní obohacení fosfopeptidů umožňuje také metoda využívající interakce mezi fosfátovou skupinou fosfopeptidů a fosfonátem zirkoničitým modifikující destičku z porézního křemíku. Produkty štěpení fosfoproteinů jsou zředěny kyselým pufrům obsahujícím acetonitril, kyselinu trifluoroctovou a NaCl a aplikovány na modifikovanou destičku, která umožňuje za těchto podmínek zachycení fosfopeptidů. Po vymytí nefosforylovaných peptidů je přidána matrice tvořená kyselinou 2,5-DHB a zachycené fosfopeptidy jsou detekovány pomocí MALDI-TOF MS (Zhou, 2006).

Afinitní zachycení na polymeru funkcionalizovaném kovovými ionty

Afinitní zachycení na polymeru funkcionalizovaném kovovými ionty (PolyMAC) je vhodnou metodou pro vysoce selektivní a senzitivní izolaci a obohacení fosforylovaných peptidů přítomných v komplexních vzorcích (Obrázek 10). Metoda je založena na využití solubilního nanopolymeru (dendrimeru) na bázi polyamidoaminu obsahujícího ionty Ti, které umožňují vazbu fosfátových skupin fosfopeptidů a aldehydické funkční skupiny, jejichž funkcí je zprostředkovat vazbu na pevnou fázi tvořenou například agarózovými nebo magnetickými kuličkami (Iliuk, 2010).



Obrázek 10 Schéma metody PolyMAC (Iliuk, 2010, modifikováno)

Iontově výměnná chromatografie na silném katexu a silném anexu

Iontově výměnná chromatografie na silném katexu (SCX) a silném anexu (SAX) jsou metody, které umožňují selektivní obohacení a separaci fosfopeptidů od nefosforylovaných peptidů na základě odlišného náboje a odpovídajících elektrostatických interakcí se stacionární fází (Villén, 2008; Han, 2008; Motoyama, 2007).

Princip metody SCX je založen na negativním náboji fosfátových skupin fosfopeptidů při kyselém pH o hodnotě 2,7. Za těchto podmínek jsou fosfopeptidy méně zadržovány na stacionární fázi tvořené například polysulfoethylem A a jsou tedy eluovány z kolony rychleji než nefosforylované peptidy (Villén, 2008).

Metoda SAX je založena na úplné ionizaci fosfátových skupin fosfopeptidů při slabě kyselém pH, zatímco karboxylové kyseliny nefosforylovaných peptidů jsou za těchto podmínek pouze částečně ionizovány. V důsledku většího negativního náboje jsou fosfopeptidy na stacionární fázi tvořené například částicemi POROS 20 HQ zadržovány více než nefosforylované peptidy (Han, 2008).

Obohacení fosfopeptidů umožňuje také chromatografie využívající iontově výměnnou pryskyřici, která je tvořena směsí anexu a katexu a umístěna v jedné koloně. Metoda je založena na zvýšeném zadržení kyselých fosfopeptidů v koloně, zatímco zadržení neutrálních a bazických peptidů je naopak mírně sníženo (Motoyama, 2007).

1.3.5. Hmotnostní spektrometrie se zaměřením na analýzu fosfopeptidů

Hmotnostní spektrometrie (MS) je založena na tvorbě iontů fosfopeptidů především pomocí laserové desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI), přičemž matricí je kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (2,5-DHB), nebo pomocí elektrosprejové ionizace (ESI) a následné separaci vzniklých iontů podle poměru jejich náboje a hmotnosti (m/z) nejčastěji prostřednictvím analyzátoru doby letu (TOF). U fosforylovaných peptidů je pozorován posun m/z o 80 hmotnostních jednotek oproti nefosforylované variantě peptidu (Janek, 2001). Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je založena na izolaci vybraného iontu a jeho kolizi za vzniku fragmentů, které jsou následně analyzovány. Metoda MS/MS umožňuje lokalizaci fosforylovaných aminokyselin u fosfopeptidů (Lund, 2001).

Senzitivní analýzu fosfoproteinů umožňuje spojení hmotnostní spektrometrie a 2D gelové elektroforézy, která kombinuje diskovou PAGE a izoelektrickou fokusaci na tenké vrstvě polyakrylamidového gelu (PAGIF). Po obarvení gelu metodou kompatibilní s MS, například Coomassie brilliant blue, jsou spoty obsahující vybrané fosfoproteiny vyříznuty, odbarveny a dehydratovány. Po tryptickém štěpení a extrakci následuje analýza pomocí MS (Mamone, 2003).

Detekce fosforylačních míst fosfoproteinů přítomných v komplexních vzorcích je umožněna spojením metod fragmentace fosfoproteinů s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Nejčastěji používanou metodou fragmentace fosfoproteinů je kolizně

indukovaná disociace (CID). Metoda je založena na srážkách protonovaných fosfopeptidů urychlených elektrickým potenciálem s inertním plynem, kterým může být například helium, dusík nebo argon. Díky vysoké nestabilitě fosfátové skupiny lokalizované na serinu a threoninu dochází k neutrálním ztrátám zejména H_3PO_4 o molekulové hmotnosti 98 Da a v menší míře také HPO_3 o molekulové hmotnosti 80 Da (Brown, 2015; Boersema, 2009).

Mezi další metody fragmentace fosfoproteinů patří disociace záchytem elektronů (ECD) (Shi, 2001), disociace přenosem elektronu (ETD) (Syka, 2004) a fotodisociace s využitím infračervených a ultrafialových laserů (Brodbeck, 2009).

Relativní kvantifikaci, sekvenování a také detekci fosforylačních míst fosfopeptidů umožňuje jejich značení stabilními izotopy v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Metoda je založena na značení tryptických fosfopeptidů prostřednictvím esterifikace jejich karboxylových skupin se stabilními izotopy, následném obohacení pomocí metody IMAC a analýze prostřednictvím tandemové hmotnostní spektrometrie (He, 2004).

Senzitivní identifikaci a kvantifikaci proteinů fosforylovaných na serinu a threoninu umožňuje také kombinace metody využívající izotopicky kódované afinitní tagy (PhIAT) a hmotnostní spektrometrie. Metoda PhIAT je založena na značení fosfoproteinů stabilními izotopy a následně biotinem, přičemž jsou značené fosfopeptidy vzniklé po proteolytickém štěpení izolovány pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném avidinu. Takto získané fosfopeptidy jsou separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a poté analyzovány prostřednictvím tandemové hmotnostní spektrometrie (Goshe, 2002).

Další metoda pro kvantifikaci fosfoproteinů využívá amino-reaktivní izobarické tagy (iTRAQ) v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Metoda je založena na separaci a izolaci fosfoproteinů pomocí SDS-PAGE a jejich následném tryptickém štěpení za vzniku fosfopeptidů, které jsou chemicky značeny pomocí iTRAQ, obohaceny například prostřednictvím metody IMAC, separovány kapalinovou chromatografií (LC) a analyzovány pomocí MS/MS (Sachon, 2006).

Metoda absolutní kvantifikace (AQUA) umožňuje přesné stanovení absolutního množství fosforylovaných proteinů. Metoda je založena na přípravě vnitřních standardů v podobě syntetických fosforylovaných peptidů s inkorporovanými stabilními izotopy, které jsou následně použity k přesné kvantifikaci fosforylovaných peptidů vzniklých po tryptickém štěpení analyzovaných fosfoproteinů, přičemž analýza je provedena pomocí MS/MS (Gerber, 2003).

Analýza fosforylovaných proteinů využívající MS detekce může být provedena také na mikročipu. Fosfopeptidy vzniklé po tryptickém štěpení fosfoproteinů mohou být analyzovány přímo nebo po separaci v mikrofluidním systému. Výhody MS zahrnují především vysokou senzitivitu, rychlé a snadné provedení. Spojení MS s mikročipovým uspořádáním umožňuje navíc nízkou spotřebu vzorku a omezení jeho kontaminace (Dawoud, 2007).

1.4. Charakterizace vybraných diagnosticky významných fosfoproteinů

1.4.1. Neurofibromin

Neurofibromin je protein o molekulové hmotnosti 250 kDa, který je kódován tumor supresorovým genem označovaným NF1. Funkce neurofibrominu spočívá v regulaci buněčného růstu a diferenciaci. V důsledku patologického snížení exprese neurofibrominu dochází ke zvýšení buněčné proliferace a k rozvoji neurofibromatózy typu 1, která je charakterizována tvorbou benigních nádorů periferního nervového systému (Feng, 2004).

Zvýšená fosforylace neurofibrominu prostřednictvím proteinkinázy A (PKA) na Thr²⁵⁵⁶, Ser²⁵⁷⁶, Ser²⁵⁷⁸, Ser²⁵⁸⁰ a Ser²⁸¹³ usnadňuje interakci s proteinem 14-3-3, která přispívá k negativní regulaci funkce neurofibrominu (Feng, 2004).

1.4.2. Prionový protein (PrP)

Normální buněčný prion (PrPC) je glykoprotein přítomný fyziologicky v lidských buňkách, zatímco patologický buněčný prion (PrPSc) vzniká v důsledku defektu při sbalování PrPC. Patologický PrPSc se akumuluje v buňkách, následně dochází k tvorbě fibrilárních struktur a ke spongiformním změnám v mozkové tkáni. Tyto změny jsou charakteristické pro vzácná neurodegenerativní onemocnění nazývaná transmisivní spongiformní encefalopatie, mezi které patří například Creutzfeldt-Jacobova choroba (Gozke, 2008).

Jednou z příčin konformačních změn proteinů jsou posttranslační modifikace, proto byl zkoumán vliv fosforylace na konformační změny PrP *in vitro*. Bylo zjištěno, že neuronální cyklin-dependentní kináza 5 (CDK5) fosforyluje rekombinantní PrP na Ser⁴³ a že takto fosforylovaný PrP tvoří fibrilární struktury a agregáty. Lze předpokládat, že ke konformačním změnám PrP prostřednictvím fosforylace může docházet také *in vivo*. Detekce fosforylovaného PrP byla provedena například blotovacími technikami s využitím fosfo-specifických protilátek (Giannopoulos, 2009).

1.4.3. Huntingtin

Huntingtin je protein o molekulové hmotnosti 350 kDa, který se vyskytuje ve všech lidských tkáních, především v neuronech a gliových buňkách v mozku. Huntingtin se podílí zejména na axonálním transportu a na regulaci buněčného přežití. Za patologických podmínek dochází k expanzi polyglutaminové sekvence v N-terminální doméně huntingtinu a k následnému rozvoji neurodegenerativního onemocnění centrálního nervového systému nazývaného Huntingtonova choroba (Schulte, 2011).

Huntingtin podléhá řadě posttranslačních modifikací, například ubikvitinylaci, sumoylaci nebo fosforylaci (Warby, 2005). Posttranslační modifikace umožňují regulaci toxického působení patologické formy huntingtinu, které způsobuje dysfunkci a následnou smrt neuronů (Anne, 2007). Například fyziologická fosforylace huntingtinu prostřednictvím proteinkinázy B (PKB) na Ser⁴²¹ nebo prostřednictvím cyklin-dependentní kinázy 5 (CDK5) na Ser¹¹⁸¹ a Ser¹²⁰¹ chrání proti toxickému působení patologické formy huntingtinu (Warby, 2005; Anne, 2007). Detekce fosforylovaného huntingtinu může být provedena například blotovacími technikami s využitím fosfo-specifických protilátek (Anne, 2007).

1.4.4. α -synuklein

α -synuklein zahrnuje 4 izoformy o délce 98 – 140 aminokyselin tvořené alternativním sestřihem z SNCA genu (Bungeroth, 2014). Za fyziologických podmínek je α -synuklein solubilní protein, který se nachází v presynaptickém zakončení axonů nervových buněk (Waxman, 2011).

α -synuklein podléhá posttranslačním modifikacím, zahrnujícím například acetylaci, nitraci, ubikvitinylaci, sumoylaci a fosforylaci (Samuel, 2016). Fosforylaci α -synukleinu zprostředkovávají zejména kasein kinázy (CK1, CK2) a polo-like kinázy (PLK-1, PLK-2, PLK-3) (Waxman, 2011). Za patologických podmínek dochází k agregaci α -synukleinu, který je hyperfosforylovaný na Ser¹²⁹ a tvoří hlavní složku Lewyho tělísek. Agregovaný α -synuklein přítomný v neuronech a gliových buňkách je charakteristickým znakem neurodegenerativních onemocnění nazývaných synukleinopatie, mezi které patří například Parkinsonova choroba, demence s Lewyho tělísky nebo Alzheimerova choroba s výskytem Lewyho tělísek (Waxman, 2011; Ma, 2016). Detekce fosforylovaného α -synukleinu byla provedena například blotovacími technikami s imunochemickou detekcí s využitím fosfo-specifických protilátek nebo radioaktivním značením izotopem ³²P (Waxman, 2011).

1.4.5. Myelinový bazický protein

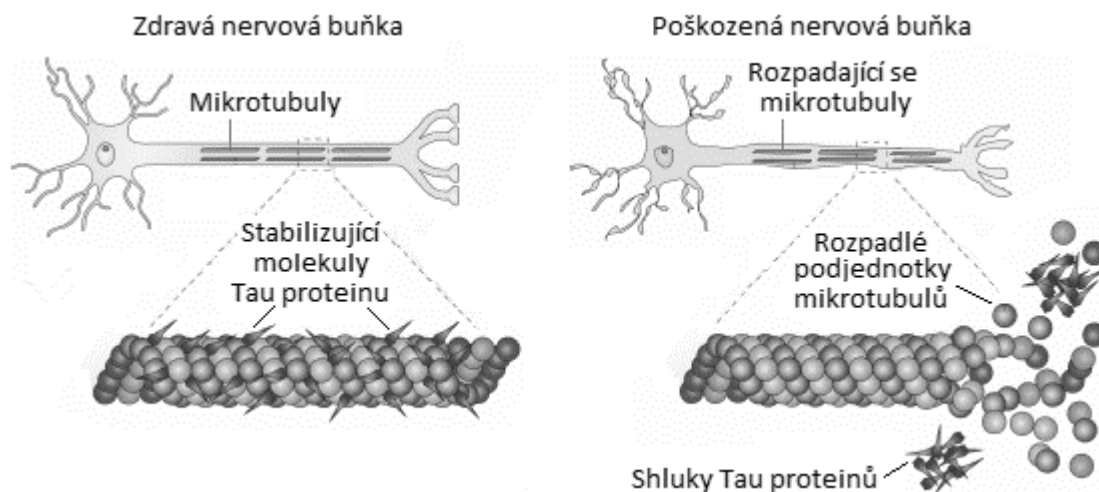
Myelinový bazický protein (MBP) zahrnuje 6 izoform o molekulové hmotnosti v rozsahu 14 – 21,5 kDa, které jsou tvořeny alternativním sestřihem z genového komplexu Golli. Nejhojněji zastoupená izoforma MBP v myelinu dospělého člověka má molekulovou hmotnost 18,5 kDa (Hill, 2005). MBP je jedním z nejvíce zastoupených proteinů v myelinu. Jedná se o pozitivně nabitý protein, který je vázán na cytosolický povrch membrány oligodendrocytů prostřednictvím elektrostatických interakcí s negativně nabitými lipidy a podílí se zejména na adhezivních procesech při tvorbě myelinové pochvy axonů neuronů centrálního nervového systému (Boggs, 2012).

MBP podléhá posttranslačním modifikacím, které zahrnují například N-terminální acylaci, methylaci, deamidaci, deiminaci a fosforylaci (Hill, 2005). Fosforylace MBP může být příčinou poruchy interakce mezi MBP a lipidy v myelinové pochvě. V důsledku poruchy těchto interakcí dochází k destabilizaci a strukturním změnám myelinové pochvy. Fosforylaci MBP umožňuje zejména mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK), která fosforyluje MBP na Thr⁹⁵, jehož fosforylace je regulována během myelinogeneze a demyelinizačního onemocnění označovaného roztroušená skleróza. Další proteinkinázy schopné fosforylovat MBP zahrnují například proteinkinázu A (PKA), proteinkinázu C (PKC) a Ca²⁺/kalmmodulin-dependentní proteinkinázu 2 (CaMK2) (Atkins, 1999).

Detekce fosforylovaného MBP byla provedena například blotovacími technikami s imunochemickou detekcí s využitím fosfo-specifických protilátek (Atkins, 1999). Další přístup vhodný pro detekci fosforylovaného MBP využívá metod hmotnostní spektrometrie po předchozím proteolytickém štěpení (Erickson, 1990).

1.4.6. Tau protein

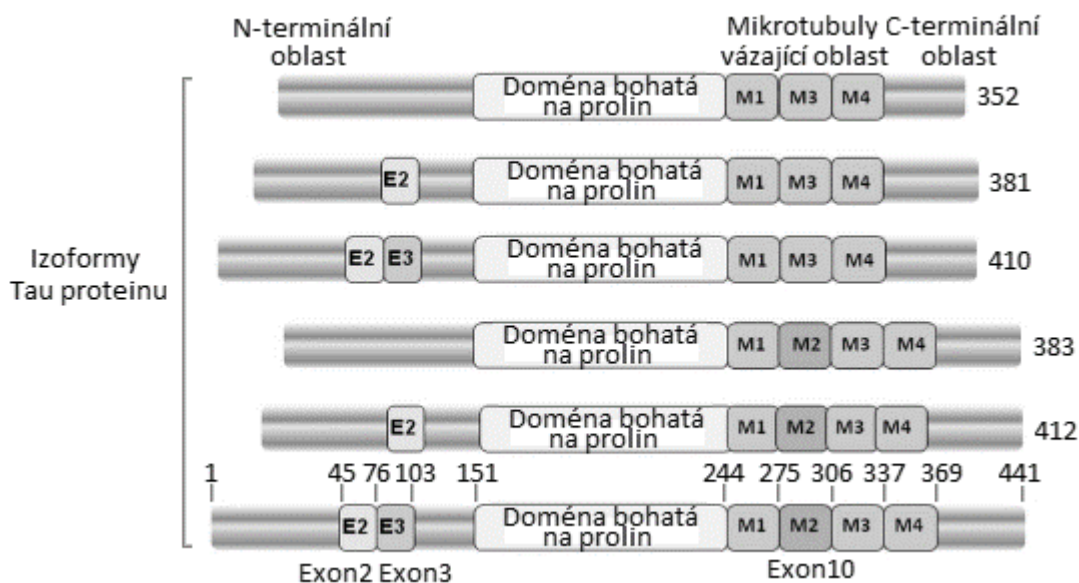
Tau protein je strukturní s mikrotubuly asociovaný protein exprimovaný zejména v axonech nervových buněk centrálního nervového systému. Za fyziologických podmínek je tau protein solubilní a plní svou hlavní funkci spočívající ve stabilizaci axonálních mikrotubulů, které se podílejí na zachování struktury nervových buněk a axonálním transportu (Scholz, 2014; Dani, 2016). Ovšem za patologických podmínek dochází v důsledku hyperfosforylace tau proteinu a tvorby neurofibrilárních smotků k oddělení tau proteinu od mikrotubulů, což má za následek jejich destabilizaci. Rozdílná úloha tau proteinu ve zdravé a poškozené nervové buňce je znázorněna na Obrázku 11 (Brunden, 2009).



Obrázek 11 Úloha tau proteinu ve zdravé a poškozené nervové buňce (Brunden, 2009, modifikováno)

Struktura a izoformy tau proteinu

V centrálním nervovém systému dospělého člověka je exprimováno 6 izoform tau proteinu, které jsou znázorněny na Obrázku 12. Délka izoform tau proteinu je v rozsahu 352 – 441 aminokyselin a mechanismem jejich vzniku je alternativní sestřih genu MAPT lokalizovaného na 17. chromozomu v oblasti 17q21.3. Izoformy tau proteinu se v N-terminální oblasti liší přítomností exonu 2 a exonu 3. Následuje doména bohatá na prolin, která je společná pro všechny izoformy. Ve směru k C-terminální oblasti jsou lokalizovány 3 nebo 4 oblasti, které umožňují vazbu na mikrotubuly a jsou označovány M1, M2 (kódována exonem 10), M3 a M4 (Noble, 2013).



Obrázek 12 Izoformy tau proteinu (Noble, 2013, modifikováno)

Aminokyselinová sekvence nejdelší izoformy tau proteinu tvořené 441 aminokyselinami je znázorněna na Obrázku 13. Tau protein patří mezi proteiny, které se v nativním stavu vyskytují nesbalené. Dochází pouze ke vzniku přechodné sekundární struktury tvořené α -helixy a β -skládanými listy (Kolarova, 2012; Mukrasch, 2009).



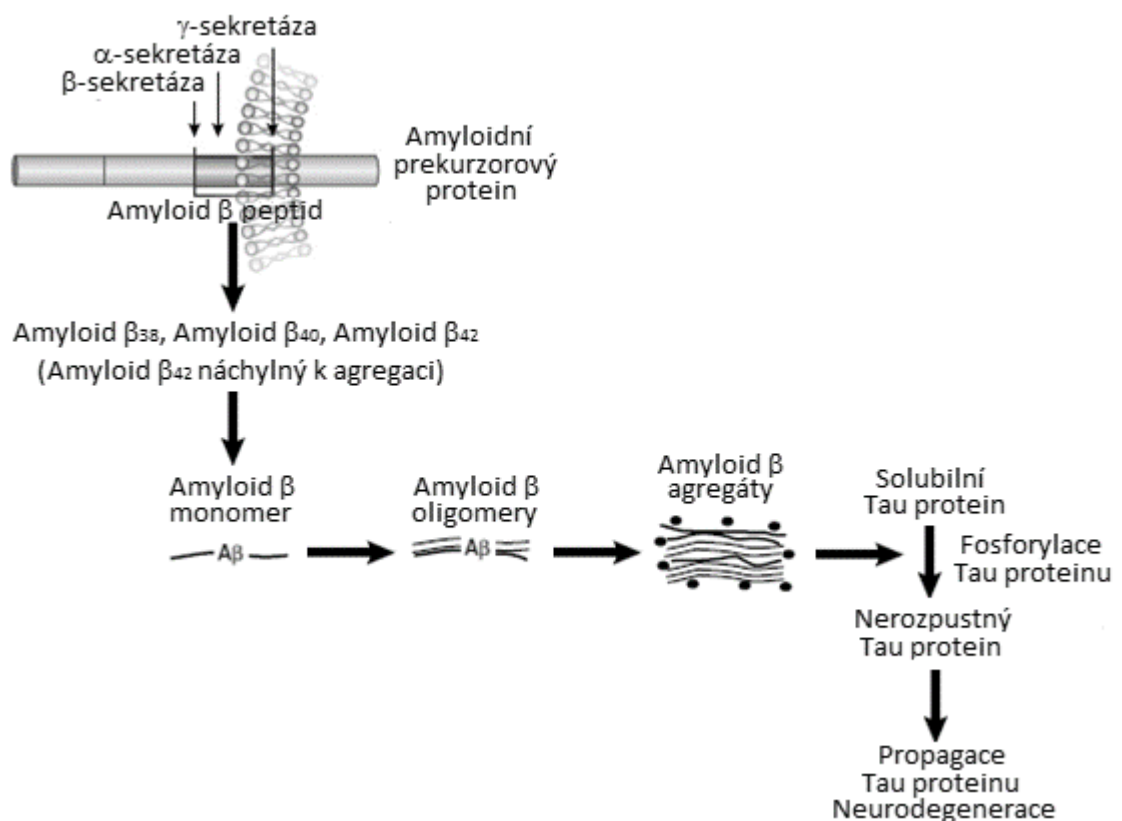
Obrázek 13 Aminokyselinová sekvence nejdelší izoformy tau proteinu (Kolarova, 2012; Mukrasch, 2009, modifikováno)

Význam tau proteinu u neurodegenerativních chorob

Neurodegenerativní choroby, na jejichž patogenezi se podílí tvorba neurofibrilárních smotků v důsledku agregace hyperfosforylovaného tau proteinu, se nazývají tauopatie a zahrnují řadu chorob, z nichž nejběžnější je Alzheimerova choroba (Schraen-Maschke, 2004). Jako další tauopatie lze jmenovat progresivní supranukleární obrnu, frontotemporální demenci a Parkinsonismus vázaný na 17. chromozom, Pickovu chorobu, kortikobazální degeneraci, frontotemporální lobární degeneraci, chronickou traumatickou encefalopatii, nemoc s argyrofilními zrny a věkově vázanou primární tauopatii (Schraen-Maschke, 2004; Dani, 2016).

Alzheimerova choroba byla popsána v roce 1907 Aloisem Alzheimerem a je hlavní příčinou demence u stárnoucí populace. Alzheimerova choroba je charakterizována přítomností β -amyloidních plaků a neurofibrilárních smotků tvořených hyperfosforylovaným

tau proteinem v mozkové tkáni (Mehta, 2015). Patogeneze Alzheimerovy choroby je schematicky znázorněna na Obrázku 14 (Musiek, 2015). Amyloidní prekurzorový protein je membránový protein, který je štěpen sekretázami α , β a γ za vzniku amyloid β peptidů. Amyloid β_{1-42} snadno oligomeruje a agreguje za tvorby extracelulárních plaků, které jsou příčinou poruchy synapse a zániku nervových buněk v mozku a jejich toxické působení má vliv také na patologické změny hyperfosforylovaného tau proteinu. Za těchto podmínek tau protein oligomeruje, agreguje a nakonec tvoří neurofibrilární smotky, které jsou příčinou strukturálních a funkčních změn nervových buněk (Ballard, 2011).



Obrázek 14 Schéma vzniku Amyloid β agregátů a tau agregátů, které způsobují neurodegeneraci (Musiek, 2015, modifikováno)

Posttranslační modifikace tau proteinu

Tau protein podléhá různým posttranslačním modifikacím, z nichž nejvíce zastoupenou je fosforylace, které bude věnována samostatná kapitola. Mezi další významné posttranslační modifikace tau proteinu patří polyaminace, agregace, glykace, glykosylace, nitrace, ubikvitinylace, štěpení, prolyl-izomerizace, sumoylace a oxidace. V Tabulce 5 je uveden přehled posttranslačně modifikovaných míst na nejdelší izoformě tau proteinu (Martin, 2011).

Tabulka 5 Posttranslačně modifikovaná místa na nejdelší izoformě tau proteinu (Martin, 2011)

Posttranslační modifikace	Lokalizace na tau proteinu
Polyaminace	Gln ⁶ , Lys ²⁴ , Gln ⁸⁸ , Gln ¹²⁴ , Lys ¹⁶³ , Lys ¹⁷⁴ , Lys ¹⁸⁰ , Lys ¹⁹⁰ , Lys ²²⁵ , Lys ²³⁴ , Lys ²⁴⁰ , Gln ²⁴⁴ , Gln ²⁷⁶ , Gln ²⁸⁸ , Gln ³⁵¹ , Lys ³⁸³ , Lys ³⁸⁵ , Gln ⁴²⁴
Agregace	Val ²⁷⁵ , Gln ²⁷⁶ , Ile ²⁷⁷ , Ile ²⁷⁸ , Asn ²⁷⁹ , Lys ²⁸⁰ , Val ³⁰⁶ , Gln ³⁰⁷ , Ile ³⁰⁸ , Val ³⁰⁹ , Tyr ³¹⁰ , Lys ³¹¹
Glykace	Lys ⁸⁷ , Lys ¹³² , Lys ¹⁵⁰ , Lys ¹⁶³ , Lys ¹⁷⁴ , Lys ²²⁵ , Lys ²⁵⁹ , Lys ²⁸⁰ , Lys ²⁸¹ , Lys ³⁴⁷ , Lys ³⁵³ , Lys ³⁶⁹
Glykosylace	Thr ¹⁸¹ , Ser ¹⁹⁹ , Ser ²⁰² , Thr ²⁰⁵ , Thr ²¹² , Ser ²¹⁴ , Thr ²¹⁷ , Ser ²⁶² , Ser ³⁵⁶ , Ser ⁴⁰⁴ , Ser ⁴²²
Nitrace	Tyr ¹⁸ , Tyr ²⁹ , Tyr ¹⁹⁷ , Tyr ³⁹⁴
Ubikvitinylace	Lys ²⁵⁴ , Lys ³¹¹ , Lys ³⁵³
Štěpení	Asp ¹³ , Glu ³⁹¹ , Asp ⁴²¹
Prolyl-izomerizace	Thr ²³¹
Sumoylace	Lys ³⁴⁰
Oxidace	Cys ³²²

Fosforylace tau proteinu

Fosforylace patří mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace tau proteinu. Fosforylace tau proteinu je zprostředkována řadou kináz a je založena na kovalentní vazbě fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu serinu, threoninu nebo tyrosinu (Prokopovich, 2017). Na nejdelší izoformě tau proteinu se nachází 85 potencionálních fosforylačních míst, jejichž přehled je uveden v Tabulce 6 (Martin, 2011). Stav fosforylace tau proteinu je důležitým faktorem v regulaci jeho aktivity a podílí se na změnách jeho afinity k mikrotubulům. Podle odhadů je za fyziologických podmínek tau protein fosforylován na 18 fosforylačních místech. Ovšem v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou dochází k hyperfosforylaci tau proteinu, která spočívá v až čtyřnásobném zvýšení počtu jeho fosforylací (Prokopovich, 2017).

Tabulka 6 Přehled fosforylačních míst na nejdelší izoformě tau proteinu (Martin, 2011)

Fosforylační místa na tau proteinu detekovaná v mozku za fyziologických podmínek i v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou	Ser ⁴⁶ , Thr ¹⁸¹ , Ser ¹⁹⁸ , Ser ¹⁹⁹ , Ser ²⁰² , Thr ²⁰⁵ , Thr ²¹² , Thr ²¹⁷ , Thr ²³¹ , Ser ²³⁵ , Ser ³⁹⁶ , Ser ⁴⁰⁰ , Ser ⁴⁰⁴ , Ser ⁴¹² , Ser ⁴¹³ , Ser ⁴¹⁶
Fosforylační místa na tau proteinu vyskytující se v mozku především za fyziologických podmínek	Thr ¹⁷ , Tyr ²⁹ , Thr ³⁹ , Thr ⁵⁰ , Thr ⁵² , Ser ⁵⁶ , Thr ⁹⁵ , Thr ¹⁰¹ , Thr ¹⁰² , Thr ¹¹¹ , Ser ¹³¹ , Thr ¹³⁵ , Thr ¹⁴⁹ , Thr ¹⁶⁹ , Ser ¹⁹⁵ , Thr ²²⁰ , Ser ²⁴¹ , Thr ²⁴⁵ , Thr ²⁶³ , Ser ²⁸⁵ , Ser ²⁹³ , Ser ³⁰⁵ , Ser ³¹⁶ , Ser ³²⁰ , Ser ³²⁴ , Ser ³⁴¹ , Ser ³⁵² , Thr ³⁶¹ , Thr ³⁷³ , Thr ³⁸⁶ , Thr ⁴¹⁴
Fosforylační místa na tau proteinu vyskytující se zejména v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou	Tyr ¹⁸ , Ser ⁶⁸ , Thr ⁶⁹ , Thr ⁷¹ , Ser ¹¹³ , Thr ¹²³ , Thr ¹⁵³ , Thr ¹⁷⁵ , Ser ¹⁸⁴ , Ser ¹⁸⁵ , Ser ¹⁹¹ , Tyr ¹⁹⁷ , Ser ²⁰⁸ , Ser ²¹⁰ , Ser ²¹⁴ , Ser ²³⁷ , Ser ²³⁸ , Ser ²⁵⁸ , Ser ²⁶² , Ser ²⁸⁹ , Ser ³⁵⁶ , Tyr ³⁹⁴ , Thr ⁴⁰³ , Ser ⁴⁰⁹ , Ser ⁴²² , Thr ⁴²⁷ , Ser ⁴³³ , Ser ⁴³⁵
Další předpokládaná fosforylační místa na tau proteinu	Thr ³⁰ , Ser ⁶¹ , Thr ⁶³ , Ser ⁶⁴ , Thr ⁷⁶ , Ser ¹²⁹ , Ser ¹³⁷ , Tyr ³¹⁰ , Thr ³¹⁹ , Thr ³⁷⁷

Přehled kináz fosforylujících tau protein

Kinázy schopné fosforylovat tau protein lze rozdělit do třech skupin. První skupinu tvoří prolinem řízené proteinkinázy (PDPK), které umožňují fosforylaci tau proteinu na aminokyselinových zbytcích serinu nebo threoninu následovaných prolinem (Martin, 2013a). Skupina PDPK zahrnuje například cyklin-dependentní kinázy (CDK), glykogen syntáza kinázy-3 (GSK-3), dále mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a stresem aktivované proteinkinázy (SAPK). V důsledku nepřiměřeného působení proteinkináz PDPK dochází k patologické fosforylaci tau proteinu podílející se na agregačních procesech, které ovlivňují vazbu tau proteinu na mikrotubuly (Sergeant, 2008; Martin, 2013a).

Do druhé skupiny patří proteinkinázy neřízené prolinem (non-PDPK) (Martin, 2013a). Skupina non-PDPK zahrnuje například duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (DYRK), kasein kinázy (CK), tau tubulin kinázy (TTBK), fosforyláza kinázy (PhK), proteinkinázy A (PKA), proteinkinázy B (PKB), proteinkinázy C (PKC) a proteinkinázy N (PKN). Význam proteinkináz skupiny non-PDPK spočívá především v signální transdukcii (Buée, 2010; Sergeant, 2008; Martin, 2013a).

Do třetí skupiny náleží tyrosinové kinázy (TK), které jsou schopné fosforylovat tau protein na aminokyselinových zbytcích tyrosinu a zahrnují například kinázy Src (Martin, 2013a).

V Tabulce 7 je uveden přehled fosforylačních míst na nejdelší izoformě tau proteinu zprostředkovaných kinázami GSK-3 a PKA (Sergeant, 2008; Mendoza, 2013).

Tabulka 7 Přehled fosforylačních míst na nejdelší izoformě tau proteinu zprostředkovaných kinázami GSK-3 a PKA (Sergeant, 2008; Mendoza, 2013)

Proteinkináza	Fosforylační místa na tau proteinu
GSK-3 α	Thr ²³¹ , Ser ²³⁵ , Ser ²⁶² , Ser ³²⁴ , Ser ³⁵⁶ , Ser ³⁹⁶ , Ser ⁴⁰⁴
GSK-3 β	Ser ⁴⁶ , Thr ⁵⁰ , Thr ⁶⁹ , Thr ¹⁴⁹ , Thr ¹⁵³ , Thr ¹⁷⁵ , Thr ¹⁸¹ , Ser ¹⁸⁴ , Ser ¹⁹⁹ , Ser ²⁰² , Thr ²⁰⁵ , Ser ²¹⁰ , Thr ²¹² , Thr ²¹⁷ , Thr ²²⁰ , Thr ²³¹ , Ser ²³⁵ , Ser ²³⁷ , Ser ²⁴¹ , Thr ²⁴⁵ , Ser ²⁵⁸ , Ser ²⁶² , Ser ²⁸⁵ , Ser ²⁸⁹ , Ser ³⁰⁵ , Ser ³²⁴ , Ser ³⁵² , Ser ³⁵⁶ , Thr ³⁷³ , Ser ³⁹⁶ , Ser ⁴⁰⁰ , Thr ⁴⁰³ , Ser ⁴⁰⁴ , Ser ⁴⁰⁹ , Ser ⁴¹² , Ser ⁴¹³ , Thr ⁴¹⁴ , Ser ⁴¹⁶ , Ser ⁴²²
PKA	Ser ¹⁹⁸ , Ser ²⁰⁸ , Ser ²¹⁰ , Ser ²¹⁴ , Thr ²⁴⁵ , Ser ²⁵⁸ , Ser ²⁶² , Ser ²⁹³ , Ser ³⁰⁵ , Ser ³¹⁶ , Ser ³²⁰ , Ser ³²⁴ , Ser ³⁵² , Ser ³⁵⁶ , Ser ⁴⁰⁹ , Ser ⁴¹² , Ser ⁴¹³ , Thr ⁴¹⁴ , Ser ⁴¹⁶ , Ser ⁴³⁵

Přehled fosfatáz defosforylujících tau protein

Fosfatázy schopné defosforylovat tau protein lze rozdělit na fosfoproteinofosfatázy (PPP), které zahrnují proteinofosfatázu 1 (PP1), proteinofosfatázu 2A (PP2A), proteinofosfatázu 2B (PP2B) a proteinofosfatázu 5 (PP5), a na protein tyrosin fosfatázy (PTP). Nejvýznamnější fosfatázou defosforylující hyperfosforylovaný tau protein je PP2A, která je složena ze strukturální podjednotky A, regulační podjednotky B a katalytické podjednotky C. Regulaci PP2A umožňuje zejména fosforylace, methylace nebo vazba endogenních inhibitorů (Martin, 2013b).

Uvedené fosfatázy jsou exprimovány v mozku a u pacientů s Alzheimerovou chorobou je jejich celková aktivita zhruba poloviční (Martin, 2013b). Fosfatázy se podílejí například na regulaci buněčné proliferace a diferenciace, dále na regulaci apoptózy a degradace proteinů (Perluigi, 2016). Fosfatázy náležící do skupiny PPP umožňují *in vitro* defosforylaci tau proteinu na určitých fosforylačních místech, zahrnujících Ser¹⁹⁹, Ser²⁰², Thr²⁰⁵, Thr²¹², Ser²¹⁴, Ser²³⁵, Ser²⁶², Ser³⁹⁶, Ser⁴⁰⁴ a Ser⁴⁰⁹. Zmíněné fosfatázy jsou schopné defosforylovat tau protein na různých fosforylačních místech s různou účinností, což závisí zejména na zastoupení jednotlivých fosfatáz v určitých oblastech mozku a na jejich afinitě a specifické enzymatické aktivitě vůči tau proteinu (Liu, 2005).

Metody detekce fosforylovaného tau proteinu

Detekci fosforylovaného tau proteinu umožňují například metody využívající fosfo-specifické protilátky. V současné době je velké množství komerčně dostupných monoklonálních i polyklonálních protilátek proti specifickým fosforylačním místům tau proteinu, které lze využít například pro blotovací techniky s imunochemickou detekcí nebo imunofluorescenční mikroskopii. Myší monoklonální primární protilátky zahrnují například AT8 (pSer202/pThr205), AT180 (pThr231), AT270 (pThr181), MC6 (pSer235), CP13

(pSer202) a PHF-1 (pSer396/pSer404). Příkladem králičích polyklonálních primárních protilátek je pS199 (pSer199), pS202 (pSer202), pT205 (pThr205), pT212 (pThr212), pS214 (pSer214), pT217 (pThr217), pT231 (pThr231), pS235 (pSer235), pS262 (pSer262), pS396 (pSer396), pS404 (pSer404), pS409 (pSer409) a pS422 (pSer422) (Petry, 2014; Bertrand, 2010).

Metoda Pro-Q Diamond byla využita pro barvení fosfoproteinů přítomných v substantia nigra a korových oblastech mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou. Fosfoproteiny byly separovány 2D gelovou elektroforézou a jejich identifikace byla provedena po štěpení trypsinem pomocí MS (Zahid, 2012). Dále byla metoda Pro-Q Diamond ve spojení s 2D gelovou elektroforézou, barvením SYPRO Ruby a MS využita pro detekci změn ve fosforylaci proteinů přítomných v hipokampu pacientů s Alzheimerovou chorobou ve srovnání s kontrolními vzorky (Di Domenico, 2011).

Pro detekci fosforylace tau proteinu v lidském mozku je vhodná metoda SDS-PAGE využívající Phos-tagy (Kimura, 2016). Například separaci izoform tau proteinu s jednou fosfátovou skupinou na odlišném tyrosinu lze provést pomocí SDS-PAGE s Mn^{2+} -Phos-tagy navázanými na polyakrylamid, což umožňuje detekci jednotlivých izoform na základě posunu v jejich pohyblivosti a následného imunoblotu s využitím protilátek proti fosfotyrosinu (Kinoshita, 2008). Dalším příkladem metody pro separaci rekombinantního tau proteinu fosforylovaného na tyrosinu je SDS-PAGE s Zn^{2+} -Phos-tagy v prostředí neutrálního pH Bis-tris pufru s následným barvením pomocí SYPRO Ruby nebo imunoblotem s protilátkami proti fosfotyrosinu (Kinoshita, 2011).

Pro analýzu struktury a fosforylace tau proteinu je vhodná metoda založená na analýze produktů jeho tryptického štěpení pomocí ionizační metody MALDI v kombinaci s hmotnostní spektrometrií využívající iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (FTICR). Jedná se o velmi senzitivní metodu s vysokým hmotnostním rozlišením (Becker, 2007). Další metoda vhodná pro detekci specifických fosforylačních míst lidského rekombinantního tau proteinu je založena na jeho tryptickém štěpení za vzniku fosfopeptidů, jejich obohacení pomocí metody IMAC a následné analýze tandemovou hmotnostní spektrometrií (Lund, 2001).

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavést metodu pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů/proteinů pomocí solubilních a imobilizovaných kináz. Součástí úkolů bylo ověřit možnosti detekce míry fosforylace vybraných peptidů pomocí metod SDS-PAGE v prostředí tricinu bez/s přidavkem močoviny a bodového přenosu na membránu. Dalším úkolem bylo zavést metodu pro průkaz fosforylace proteinů pomocí dendrimeru pIMAGO, přičemž byla provedena optimalizace metody v kombinaci s bodovým přenosem na membránu, dále v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu a v uspořádání na mikrotitrační destičce. Další část diplomové práce byla zaměřena na imobilizaci vybraných modelových enzymů na magnetické částice včetně stanovení jejich enzymové aktivity. V rámci diplomové práce byla zavedena metoda pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů s využitím hmotnostní spektrometrie. Další část práce byla zaměřena na detekci enzymové fosforylace proteinu pomocí metody polosuchého westernového přenosu s využitím fosfo-specifických protilátek a metody hmotnostní spektrometrie.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Potřebné vybavení

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- pH metr Boeco BT-600 (Boeco, Hamburg, Německo)
- Zařízení pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Zařízení pro polosuchý westernový přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Silné filtrační papíry Extra thick blot filter paper (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Zdroj napětí Power Pac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mikrostříkačka Hamilton (Hamilton AG, Bonaduz, GR, Švýcarsko)
- Zařízení pro izoelektrickou fokusaci PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Zařízení pro bodový přenos DHM-96 Dot Blot (Scie-Plas Ltd., Cambridge, Anglie, UK)
- Zařízení pro záznam gelů a membrán Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- MALDI destička Opti-TOF™ 384 Well Insert (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, USA)
- Magnetický separátor pro zkumavky Dynal® MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- Magnetický separátor pro mikrotitrační destičky MagnetoPURE-96 (Chemicell GmbH, Berlín, Německo)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Multiskan RC, typ 351 (Labsystems, Helsinky, Finsko)
- Termostat Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Koncentrátor Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

- Blokový termostat Grant-Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, Anglie, UK)
- Multifunkční orbitální třepačka PSU-20i (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky Grant-Bio PMS-1000i (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, Anglie, UK)
- Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Míchadlo magnetické MM 4 (LAVAT Chotutice, Radim u Kolína, ČR)
- Zařízení pro výrobu ultračisté vody TKA Smart2Pure (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Německo)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destička typu P s upraveným povrchem jamek pro sorpci proteinů, 96 jamek, ELISA Microplate high binding (bioWORLD, Dublin, OH, USA)
- Mikrotitrační destička typu P Micro-Method Plates 96 Wells Flat Bottom (Anicrin, Scorze, Itálie)
- Zkumavky 0,2, 0,5, 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifugační filtrační zkumavky Amicon® Ultra-0,5 ml Centrifugal Filters, Ultracel®-10K (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irsko)
- Zkumavky s upraveným vnitřním povrchem Protein LoBind Tubes 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Špičky s prodlouženým tenkým koncem Eppendorf GELoader Tips (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Nosič OLIGO™ R3 Reversed – Phase Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Nosič Titansphere™ TiO Bulk Material, 10 µm (GL Sciences, Tokio, Japonsko)

Použité magnetické částice:

- Sera-Mag Speed Beads, magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Použité membrány:

- Nitrocelulózová (NC) membrána, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána, Immun-Blot® PVDF Membrane, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Proteiny:

- Myelinový bazický protein z hovězího mozku (MBP), lyofilizát, čistota ≥ 90 % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 18,4 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Protein tau-441*, rekombinantní, His-tagovaný, uskladněn v PBS pufru po dobu 1 rok (poskytnuto Národním ústavem duševního zdraví, Klecany, ČR)
- Protein tau-441, rekombinantní, DNA sekvence kódující lidskou tau-441 izoformu 2N4R, původ *E. coli*, lyofilizát, bez His-tagu, čistota > 90 % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 45,9 kDa (rPeptide, Bogart, GA, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA), lyofilizát, čistota ≥ 98 % (agarózová elektroforéza), přečištění pomocí tepelné frakcionace, molekulová hmotnost 66 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ovalbumin, albumin z kuřecího vaječného bílku, lyofilizát, čistota ≥ 95 % (agarózová elektroforéza), přečištění pomocí chromatografie, molekulová hmotnost 44,3 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- α -kasein z hovězího mléka, lyofilizát, čistota ≥ 70 % (elektroforéza), přečištění pomocí chromatografie, molekulová hmotnost 25 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Proteolytické enzymy:

- Trypsin z hovězího pankreatu, modifikován pomocí L-1-tosylamido-2-fenylethyl chloromethyl ketonu (TPCK) a dialyzován, lyofilizát, molekulová hmotnost 23,8 kDa, aktivita 12885 U/mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dále používán název TPCK-trypsin
- Sequencing grade modified trypsin, prasečí, modifikován pomocí reduktivní methylace, TPCK a afinitně přečištěn, lyofilizát (Promega, Madison, WI, USA)
- α -chymotrypsin z hovězího pankreatu, lyofilizát, molekulová hmotnost 25 kDa, aktivita 57,24 U/mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kinázy a fosfatázy:

- Proteinkináza A (PKA), podjednotka C α myši, rekombinantní, původ *E. coli*, uchovávací roztok: 20 mM MOPS pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 50% glycerol, čistota > 95 % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 41 kDa, aktivita 22058824 U/mg (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo), dále používán název PKA

- Glykogen syntáza kináza-3 β (GSK-3 β), rekombinantní, původ *E. coli*, uchovávací roztok: 50 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.03% Brij a 50% glycerol, molekulová hmotnost 47 kDa, aktivita 5000000 U/mg (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), dále používán název GSK-3
- Alkalická fosfatáza z hovězí ledviny, lyofilizát, aktivita 3,4 U/mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Krátké peptidy:

- Peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (1), lyofilizát, čistota ≥ 95 % (HPLC), molekulová hmotnost 771,91 Da, aminokyselinová sekvence: Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (2), lyofilizát, čistota ≥ 97 % (HPLC), molekulová hmotnost 771,9 Da, aminokyselinová sekvence: Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)
- Peptidový substrát pro GSK-3, molekulová hmotnost 1992 Da, aminokyselinová sekvence: Arg-Arg-Arg-Ala-Ala-Glu-Glu-Leu-Asp-Ser-Arg-Ala-Gly-pSer-Pro-Gln-Leu (Biomol Research Labs, Plymouth Meeting, PA, USA)
- Peptidový substrát pro MAPK, aminokyselinová sekvence: Lys-Gln-Ala-Glu-Ala-Val-Thr-Ser-Pro-Arg (Calbiochem, San Diego, CA, USA)

Použité primární protilátky:

- Tau monoklonální protilátka (Tau 46.1) (od Dr. Francisco Garcia-Sierra, Mexico City, Mexico)
- Monoklonální myší fosfo-PHF-tau pSer202/pThr205 protilátka (AT8), uchovávací roztok: PBS, přečištění na proteinu A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Monoklonální myší fosfo-PHF-tau pThr231 protilátka (AT180), uchovávací roztok: PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Polyklonální králičí anti-tau pSer396 protilátka, uchovávací roztok: PBS pH 7,4 a 0,02% azid sodný, přečištění pomocí imunoafinitní chromatografie (GenScript, Piscataway, NJ, USA)
- Polyklonální králičí tau pSer356 protilátka, uchovávací roztok: PBS pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% azid sodný a 50% glycerol, přečištění pomocí afinitní chromatografie (Assay Biotechnology Company, Sunnyvale, CA, USA)

Použité sekundární protilátky:

- Polyklonální koží anti-králičí IgG protilátka konjugovaná s HRP, uchovávací roztok: 0,01 M PBS pH 7,4, 1% BSA a 0,01% thimerosal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Polyklonální koží anti-myší IgG konjugovaná s HRP, uchovávací roztok: 0,01 M PBS pH 7,4, 1% BSA a 0,01% thimerosal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a glycinu

Použité chemikálie:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Neratovice, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Roztok A: 29,2% akrylamid, 0,8% bisakrylamid
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8
- Roztok C: 1 M Tris-HCl pufr pH 6,8
- Roztok D: 10% SDS
- Roztok E: 10% persíran amonný
- Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS pH 8,3 – 8,6
- Vzorový pufr: 2× Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bez/s přidavkem 2-merkptoethanolu
- Marker molekulových hmotností:
 - Precision Plus Protein™ Unstained Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, 10 – 250 kDa, používaný v případě následného polosuchého westernového přenosu na membránu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Roztok dělicího gelu o dané porozitě byl tvořen destilovanou vodou a roztoky A, B, D, TEMED a E (Tabulka 8), pipetován mezi skla pro elektroforézu a převrstven destilovanou vodou. Na zpolymerovaný dělicí gel byl dávkován roztok zaostřovacího gelu tvořený destilovanou vodou a roztoky A, C, D, TEMED a E (Tabulka 8) a mezi skla byla vložena šablona s jamkami. Skla se zpolymerovanými gely byla upevněna do elektroforetické vany, do které byl aplikován elektrodový pufr. Vzorky byly zředěny vzorkovým puffrem v poměru 1 : 1 a poté povařeny v blokovém termostatu při teplotě 100 °C po dobu 3 min a po ochlazení na laboratorní teplotu byly pomocí Hamiltonovy pipety dávkovány do jamek v zaostřovacím gelu vzniklých po vyndání šablony s jamkami. Proteinový marker byl dávkován na gel bez úpravy. Elektroforetické dělení bylo provedeno při konstantním napětí 180 V po dobu přibližně 50 min.

Tabulka 8 Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro provedení SDS-PAGE v prostředí glycinu

	Zaostřovací gel (ml) 5%	Dělicí gel (ml)			
		12%	13%	16,5%	20%
Destilovaná voda	1,4	1,68	1,5	0,9	0,665
Roztok A	0,33	2,0	2,2	2,75	3,335
Roztok B	-	1,25	1,25	1,25	1,25
Roztok C	0,25	-	-	-	-
Roztok D	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05
Roztok E	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

3.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu

Použité chemikálie:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Neratovice, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)

- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tricin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok A1: 46,5% akrylamid, 3% bisakrylamid
- Roztok A2: 48% akrylamid, 1,5% bisakrylamid
- Roztok B: 3 M Tris-HCl pufr pH 8,45 s 0,3% SDS
- Roztok C: 10% persíran amonný
- Elektrodotový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M tricín, 0,1% SDS
- Vzorkový pufr: Tricine Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Marker molekulových hmotností:
 - Precision Plus Protein™ Unstained Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
 - Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards, 1,4 – 26,6 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Roztok dělicího gelu byl tvořen destilovanou vodou a roztoky A1, B, TEMED a C (Tabulka 9), pipetován mezi skla pro elektroforézu a převrstven roztokem B s destilovanou vodou v poměru 1 : 3. Na zpolymerovaný dělicí gel byl dávkován roztok zaostřovacího gelu tvořený destilovanou vodou a roztoky A2, B, TEMED a C (Tabulka 9) a mezi skla byla vložena šablona s jamkami. Skla se zpolymerovanými gely byla upevněna do elektroforetické vany, do které byl aplikován elektrodotový pufr. Vzorky byly zředěny vzorkovým pufrem v poměru 1 : 1 a poté povařeny v blokovém termostatu při teplotě 100 °C po dobu 3 min. Polypeptidový marker byl zředěn vzorkovým pufrem v poměru 1 : 20 a povařen v blokovém termostatu při teplotě 100 °C po dobu 3 min. Elektroforetické dělení bylo provedeno při konstantním napětí 30 V při laboratorní teplotě po dobu 30 min a poté při konstantním napětí 100 V při teplotě 4 °C po dobu přibližně 2 hod.

Tabulka 9 Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro provedení SDS-PAGE v prostředí tricinu

	Zaostřovací gel (ml)	Dělicí gel (ml) 16,5% T, 6% C
Destilovaná voda	2,1	1,666
Roztok A1	-	1,666
Roztok A2	0,25	-
Roztok B	0,775	1,666
Roztok C	0,025	0,025
TEMED	0,0025	0,0025

3.4. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu s přidavkem močoviny

Metoda pro separaci polypeptidů o nízké molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidavkem močoviny byla upravena podle Jiang (2016).

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.3
- Močovina (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.3 (pokud není uvedeno jinak)
- Vnitřní elektrodový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M tricinu, 0,1% SDS pH 8,25
- Postranní elektrodový pufr: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 8,9
- Vzorkový pufr: Tricine Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bez/s přidavkem 2-merkaptoethanolu

Postup:

Postup provedení metody byl až na několik obměn shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.3. Roztok dělicího gelu s přidavkem močoviny a roztok zaostřovacího gelu byly připraveny podle Tabulky 10. Vnitřní elektrodový pufr byl aplikován do prostoru mezi skla s gely, zatímco postranním elektrodovým pufrem byla naplněna elektroforetická vana. Elektroforetické dělení bylo provedeno při konstantním napětí 60 V při laboratorní teplotě po dobu 30 min a následně při konstantním napětí 140 V při laboratorní teplotě po dobu přibližně 1 hod.

Tabulka 10 Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro provedení SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidávkem močoviny

	Zaostřovací gel (ml) 5% T, 3% C	Dělicí gel (ml) 18% T, 6% C
Destilovaná voda	1,7	1,82
Roztok A1	-	2,18
Roztok A2	0,3	-
Roztok B	1	2
Roztok C	0,03	0,025
TEMED	0,004	0,0025
Močovina	-	1,5 g

3.5. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza

Použité chemikálie:

- Močovina (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Thiomočovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát (CHAPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DeStreak Reagent (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- Roztok s amfolity Pharmalyte™ pH 3 – 10 (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Roztok s amfolity Pharmalyte™ pH 8 – 10,5 (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Neratovice, ČR)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Jodacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Minerální olej (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Rehydratační roztok: 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 60 µl DeStreak Reagent, 10 µl zásobního roztoku bromfenolové modře, doplněno ultračistou vodou na celkový objem 5 ml
- Ekvilibrační roztok: 6 M močovina, 2% SDS, 15 ml glycerol, 1,67 ml 1,5 M Tris pH 8,8, doplněno ultračistou vodou na celkový objem 50 ml

- 1% DTT v ekvilibračním roztoku
- 4% IAA v ekvilibračním roztoku
- 0,5% agaróza s 0,75% bromfenolovou modří

Polyakrylamidový gelový proužek s imobilizovaným pH gradientem (IPG):

- Immobiline™ DryStrip pH 3 – 10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)

Postup:

Do plastové vaničky byl dávkován roztok obsahující 137 μ l rehydratačního roztoku, 3 μ l vzorku, 1,3 μ l Pharmalyte™ pH 3 – 10 a 0,65 μ l Pharmalyte™ pH 8 – 10,5. Proužek IPG byl položen na roztok, přelit minerálním olejem a inkubován při teplotě 20 °C po dobu 18 hod. Následně byly na elektrody v zařízení pro izoelektrickou fokusaci umístěny malé navlhčené filtrační papíry a připravený proužek IPG, který byl následně přelit minerálním olejem. Izoelektrická fokusace byla provedena v 7 krocích (1 – 150 V, 2 hod, 2 – 300 V, 1 hod, 3 – 900 V, 1 hod, 4 – 2100 V, 1 hod 20 min, 5 – 3500 V, 1 hod, 6 – 3500 V, 1 hod, 7 – 3500 V, více než 9000 Vh). Poté byl připraven roztok dělicího gelu o požadované porositě pro SDS-PAGE v prostředí glycinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.2 a pipetován až k okraji skel a mezi skla byla vložena šablona s jamkou na proužek IPG a marker molekulových hmotností. Proužek IPG byl inkubován v ekvilibračním pufru s 1% DTT po dobu 15 min a následně v ekvilibračním pufru se 4% IAA za tmy po dobu 15 min. Proužek IPG byl vložen do jamky v připraveném dělicím gelu a přelit 0,5% agarózou s přídavkem bromfenolové modři. Elektroforetické dělení bylo provedeno při konstantním napětí 180 V po dobu přibližně 1 hod.

3.6. Barvení gelů roztokem Coomassie G-250 Stain

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- Barvicí roztok Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Po provedení elektroforetického dělení proteinů byl gel promyt destilovanou vodou. Všechny kroky barvení gelu byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Gel

byl inkubován ve fixačním roztoku po dobu 30 min a poté promyt destilovanou vodou 3× po dobu 5 min. Následně byl gel inkubován v roztoku Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain po dobu 1 hod a promyt destilovanou vodou 2× po dobu 30 min.

3.7. Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amoniak vodný roztok 25 – 29% (Penta, Praha, ČR)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)
- Kyselina citronová bezvodá (Penta, Praha, ČR)
- Formaldehyd vodný roztok 36 – 38% (Penta, Praha, ČR)

Použité roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- 10% glutaraldehyd
- Roztok amoniakálního stříbra:
 - K roztoku 10,5 ml destilované vody s 0,7 ml vodného roztoku amoniaku a 119,5 µl 9 M NaOH byl přikapáván 20% dusičnan stříbrný do vzniku světle hnědého zbarvení a následně byl roztok doplněn destilovanou vodou na celkový objem 50 ml.
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová, 0,04% formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová

Postup:

Po provedení elektroforetického dělení proteinů byl gel promyt destilovanou vodou. Gel byl inkubován ve fixačním roztoku za mírného míchání při laboratorní teplotě po dobu 30 min nebo při teplotě 4 °C přes noc. Další kroky barvení gelu byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Gel byl inkubován v destilované vodě po dobu 30 min a poté v 10% roztoku glutaraldehydu po dobu 30 min. Gel byl promyt destilovanou vodou 6× po dobu 10 min a inkubován v roztoku amoniakálního stříbra po dobu 15 min. Po promytí gelu

destilovanou vodou bylo provedeno jeho vyvolání pomocí vyvolávacího roztoku a převedení do ustalovacího roztoku.

3.8. Barvení gelů pomocí ProteoSilver™ Silver Stain Kit

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- ProteoSilver™ Silver Stain Kit (ProteoSilver roztok stříbra, ProteoSilver senzibilizátor, ProteoSilver vyvíjecí roztok 1, ProteoSilver vyvíjecí roztok 2, ProteoSilver zastavovací roztok) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fixační roztok: 10% kyselina octová, 50% ethanol
- 30% ethanol
- Roztok senzibilizátoru: 1% ProteoSilver senzibilizátor
- Roztok stříbra: 1% ProteoSilver roztok stříbra
- Vyvíjecí roztok: 5% ProteoSilver vyvíjecí roztok 1, 0,1% ProteoSilver vyvíjecí roztok 2

Postup:

Na přípravu všech potřebných roztoků byla použita ultračistá voda. Všechny kroky barvení gelu byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Po provedení elektroforetického dělení proteinů byl gel inkubován ve fixačním roztoku po dobu 20 min. Poté byl gel promyt 30% roztokem ethanolu po dobu 10 min a ultračistou vodou po dobu 10 min. Gel byl inkubován v roztoku senzibilizátoru po dobu 10 min a následně promyt ultračistou vodou 2× po dobu 10 min. Poté byl gel inkubován v roztoku stříbra po dobu 10 min a promyt ultračistou vodou po dobu 1 min. Gel byl inkubován ve vyvíjecím roztoku po dobu 3 – 7 min a poté byl k vyvíjecímu roztoku přidán ProteoSilver zastavovací roztok v objemu odpovídajícím 5 % objemu vyvíjecího roztoku a byla provedena inkubace po dobu 5 min. Gel byl promyt ultračistou vodou po dobu 15 min.

3.9. Polosuchý tzv. „semi-dry“ westernový přenos proteinů na membránu

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Přenosový roztok: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol

Postup:

PVDF membrána, na rozdíl od NC membrány, byla nejprve inkubována v methanolu po dobu 5 min. Vybraná membrána a filtrační papíry byly inkubovány v přenosovém roztoku po dobu 30 min. Po provedení elektroforetického dělení proteinů byl gel promyt destilovanou vodou a inkubován v přenosovém roztoku po dobu 20 min. Do zařízení pro polosuchý westernový přenos proteinů na membránu byl umístěn první filtrační papír, membrána, gel a druhý filtrační papír, přičemž k sobě byly jednotlivé vrstvy přitlačeny. Přenos byl proveden při konstantním napětí 12 V po dobu 30 min.

3.10. Bodový přenos tzv. „dot-blot“ proteinů na membránu

Použité chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl) (Penta, Praha, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na₂HPO₄·12 H₂O) (Penta, Praha, ČR)
- Methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄·12 H₂O
pH 7,2

Postup:

PVDF membrána, na rozdíl od NC membrány, byla nejprve inkubována v methanolu po dobu 5 min. Vybraná membrána byla upevněna do zařízení pro bodový přenos proteinů na membránu. Všechny jamky byly promyty PBS 2× po 100 μl. Poté byly pipetovány vzorky

zředěné pomocí PBS na objem 100 μ l. Nakonec byly všechny jamky promyty PBS 2 \times po 100 μ l.

3.11. Barvení membrán roztokem Ponceau S

Použité chemikálie:

- Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok Ponceau S: 0,1% Ponceau S, 1% kyselina octová

Postup:

Po provedení polosuchého westernového přenosu proteinů byla membrána inkubována v roztoku Ponceau S za mírného míchání při laboratorní teplotě po dobu 5 – 20 min. Následně bylo odbarveno pozadí membrány proudem destilované vody ze stříčky.

3.12. Barvení membrán roztokem koloidního zlata

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- TTBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,3% Tween 20 pH 7,5
- Barvicí roztok Colloidal Gold Total Protein Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Všechny kroky barvení membrány byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Po provedení polosuchého westernového přenosu nebo bodového přenosu proteinů byla membrána promyta TTBS 3 \times po dobu 20 min a ultračistou vodou 3 \times po dobu 2 min. Poté byla membrána inkubována v roztoku Colloidal Gold Total Protein Stain po dobu 2 hod. Nakonec byla membrána promyta ultračistou vodou 3 \times po dobu 1 min.

3.13. Detekce fosfoproteinů na membráně s využitím specifických protilátek

Metoda pro detekci fosforylovaného proteinu tau-441 na membráně s využitím specifických protilátek byla upravena podle Hromadkova (2015).

Použité chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl) (Penta, Praha, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na₂HPO₄·12 H₂O) (Penta, Praha, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Odtučněné sušené mléko Laktino (Artifex Instant, Toužim, ČR)

Použité roztoky:

- PBS-T: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,1% Tween 20 pH 7,2
- Blokační roztok: 10% odtučněné sušené mléko Laktino v PBS-T
- Ředící roztok pro protilátky: 1% BSA v PBS-T
- Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
 - Roztok chemiluminiscenčního substrátu: roztok peroxidu a roztok luminolu s urychlovačem v poměru 1 : 1

Postup:

Po provedení polosuchého westernového přenosu proteinů byla NC membrána inkubována v blokačním roztoku za mírného míchání při laboratorní teplotě po dobu 2 hod. Poté byla membrána inkubována se zředěnou primární protilátkou za mírného míchání při teplotě 4 °C přes noc. Následně byla membrána opláchnuta PBS-T a promývána PBS-T 4× po dobu 5 min. Membrána byla inkubována se zředěnou sekundární protilátkou za mírného míchání při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hod. Poté byla membrána opláchnuta PBS-T a promývána PBS-T 4× po dobu 5 min. Membrána byla inkubována s roztokem chemiluminiscenčního substrátu při laboratorní teplotě po dobu 5 min a byla provedena detekce. Membrána byla uchována v PBS-T pufri při teplotě 4 °C.

3.14. Uvolnění vázaných protilátek z membrány

Použité chemikálie:

- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Promývací pufr: 100 mM glycin-HCl pufr pH 2,6

Postup:

Uvedený postup byl použit k uvolnění již navázaných specifických protilátek z membrány za účelem dalších analýz. Všechny kroky postupu byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Membrána byla promyta PBS-T 2× po dobu 5 min a poté inkubována v promývacím pufru po dobu 30 min. Následně byla membrána promyta PBS-T 3× po dobu 10 min. Poté byla membrána inkubována v blokačním roztoku po dobu 2 hod a značena další primární protilátkou podle postupu uvedeného v kapitole 3.13.

3.15. Uvolnění vázaných protilátek z membrány s využitím 2-merkптоethanolu

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Neratovice, ČR)
- 2-merkптоethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Promývací pufr s 2-merkптоethanolem: 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 2% SDS a 0,7% 2-merkптоethanolem

Postup:

Membrána byla promyta PBS-T za mírného míchání při laboratorní teplotě 2× po dobu 15 min. Poté byla membrána inkubována v promývacím pufru s 2-merkптоethanolem za mírného míchání při teplotě 50 °C po dobu 30 min. Membrána byla promyta PBS-T za mírného míchání při laboratorní teplotě 2× po dobu 15 min. Poté byla membrána inkubována v blokačním roztoku po dobu 2 hod a značena další primární protilátkou podle postupu uvedeného v kapitole 3.13.

3.16. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- TBS-T: 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20 pH 7,4
- pIMAGO[®]-biotin Phosphoprotein Detection Kit (pIMAGO reagentie, avidin-HRP, 10× blokační pufr, 5× pIMAGO pufr, 10× promývací pufr, 5× IAA, kontrolní fosfoprotein) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Clarity[™] Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
 - Roztok chemiluminiscenčního substrátu: roztok peroxidu a roztok luminolu s urychlovačem v poměru 1 : 1

Postup:

Po provedení bodového přenosu fosfoproteinů na PVDF nebo NC membránu podle postupu uvedeného v kapitole 3.10 byla membrána značena pomocí dendrimeru pIMAGO. Roztoky, které jsou součástí kitu, byly ředěny na požadovanou koncentraci ultračistou vodou, pokud není uvedeno jinak. Všechny kroky značení membrány byly provedeny za mírného míchání při laboratorní teplotě. Nejprve byla membrána blokována za různých podmínek, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1. Poté byla membrána inkubována s biotinylovanou pIMAGO reagentií zředěnou 1× pIMAGO pufrem v poměru 1 : 1000 po dobu 1 hod. Následně byla membrána promyta 1× promývacím pufrem 3× po dobu 5 min a TBS-T 1× po dobu 5 min. Membrána byla inkubována s komplexem avidin-HRP zředěným 1× blokačním pufrem v poměru 1 : 1000 po dobu 1 hod. Membrána byla promyta TBS-T 3× po dobu 5 min. Membrána byla inkubována s roztokem chemiluminiscenčního substrátu při laboratorní teplotě po dobu 2 min a byla provedena detekce. Membránu lze uchovávat v TBS-T při teplotě 4 °C.

3.17. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.16
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.16
- Vzorkový pufr: 2× Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bez/s přídavkem DTT
- Marker molekulových hmotností pro detekci fosfoproteinů:
 - PeppermintStick™ Phosphoprotein Molecular Weight Standards (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

Postup:

Vzorky fosfoproteinů byly zředěny vzorkovým pufrem bez nebo s přídavkem DTT v poměru 1 : 1, povařeny v blokovém termostatu při teplotě 97 °C po dobu 5 min a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. K vybraným vzorkům zředěným vzorkovým pufrem s přídavkem DTT byl přidán IAA na celkovou koncentraci 1× a proběhla inkubace ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Marker molekulových hmotností pro detekci fosfoproteinů byl zředěn vzorkovým pufrem bez nebo s přídavkem DTT v poměru 1 : 6 a také povařen v blokovém termostatu při teplotě 97 °C po dobu 5 min. Připravený marker, vzorky a kontrolní fosfoprotein byly separovány pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Následně byl proveden polosuchý westernový přenos na PVDF membránu podle postupu uvedeného v kapitole 3.9. Poté byla provedena detekce fosfoproteinů značením membrány pomocí dendrimeru pIMAGO podle postupu uvedeného v kapitole 3.16. V tomto případě byla membrána blokována v 1× blokačním pufru při laboratorní teplotě po dobu 1 hod.

3.18. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v uspořádání na mikrotitrační destičce

Použité chemikálie:

- Hydrogenuhlíčan sodný (NaHCO_3) (Penta, Praha, ČR)
- Uhlíčan sodný dekahydrát ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha, ČR)

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Octan sodný trihydrát ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) (Lachema, Neratovice, ČR)
- 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin dihydrochlorid (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Peroxid vodíku 30% (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina sírová 96% (H_2SO_4) (Lachema, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Uhličitanový pufr: 70 mM NaHCO_3 , 30 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ pH 9,2 – 9,6
- TBS-T: 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20 pH 7,6
- Blokační roztok: 1% BSA v TBS-T
- pIMAGO[®]-biotin Phosphoprotein Detection Kit (pIMAGO reagensie, avidin-HRP, 5× pIMAGO pufr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 0,1 M octanový pufr pH 5,4
- Zásobní roztok TMB: 0,6% TMB v DMSO
- Substrátový roztok: 0,1 M octanový pufr pH 5,4 (10,82 ml), zásobní roztok TMB (180 μl), 0,003% H_2O_2
- Zastavovací roztok: 1 M H_2SO_4

Postup:

Pro přípravu všech potřebných roztoků byla použita ultračistá voda. Jednotlivé inkubace byly provedeny při laboratorní teplotě za třepání při 400 rpm, pokud není uvedeno jinak. Příslušné množství vzorku fosfoproteinu bylo zředěno uhličitanovým pufrem a dávkováno na mikrotitrační destičku v objemu 50 μl na jamku. Inkubace byla provedena při laboratorní teplotě za třepání po dobu 5 min a následně při teplotě 4 °C bez třepání přes noc. Při každém kroku postupu byl daný roztok z destičky vyklepnut. Poté byl přidán blokační roztok v objemu 100 μl na jamku a byla provedena blokace při laboratorní teplotě za třepání po dobu 1 hod, případně při teplotě 4 °C bez třepání přes noc. Byla přidána biotinylovaná pIMAGO reagensie zředěná 1× pIMAGO pufrem v objemu 50 μl na jamku a byla provedena inkubace

po dobu 1 hod. Destička byla promyta v množství 100 μ l na jamku 1 \times pIMAGO pufrem 3 \times po dobu 2 min a blokačním roztokem 1 \times po dobu 15 min. Byl přidán komplex avidin-HRP zředěný blokačním pufrem v objemu 50 μ l na jamku a byla provedena inkubace po dobu 1 hod. Destička byla promyta v množství 100 μ l na jamku TBS-T pufrem 3 \times po dobu 2 min. Byl přidán substrátový roztok v množství 100 μ l na jamku a byla provedena inkubace za tmy po dobu 7 min. Reakce byla zastavena přidáním zastavovacího roztoku v množství 50 μ l na jamku a byla změřena absorpance při vlnové délce 450 nm.

3.19. Odsolení vzorků a analýza (fosfo)proteinů/peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie

Použité chemikálie:

- Acetonitril (ACN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Hydrogencitrát dvojamonný (DAHC)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina fosforečná (H_3PO_4) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Použité roztoky:

- 80% ACN s 0,1% TFA
- 0,1% TFA
- 5% TFA
- Suspenze fáze: OLIGOTM R3 Reversed – Phase Resin v 80% ACN s 0,1% TFA
- Matrice pro peptidy: CHCA (5 mg/ml) v 60% ACN, 0,1% TFA, 2 mM DAHC
- Matrice pro fosfopeptidy: DHB (10 mg/ml) v 50% ACN, 0,1% TFA, 1% H_3PO_4

Postup:

Do GELoader špičky s mírně stlačeným koncem byla nanесena zředěná suspenze fáze, která byla následně protlačena. Fáze zachycená v GELoader špičce tvořila kolonku o délce přibližně 1,5 cm. Na připravenou kolonku bylo dávkováno 10 μ l 80% ACN s 0,1% TFA a protlačeno. Poté bylo na kolonku dávkováno 15 μ l 0,1% TFA a protlačeno, přičemž přibližně 5 μ l roztoku bylo ponecháno nad kolonkou. Vzorek okyselený pomocí 5% TFA byl dávkován na kolonku a protlačen. Kolonka byla poté promyta 15 μ l 0,1% TFA a byl protlačen zbytkový vzduch. Eluce na spotu MALDI destičky byla provedena pomocí matrice CHCA

v případě vzorku, u kterého nepředpokládáme výskyt fosfopeptidů, nebo DHB v případě vzorku obsahujícího i fosfopeptidy. Analýza byla provedena pracovníkem laboratoře pomocí hmotnostního spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL operujícího v pozitivním módu při rozlišovací schopnosti 60000 (FWHM u $m/z = 400$). Metody vyhodnocení jsou popsány u konkrétních kapitol.

3.20. Imobilizace TPCK-trypsinu na magnetické částice

Metoda pro imobilizaci enzymu na magnetické částice s využitím EDAC a Sulfo-NHS byla upravena podle Jankovicova (2008).

Použité chemikálie:

- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha, ČR)
- Benzamidin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- PB: 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 1% benzamidin hydrochlorid v PB

Postup:

Postup je uveden pro vazbu 3 mg TPCK-trypsinu na 1 mg magnetických částic. Byl odebrán 1 mg magnetických částic, které byly s využitím magnetického separátoru promyty $5 \times 1,5$ ml PB. Roztok TPCK-trypsinu byl připraven rozpuštěním 3 mg TPCK-trypsinu ve 480 μl PB s přidavkem 20 μl 1% roztoku benzamidin hydrochloridu v PB. Takto připravený roztok byl inkubován při laboratorní teplotě na rotátoru po dobu 10 min. K magnetickým částicím bylo přidáno 7,5 mg EDAC ve 200 μl PB, 3,75 mg Sulfo-NHS ve 200 μl PB, 500 μl připraveného roztoku TPCK-trypsinu a 100 μl PB. Byla provedena inkubace při teplotě 4 °C na rotátoru přes noc. Poté byly magnetické částice s navázaným TPCK-trypsinem promyty $10 \times 1,5$ ml PB a resuspendovány v 1 ml PB. Magnetické částice s navázaným TPCK-trypsinem byly uchovány v PB s přidavkem 15 μl 1% roztoku benzamidin hydrochloridu v PB při teplotě 4 °C.

3.21. Stanovení aktivity imobilizovaného TPCK-trypsinu

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid vápenatý (CaCl₂) (Penta, Praha, ČR)
- N- α -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid (BAPNA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-dimethylformamid 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Ředící roztok: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂
- Roztok TPCK-trypsinu: 0,1% TPCK-trypsin v ředícím roztoku
- Substrátový roztok: 0,055 M BAPNA v N,N-dimethylformamidu
- Zastavovací roztok: 30% kyselina octová

Postup:

Do dvou zkumavek byl odebrán 0,1 mg magnetických částic s navázaným TPCK-trypsinem a částice byly promyty 5 \times 0,5 ml ředícího roztoku a poté resuspendovány ve 100 μ l ředícího roztoku. Z roztoku TPCK-trypsinu byly připraveny kalibrační roztoky o celkovém objemu 100 μ l a koncentraci TPCK-trypsinu 1, 3, 5, 7, 9 a 11 μ g/100 μ l. Ke kalibračním roztokům i k roztokům s magnetickými částicemi s navázaným TPCK-trypsinem byl přidán 1 ml ředícího roztoku a 200 μ l substrátového roztoku. Následovala inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru po dobu 30 min. Reakce byla zastavena přidáním 200 μ l zastavovacího roztoku. Poté byly odseparovány magnetické částice a kalibrační roztoky a vzorky byly dávkovány v objemu 200 μ l na mikrotitrační destičku a byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm.

3.22. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetické částice

Použité chemikálie:

- MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)

- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha, ČR)

Použité roztoky:

- 0,5 M MES pufr pH 6
- 50 mM MES pufr pH 6
- PB: 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3

Postup:

Postup je uveden pro vazbu 3 mg α -chymotrypsinu na 1 mg magnetických částic. Byl odebrán 1 mg magnetických částic, které byly promyty $5 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru. K magnetickým částicím bylo přidáno 110 μl 0,5 M MES pufru, 660 μl ultračisté vody, 2,42 mg Sulfo-NHS ve 220 μl ultračisté vody a 2,2 mg EDAC ve 110 μl ultračisté vody a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru po dobu 30 min. Poté byly magnetické částice promyty $1 \times 1,5$ ml 0,5 M MES pufru a $1 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru. Roztok 3 mg α -chymotrypsinu v 1,5 ml 50 mM MES pufru byl přidán k magnetickým částicím a byla provedena inkubace při teplotě 4 °C na rotátoru přes noc. Poté byly magnetické částice s navázaným α -chymotrypsinem promyty $10 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru, 3×1 ml PB a resuspendovány v 1 ml PB, v němž byly uchovány při teplotě 4 °C.

3.23. Stanovení aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu

Použité chemikálie:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2) (Penta, Praha, ČR)
- N-sukcinyl-L-fenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-dimethylformamid 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Ředící roztok: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 8 s 10 mM CaCl_2
- Roztok α -chymotrypsinu: 0,1% α -chymotrypsin v ředícím roztoku

- Substrátový roztok: 0,026 M SUPHEPA v N,N-dimethylformamidu

Postup:

Do dvou zkumavek byl odebrán 0,1 mg magnetických částic s navázaným α -chymotrypsinem a částice byly promyty $3 \times 0,5$ ml ředícího roztoku a poté resuspendovány ve 100 μ l ředícího roztoku. Z roztoku α -chymotrypsinu byly připraveny kalibrační roztoky o celkovém objemu 100 μ l a koncentraci α -chymotrypsinu 5, 10, 25, 50, 75 a 100 μ g/100 μ l. Kalibrační roztoky i roztoky s magnetickými částicemi s navázaným α -chymotrypsinem byly přeneseny do jamek mikrotitrační destičky a bylo přidáno 100 μ l substrátového roztoku. Byla provedena inkubace při teplotě 37 °C za mírného míchání po dobu 30 min. Poté byly odseparovány magnetické částice a kalibrační roztoky a vzorky byly dávkovány v objemu 150 μ l do nových jamek mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm.

3.24. Imobilizace alkalické fosfatázy na magnetické částice

Použité chemikálie:

- MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid zinečnatý (ZnCl_2) (Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 0,5 M MES pufr pH 6
- 50 mM MES pufr pH 6
- Reakční pufr: 0,1 M glycinový pufr pH 10,4 s 1 mM ZnCl_2 a 1 mM MgCl_2

Postup:

Postup je uveden pro vazbu 3 mg alkalické fosfatázy na 1 mg magnetických částic. Byl odebrán 1 mg magnetických částic, které byly promyty $5 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru. K magnetickým částicím bylo přidáno 110 μ l 0,5 M MES pufru, 660 μ l ultračisté vody, 2,42 mg Sulfo-NHS ve 220 μ l ultračisté vody a 2,2 mg EDAC ve 110 μ l ultračisté vody

a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru po dobu 30 min. Poté byly magnetické částice promyty $1 \times 1,5$ ml 0,5 M MES pufru a $1 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru. Roztok 3 mg alkalické fosfatázy v 1,5 ml 50 mM MES pufru byl přidán k magnetickým částicím a byla provedena inkubace při teplotě 4 °C na rotátoru přes noc. Poté byly magnetické částice s navázanou alkalickou fosfatázou promyty $5 \times 1,5$ ml 50 mM MES pufru a $5 \times 1,5$ ml reakčního pufru a resuspendovány v 1 ml reakčního pufru, v němž byly uchovány při teplotě 4 °C.

3.25. Stanovení aktivity imobilizované alkalické fosfatázy

Použité chemikálie:

- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid zinečnatý (ZnCl_2) (Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)
- Hexahydrát disodné soli 4-nitrofenyl fosfátu (PNPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Reakční pufr: 0,1 M glycinový pufr pH 10,4 s 1 mM ZnCl_2 a 1 mM MgCl_2
- 1 mM MgCl_2
- Roztok alkalické fosfatázy: 2 mg alkalické fosfatázy v 0,6 ml 1 mM roztoku MgCl_2 vychlazeného na 4 °C
- Substrátový roztok: 100 mM PNPP v ultračisté vodě
- Zastavovací roztok: 3 M NaOH

Postup:

Do dvou zkumavek byl odebrán 0,1 mg magnetických částic s navázanou alkalickou fosfatázou ve 100 μl reakčního roztoku. Z roztoku alkalické fosfatázy byly připraveny kalibrační roztoky v reakčním pufru o celkovém objemu 100 μl a koncentraci alkalické fosfatázy 3,3, 6,7, 10, 16,7, 33,3 a 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Ke kalibračním roztokům i k roztokům s magnetickými částicemi s navázanou alkalickou fosfatázou bylo přidáno 800 μl reakčního pufru a 100 μl substrátového roztoku. Byla provedena inkubace při laboratorní teplotě za tmy a za mírného míchání po dobu 20 min. Reakce byla zastavena přidáním 200 μl zastavovacího roztoku. Poté byly odseparovány magnetické částice a kalibrační roztoky a vzorky byly

dávkovány v objemu 150 μ l na mikrotitrační destičku a byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm.

3.26. Rozvolnění, redukce a alkylace myelinového bazického proteinu

Použité chemikálie:

- Hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3)
- RapiGest SF Surfaktant (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Jodacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 50 mM NH_4HCO_3
- 0,2% RapiGest SF Surfaktant v 50 mM NH_4HCO_3
- 0,5 M DTT
- 1 M IAA

Postup:

Myelinový bazický protein (MBP) byl rozvolněn pomocí roztoku RapiGest SF Surfaktant a následně redukován a alkylován. Všechny inkubace byly provedeny za třepání při 400 rpm. Do zkumavky bylo přeneseno 204 μ g MBP rozpuštěného v 204 μ l ultračisté vody, bylo přidáno 204 μ l 0,2% roztoku RapiGest SF Surfaktant v 50 mM NH_4HCO_3 a byla provedena inkubace při teplotě 37 °C po dobu 5 min. Poté bylo přidáno 13 μ l 50 mM NH_4HCO_3 a 18 μ l 0,5 M DTT a byla provedena inkubace při teplotě 60 °C po dobu 30 min. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu bylo přidáno 11 μ l 1 M IAA a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 min.

Byla provedena také pouze redukce a alkylace MBP. Všechny inkubace byly i v tomto případě provedeny za třepání při 400 rpm. Do zkumavky bylo přeneseno 204 μ g MBP rozpuštěného v 204 μ l ultračisté vody, bylo přidáno 217 μ l 50 mM NH_4HCO_3 a 18 μ l 0,5 M DTT a byla provedena inkubace při teplotě 60 °C po dobu 30 min. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu bylo přidáno 11 μ l 1 M IAA a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 min.

3.27. Štěpení myelinového bazického proteinu dvěma proteolytickými enzymy vázanými na nosič

Použité chemikálie:

- Hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2) (Penta, Praha, ČR)

Použité roztoky:

- 50 mM NH_4HCO_3
- 50 mM NH_4HCO_3 s 25 mM CaCl_2

Postup:

Poměr aktivního navázaného proteolytického enzymu a MBP pro štěpení byl 1 : 20. Do zkumavek bylo přeneseno příslušné množství magnetických částic s navázaným enzymem. Částice s imobilizovaným TPCK-trypsinem byly promyty $3 \times 0,4$ ml 50 mM NH_4HCO_3 . Částice s imobilizovaným α -chymotrypsinem byly promyty $3 \times 0,4$ ml 50 mM NH_4HCO_3 s 25 mM CaCl_2 . Poté byl k magnetickým částicím přidán připravený MBP a roztok 50 mM NH_4HCO_3 v případě štěpení imobilizovaným TPCK-trypsinem nebo NH_4HCO_3 s 25 mM CaCl_2 v případě štěpení imobilizovaným α -chymotrypsinem a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru po celkovou dobu 3 hod.

3.28. Stanovení míry fosforylace krátkých peptidů pomocí solubilních kináz v čase

Použité chemikálie:

- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)

Použité roztoky:

- Adenosin-5'-trifosfát, 10 mM (ATP) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Reakční pufr: 40 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 5 mM EGTA pH 7,2

Postup:

Do zkumavek byly přidány v příslušném množství reakční složky tvořené reakčním pufrům, solubilní kinázou, krátkým peptidem a ATP (konkrétní údaje viz kapitola 4.6.1). Byla provedena inkubace při teplotě 30 °C za třepání po celkovou dobu 3 hod, přičemž byly v odpovídajících časech sbírány frakce o daném objemu a příslušné vzorky fosforylovaného krátkého peptidu byly odsoleny a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19.

3.29. Imobilizace vybraných kináz na magnetické částice

Použité chemikálie:

- MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid hořečnatý ($MgCl_2$)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Praha, ČR)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 0,5 M MES pufr pH 6
- 50 mM MES pufr pH 6
- 40 mM HEPES pufr pH 7,2
- Reakční pufr: 40 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 5 mM EGTA pH 7,2

Postup:

Postup je uveden pro vazbu příslušného množství kináz na 0,6 mg magnetických částic. Bylo odebráno 0,6 mg magnetických částic, které byly promyty 5×1 ml 50 mM MES pufru. K magnetickým částicím bylo přidáno 110 μ l 0,5 M MES pufru, 660 μ l ultračisté vody, 2,42 mg Sulfo-NHS ve 220 μ l ultračisté vody a 2,2 mg EDAC ve 110 μ l ultračisté vody a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru po dobu 30 min. Poté byly magnetické částice promyty 1×1 ml 0,5 M MES pufru a 1×1 ml 50 mM MES pufru. K magnetickým částicím byl přidán roztok příslušného množství dané kinázy v 50 mM MES

pufri, přičemž celkový objem vazebného roztoku byl 500 μ l. Byla provedena inkubace při teplotě 4 °C na rotátoru přes noc. Poté byly magnetické částice s vázanou kinázou promyty 4× 1 ml 50 mM MES pufri, 3× 1 ml HEPES pufri a resuspendovány v 0,6 ml reakčního pufri. Magnetické částice s imobilizovanými kinázami byly uchovány v HEPES pufri při teplotě 4 °C.

3.30. Stanovení míry fosforylace krátkých peptidů pomocí imobilizovaných kináz v čase

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.28

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.28
- 40 mM HEPES pufr pH 7,2

Postup:

Z magnetických částic s vázanou kinázou byly vytvořeny příslušné alikvoty, k nimž byly přidány v daném množství reakční složky tvořené reakčním pufrem, krátkým peptidem a ATP (konkrétní údaje viz kapitola 4.6.3 a 4.7.1). Byla provedena inkubace při teplotě 30 °C za třepání po celkovou dobu 3 hod, přičemž byly v odpovídajících časech sbírány frakce o daném objemu a to i s magnetickými částicemi, které byly následně odseparovány a příslušné vzorky fosforylovaného krátkého peptidu byly odsoleny a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19.

3.31. Stanovení operační stability imobilizovaných kináz

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.28

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.30

Postup:

Z 0,6 mg magnetických částic s vázanou kinázou byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány v příslušném množství reakční složky tvořené reakčním pufrem, krátkým peptidem a ATP (konkrétní údaje viz kapitola 4.6.6). Byla provedena inkubace při teplotě

30 °C za třepání po dobu 1 hod. Po inkubaci byl reakční roztok odseparován od částic a příslušné vzorky fosforylovaného krátkého peptidu byly odsoleny a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19. Magnetické částice byly promyty 4× 0,2 ml HEPES pufru a 1× 0,2 ml reakčního pufru a experiment byl opakován, přičemž bylo během 12 hod provedeno celkem 9 cyklů.

3.32. Stanovení skladovací – operační stability imobilizovaných kináz

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.28
- Azid sodný

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.30
- 40 mM HEPES pufr s 0,01% azidem sodným

Postup:

Z 0,6 mg magnetických částic s vázanou kinázou byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány v příslušném množství reakční složky tvořené reakčním pufrém, krátkým peptidem a ATP (konkrétní údaje viz kapitola 4.6.7 a 4.7.2). Byla provedena inkubace při teplotě 30 °C za třepání po dobu 6 hod nebo 1 hod. Po inkubaci byl reakční roztok odseparován od částic a příslušné vzorky fosforylovaného krátkého peptidu byly odsoleny a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19. Magnetické částice byly promyty 3× 0,2 ml HEPES pufru a uchovány v HEPES pufru s 0,01% azidem sodným, případně pouze v HEPES pufru při teplotě 4 °C. Experiment byl opakován po 7 nebo po 14 dnech, přičemž byly před každým dalším opakováním experimentu magnetické částice promyty 4× 0,2 ml HEPES pufru a 1× 0,2 ml reakčního pufru.

3.33. Fosforylace proteinu tau-441 solubilními kinázami

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.28
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.28
- 5% TFA

Postup:

Do zkumavek byly přidány reakční složky tvořené reakčním pufrem, proteinem tau-441, ATP a solubilními kinázami (konkrétní údaje viz kapitola 4.9.1). Byla provedena inkubace reakčních roztoků při teplotě 30 °C za třepání při 250 rpm po dobu 20 hod. Poté byly jednotlivé reakční roztoky okyseleny 5% TFA, zakoncentrovány při teplotě 30 °C po dobu 2 hod a zředěny vzorkovým pufrem s přídavkem 2-merkptoethanolu.

3.34. Fosforylace proteinu tau-441 imobilizovanou proteinkinázou A

Použité chemikálie:

- Chemikálie uvedené v kapitole 3.28

Použité roztoky:

- Roztoky uvedené v kapitole 3.28

Postup:

Do zkumavek Protein LoBind byly přidány v příslušném množství magnetické částice s vázanou PKA, reakční pufr, protein tau-441 a ATP (konkrétní údaje viz kapitola 4.9.2). Byla provedena inkubace za mírného otáčení při teplotě 30 °C po dobu 6 hod a 20 hod. Po inkubaci byly reakční roztoky odpipetovány a bylo provedeno uvolnění molekuly proteinu tau-441.

3.35. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku kyseliny trifluoroctové

Použité chemikálie:

- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 0,05% TFA

Postup:

Pro uvolnění proteinu tau-441 byly magnetické částice nebo zkumavky v případě kontrol promyty 2× 100 µl 0,05% TFA po dobu 2 min. Získané roztoky byly spojeny s původním odpipetovaným reakčním roztokem, zakoncentrovány při teplotě 30 °C po dobu 3 hod a poté zředěny vzorkovým pufrem s přídavkem 2-merkptoethanolu.

3.36. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku deoxycholátu sodného

Použité chemikálie:

- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 40 mM HEPES pufr pH 7,2
- 0,1% deoxycholát sodný ve 40 mM HEPES pufru
- 20% TFA
- 0,5% TFA

Postup:

Pro uvolnění proteinu tau-441 byly magnetické částice nebo zkumavky v případě kontrol promyty $1 \times 100 \mu\text{l}$ 0,1% deoxycholátu sodného ve 40 mM HEPES pufru po dobu 20 min. Roztok byl odseparován od magnetických částic, vychlazen na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a okyselen pomocí 20% TFA na celkovou koncentraci 0,5%, přičemž došlo k vysrážení. Byla provedena centrifugace při 12100 g po dobu 5 min a supernatant byl odebrán. Peleta byla resuspendována ve $100 \mu\text{l}$ 0,5% TFA a byla provedena centrifugace při 12100 g po dobu 5 min a supernatant byl odebrán a spojen s předchozím supernatantem a původním odpipetovaným reakčním roztokem. Získaný roztok byl zakoncentrován při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hod a poté zředěn vzorkovým pufrům s přidavkem 2-merkapt ethanolu.

3.37. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku Tweenu 20

Použité chemikálie:

- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 40 mM HEPES pufr pH 7,2
- 0,05% Tween 20 ve 40 mM HEPES pufru
- 0,01% Tween 20 ve 40 mM HEPES pufru

Postup:

Pro uvolnění proteinu tau-441 byly magnetické částice nebo zkumavky v případě kontrol promyty $1 \times 100 \mu\text{l}$ 0,05% (0,01%) Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru po dobu 20 min. Získaný roztok byl spojen s původním odpipetovaným reakčním roztokem a dávkován do centrifugační filtrační zkumavky Amicon-10K a doplněn ultračistou vodou na celkový objem 0,5 ml. Byla provedena centrifugace při 12100 g po dobu 5 min. Poté byl znovu doplněn objem ultračistou vodou na 0,5 ml a byla provedena centrifugace při 12100 g po dobu 30 min. Následně byl do čisté zkumavky přemístěn zakoncentrovaný vzorek pomocí centrifugace při 1000 g po dobu 2 min. Získaný vzorek byl zředěn vzorkovým pufrem s přídavkem 2-merkptoethanolu.

3.38. Uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí roztoku Tritonu[®] X-100

Použité chemikálie:

- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 40 mM HEPES pufr pH 7,2
- 0,05% Triton[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru
- 0,01% Triton[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru

Postup:

Pro uvolnění proteinu tau-441 byly magnetické částice nebo zkumavky v případě kontrol promyty $1 \times 100 \mu\text{l}$ 0,05% (0,01%) Tritonu[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru po dobu 20 min. Získaný roztok byl spojen s původním odpipetovaným reakčním roztokem a další postup zakoncentrování vzorku pomocí centrifugačních filtračních zkumavek Amicon-10K byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.37.

3.39. Štěpení proteinu tau-441 trypsinem

Použité chemikálie:

- Hydrogenuhlíčan amonný (NH_4HCO_3)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Jodacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 50 mM NH_4HCO_3
- 200 mM DTT v 50 mM NH_4HCO_3
- 400 mM IAA v 50 mM NH_4HCO_3
- 20% TFA
- Roztok trypsinu: 20 μg sequencing grade modified trypsinu ve 100 μl 50 mM NH_4HCO_3

Postup:

Vzorek proteinu tau-441 byl zakoncentrován a následně rozpuštěn v 60 μl 50 mM NH_4HCO_3 . Poté bylo přidáno 10 μl 200 mM DTT v 50 mM NH_4HCO_3 a byla provedena inkubace při teplotě 60 $^\circ\text{C}$ za třepání po dobu 30 min. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 μl 400 mM IAA v 50 mM NH_4HCO_3 a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 min. Bylo přidáno 10 μl 200 mM DTT v 50 mM NH_4HCO_3 a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Roztok trypsinu o daném objemu byl inkubován při teplotě 30 $^\circ\text{C}$ po dobu 15 min a následně přidán k roztoku s proteinem tau-441 a byla provedena inkubace při teplotě 37 $^\circ\text{C}$ přes noc. Poměr trypsinu a proteinu tau-441 pro štěpení byl 1 : 50. Poté byl roztok okyselen pomocí 20% TFA.

3.40. Obohacení fosfopeptidů

Použité chemikálie:

- Acetonitril (ACN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina mléčná 85% (LA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid amonný (NH_4OH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4) (Penta, Praha, ČR)

Použité roztoky:

- 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA
- 80% ACN s 1% TFA
- 80% ACN s 0,1% TFA
- 20% ACN s 0,5% TFA
- 1% NH_4OH

- 50% ACN s 3% NH₄OH a 50 mM Na₂HPO₄

Postup:

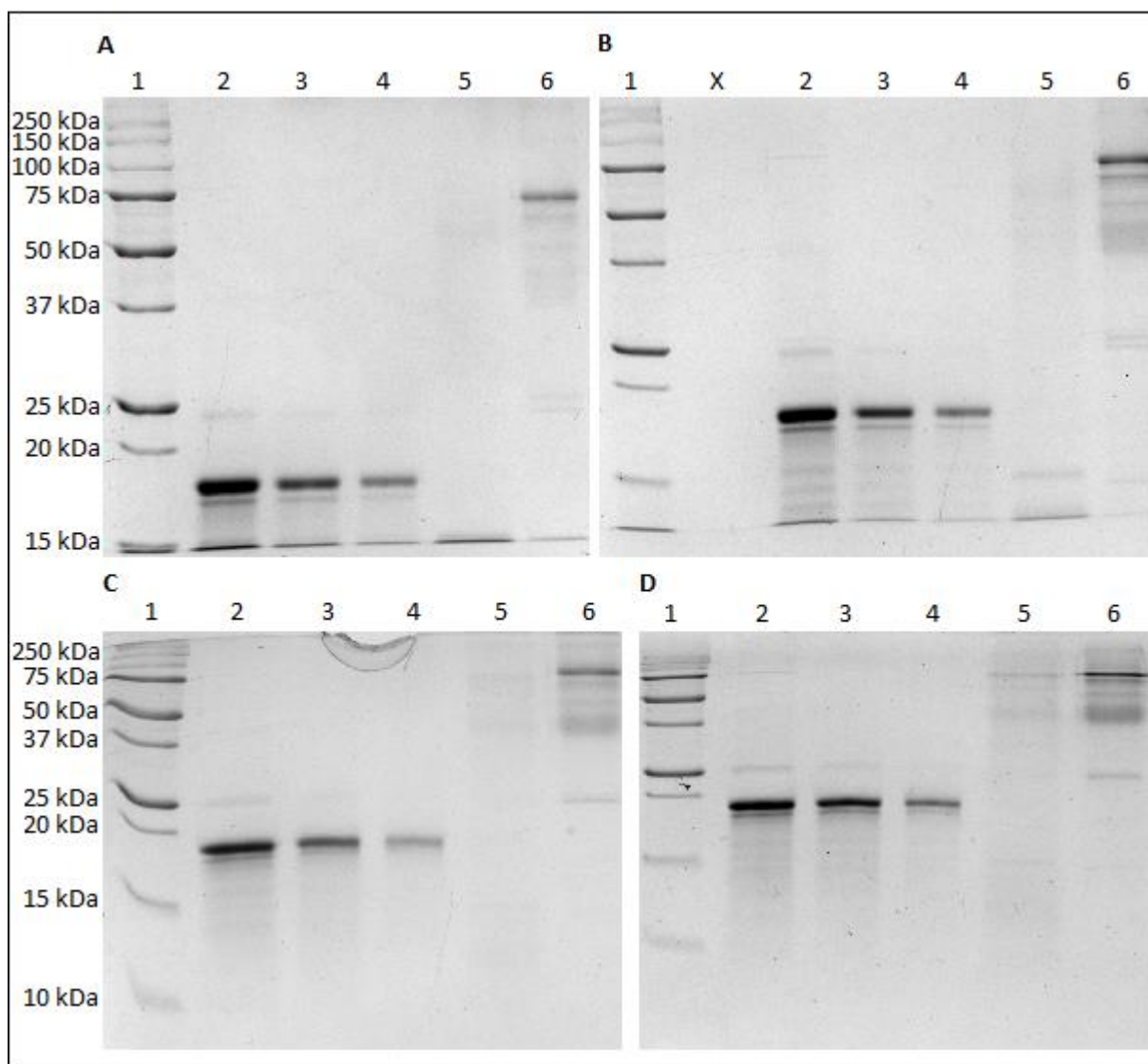
Pro obohacení fosfopeptidů byl odebrán 1 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material, který byl prostřednictvím centrifugace při 3000 g po dobu 1 min promyt 0,5 ml 80% ACN s 0,1% TFA a poté 0,5 ml 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA. Následně byl k nosiči přidán roztok obsahující fosfopeptidy v 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA o celkovém objemu 200 µl. Byla provedena inkubace při laboratorní teplotě za třepání po dobu 30 min. Následně byl odebrán roztok a nosič byl promyt 2× 0,4 ml 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA, 2× 0,4 ml 80% ACN s 1% TFA a 1× 0,4 ml 20% ACN s 0,5% TFA. Eluce fosfopeptidů byla provedena pomocí inkubace nosiče se 100 µl 1% NH₄OH na rotátoru po dobu 15 min. Získaný roztok obsahující fosfopeptidy byl následně analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19. Poté bylo k nosiči přidáno 100 µl 50% ACN s 3% NH₄OH a 50 mM Na₂HPO₄ a byla provedena inkubace na rotátoru po dobu 15 min. Roztok byl odpipetován a také analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části diplomové práce bylo mým úkolem nejprve ověřit kvalitu vybraných proteinů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a glycinu na polyakrylamidových (PAA) gelech o různé porozitě.

4.1. Separace vybraných proteinů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a glycinu

Separace vybraných proteinů zahrnujících myelinový bazický protein (MBP), protein tau-441* a protein tau-441 pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Byla porovnána separace vybraných proteinů na 12%, 13%, 16,5% a 20% gelu. Gely byly barveny roztokem Coomassie G-250 Stain podle postupu uvedeného v kapitole 3.6 a výsledky separací jsou znázorněny na Obrázku 15. Proužky příslušející myelinovému bazickému proteinu v separačních drahách 2 – 4 odpovídají teoretické molekulové hmotnosti 18,4 kDa. Z obrázku je dále patrné, že protein tau-441* přítomný v separační dráze 5 již nebyl dostatečně kvalitní a zřejmě byl fragmentován. Pozice proužku odpovídajícího proteinu tau-441 v separační dráze 6 nekorelovala s teoretickou molekulovou hmotností 45,9 kDa, což bylo způsobeno nižší mobilitou proteinu tau-441 v prostředí PAA gelu za přítomnosti SDS. Pro další experimenty byl používán pouze komerčně dodávaný protein tau-441. Na základě výsledků byl pro další experimenty separace myelinového bazického proteinu vybrán 16,5% gel, zatímco pro další experimenty separace proteinu tau-441 byl vybrán 12% gel.



Obrázek 15 Ověření kvality vybraných proteinů: myelinový bazický protein (MBP), protein tau-441* a protein tau-441 pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností proteinový, 2 – MBP (2 μ g), 3 – MBP (1 μ g), 4 – MBP (0,5 μ g), 5 – protein tau-441* (1 μ g), 6 – protein tau-441 (1 μ g) (A) 12% gel, (B) 13% gel, (C) 16,5% gel, (D) 20% gel, barveno roztokem Coomassie G-250 Stain)

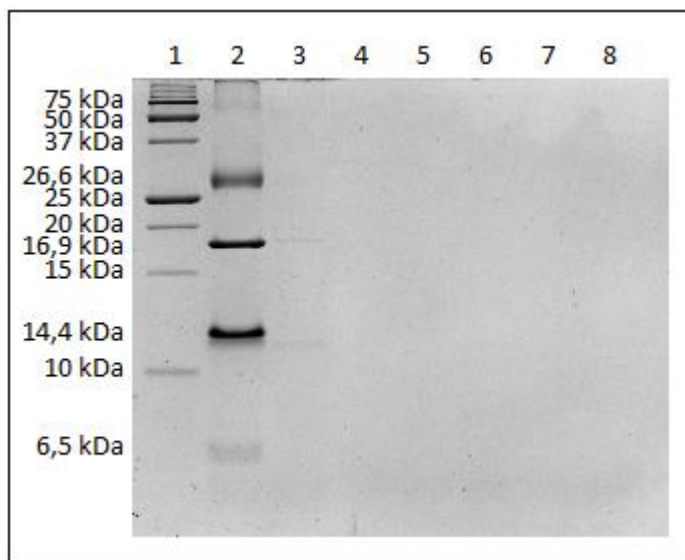
4.2. Výběr analytické metody detekce vybraných krátkých peptidů a jejich fosforylace

Dalším úkolem bylo ověřit možnosti kontroly účinnosti fosforylace vybraných krátkých peptidů pomocí metod polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a bodového přenosu na membránu.

4.2.1. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu

Nejprve byla ověřena možnost detekce krátkých peptidů zahrnujících peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (7 AA), peptidový substrát pro GSK-3 (17 AA) a peptidový

substrát pro MAPK (10 AA) pomocí metody SDS-PAGE v prostředí tricinu provedené podle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Pro tento účel byl použit gel 16,5% T, 6% C. Vzorky jednotlivých krátkých peptidů byly na gel nanášeny v množství 2 μg a 4 μg . Gel byl barven roztokem Coomassie G-250 Stain podle postupu uvedeného v kapitole 3.6 a je znázorněn na Obrázku 16.



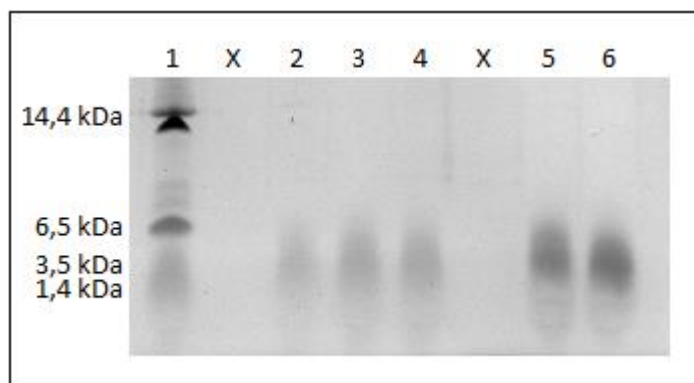
Obrázek 16 Ověření možnosti detekce vybraných krátkých peptidů: peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (7 AA), peptidový substrát pro GSK-3 (17 AA) a peptidový substrát pro MAPK (10 AA) pomocí SDS-PAGE v prostředí tricinu, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností proteinový, 2 – marker molekulových hmotností polypeptidový, 3 – kemptid (2 μg), 4 – kemptid (4 μg), 5 – peptidový substrát pro GSK-3 (2 μg), 6 – peptidový substrát pro GSK-3 (4 μg), 7 – peptidový substrát pro MAPK (2 μg), 8 – peptidový substrát pro MAPK (4 μg) (16,5% T, 6% C gel, barveno roztokem Coomassie G-250 Stain)

Přestože byla použita metoda SDS-PAGE v prostředí tricinu s PAA gelem o nízké porozitě, nebyla poslední pozice markeru molekulových hmotností pro polypeptidy odpovídající 1,4 kDa již na gelu zřetelná. Výsledky analýzy SDS-PAGE v prostředí tricinu potvrdily, že vybrané krátké peptidy nejsou tímto gelem zachytitelné. Proto byla následně zhodnocena možnost detekce vybraných krátkých peptidů pomocí modifikované metody SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidavkem močoviny.

4.2.2. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného a tricinu s přidavkem močoviny

Ověření možnosti detekce vybraných krátkých peptidů pomocí metody SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidavkem močoviny bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.4. Pro tento účel byl použit gel 18% T, 6% C s přidavkem močoviny. Vzorky jednotlivých

krátkých peptidů byly na gel nanášeny v množství 5 μg . Gel byl barven roztokem amoniakálního stříbra podle postupu uvedeného v kapitole 3.7 a je znázorněn na Obrázku 17.

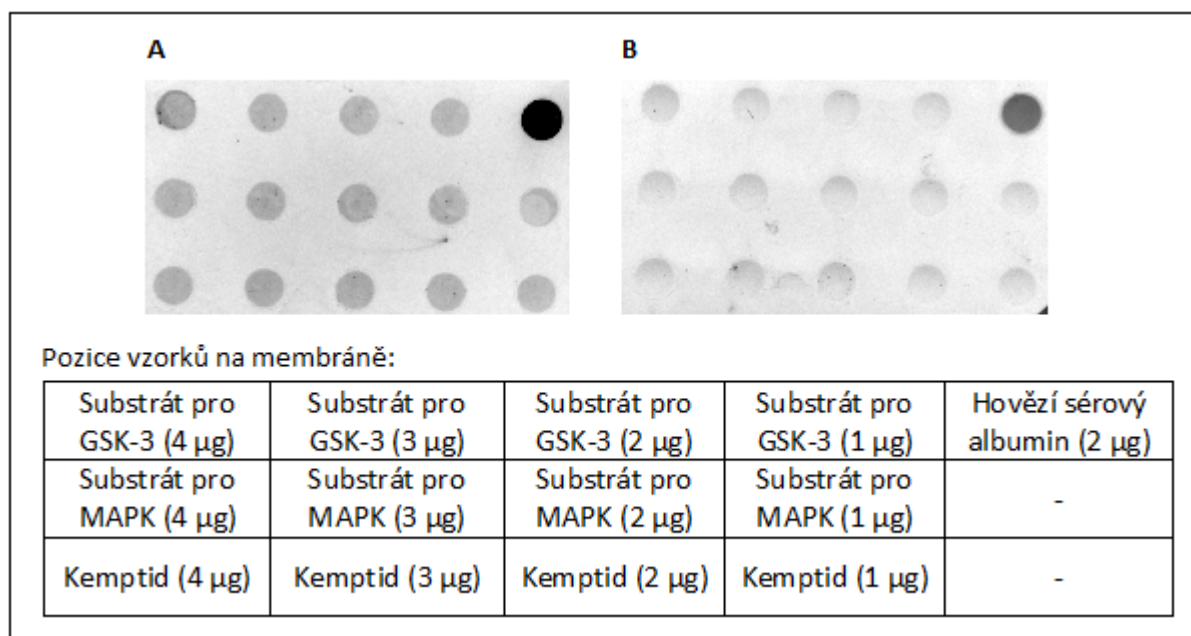


Obrázek 17 Ověření možnosti detekce vybraných krátkých peptidů: peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (7 AA), peptidový substrát pro GSK-3 (17 AA) a peptidový substrát pro MAPK (10 AA) pomocí SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidavkem močoviny, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností polypeptidový, 2 – kemptid (5 μg), 3 – peptidový substrát pro GSK-3 (5 μg), 4 – peptidový substrát pro MAPK (5 μg), 5 – kemptid (5 μg), 2-merkapt ethanol, 6 – peptidový substrát pro GSK-3 (5 μg), 2-merkapt ethanol (18% T, 6% C gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra)

Při použití metody SDS-PAGE v prostředí tricinu s přidavkem močoviny a s následným barvením gelu roztokem amoniakálního stříbra již byly proužky odpovídající krátkým peptidům po obarvení na gelu v zóně předpokládané molekulové hmotnosti zřetelné, nicméně pro detekci míry fosforylace krátkého peptidu není tato metoda vhodná.

4.2.3. Detekce vybraných krátkých peptidů pomocí metody bodového přenosu na membránu

Ověření možnosti detekce vybraných krátkých peptidů pomocí metody bodového přenosu na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) a nitrocelulózovou (NC) membránu bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.10. Vzorky jednotlivých krátkých peptidů byly na vybranou membránu nanášeny v množství 4 μg , 3 μg , 2 μg a 1 μg . Jako pozitivní kontrola byl použit protein o vyšší molekulové hmotnosti, konkrétně hovězí sérový albumin (BSA) v množství 2 μg . Membrány byly barveny roztokem koloidního zlata podle postupu uvedeného v kapitole 3.12 a jsou znázorněny na Obrázku 18.



Obrázek 18 Ověření možnosti detekce vybraných krátkých peptidů: peptidový substrát pro PKA označovaný kemptid (7 AA), peptidový substrát pro GSK-3 (17 AA) a peptidový substrát pro MAPK (10 AA) metodou bodového přenosu na membránu, pozitivní kontrolu představuje hovězí sérový albumin (A) PVDF membrána, B) NC membrána, barveno roztokem koloidního zlata)

Při provedení metody bodového přenosu nebyly ve srovnání s pozitivní kontrolou (BSA, 66 kDa) vybrané krátké peptidy dostatečně zřetelné ani na jednom z typů použitých membrán. Vzhledem k uvedeným výsledkům byla pro kontrolu účinnosti fosforylace krátkých peptidů vybrána instrumentálně náročnější avšak osvědčená metoda hmotností spektrometrie (viz kapitola 4.6 a 4.7).

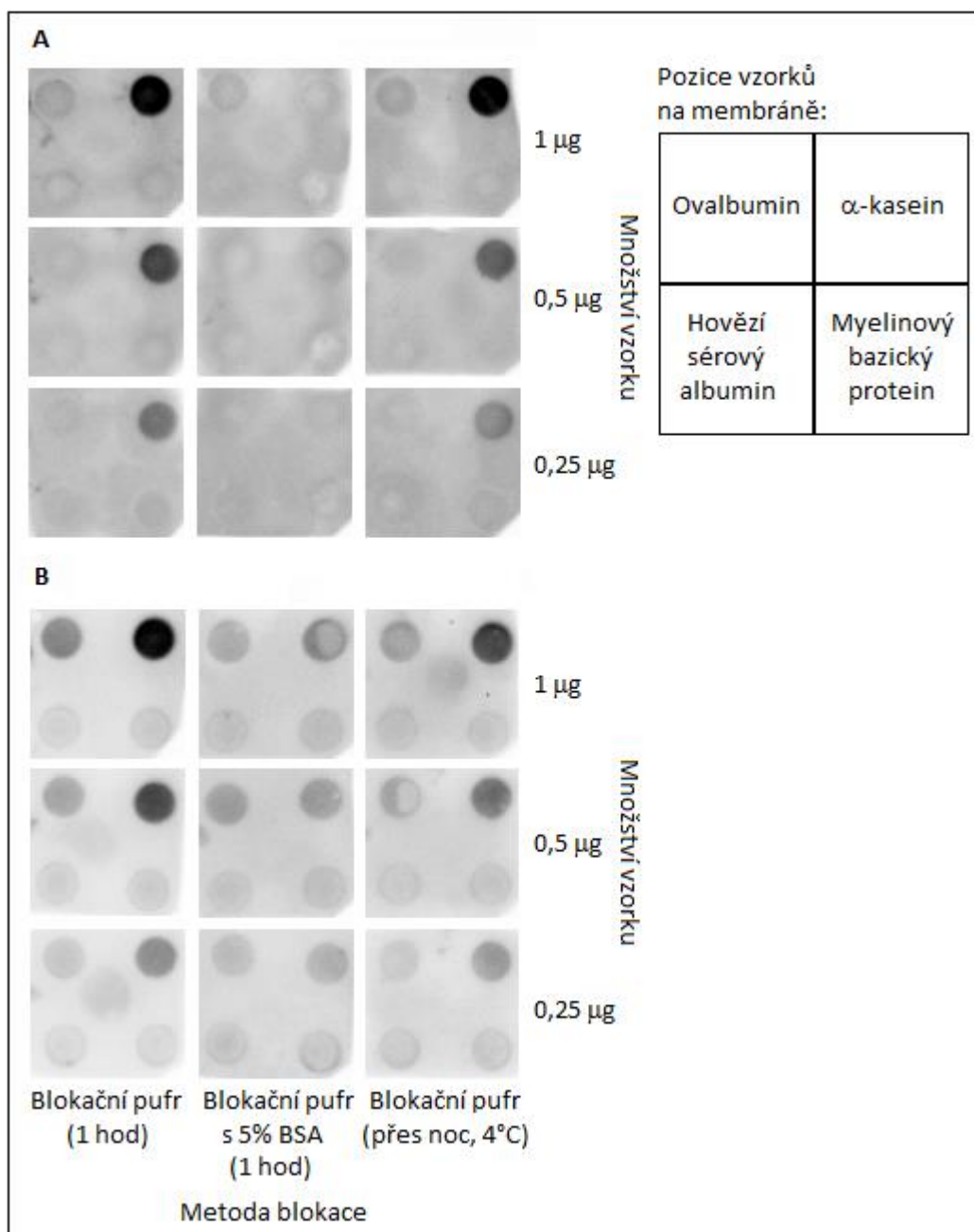
4.3. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO

Součástí úkolů v rámci diplomové práce bylo vybrat a zavést rychlou a přístrojově méně náročnou metodu pro průkaz fosforylace proteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s avidin-HRP. Nejprve byla provedena detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu za účelem výběru vhodné membrány a optimalizace metody její blokace. Následně byla optimalizována detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu. Nakonec byla provedena optimalizace metody v uspořádání na mikrotitrační destičce.

4.3.1. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu

Detekce vybraných fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na NC a PVDF membránu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.16. Na vybranou membránu byly aplikovány vzorky fosfoproteinů zahrnujících ovalbumin, α -kasein a myelinový bazický protein. Jako negativní kontrola byl použit nefosforylovaný protein hovězí sérový albumin. Jednotlivé vzorky byly dávkovány na membránu v množství 1 μ g, 0,5 μ g a 0,25 μ g. Byla provedena optimalizace blokace membrány, přičemž byla membrána blokována a) blokačním pufrém při laboratorní teplotě po dobu 1 hod, b) blokačním pufrém s přídavkem 5% BSA při laboratorní teplotě po dobu 1 hod a c) blokačním pufrém při teplotě 4 °C přes noc. Membrány po detekci fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO jsou znázorněny na Obrázku 19.

Při výběru vhodné membrány pro detekci fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO byla hodnocena míra nespecifické sorpce (pozadí) a jako vhodnější byla vybrána PVDF membrána. Byly porovnány tři metody blokace membrány, z nichž byla zvolena jako optimální blokace blokačním pufrém při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Intenzita zbarvení membrány v místě aplikace jednotlivých fosfoproteinů odpovídala míře jejich fosforylace. Pro další experimenty detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu byla na základě výše uvedených výsledků vybrána PVDF membrána a její blokace blokačním pufrém při laboratorní teplotě po dobu 1 hod.



Obrázek 19 Optimalizace detekce vybraných fosfoproteinů: ovalbumin, α -kasein a myelinový bazický protein pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s bodovým přenosem na membránu, negativní kontrolu představuje hovězí sérový albumin (A) NC membrána, B) PVDF membrána)

4.3.2. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu

Detekce vybraných fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.17. Vzorky tvořily kalibrační řadu směsi tří fosfoproteinů, přičemž ovalbumin a α -kasein byly zastoupeny v jednotlivých vzorcích v množství 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng, 1,56 ng a 0,78 ng, zatímco myelinový bazický

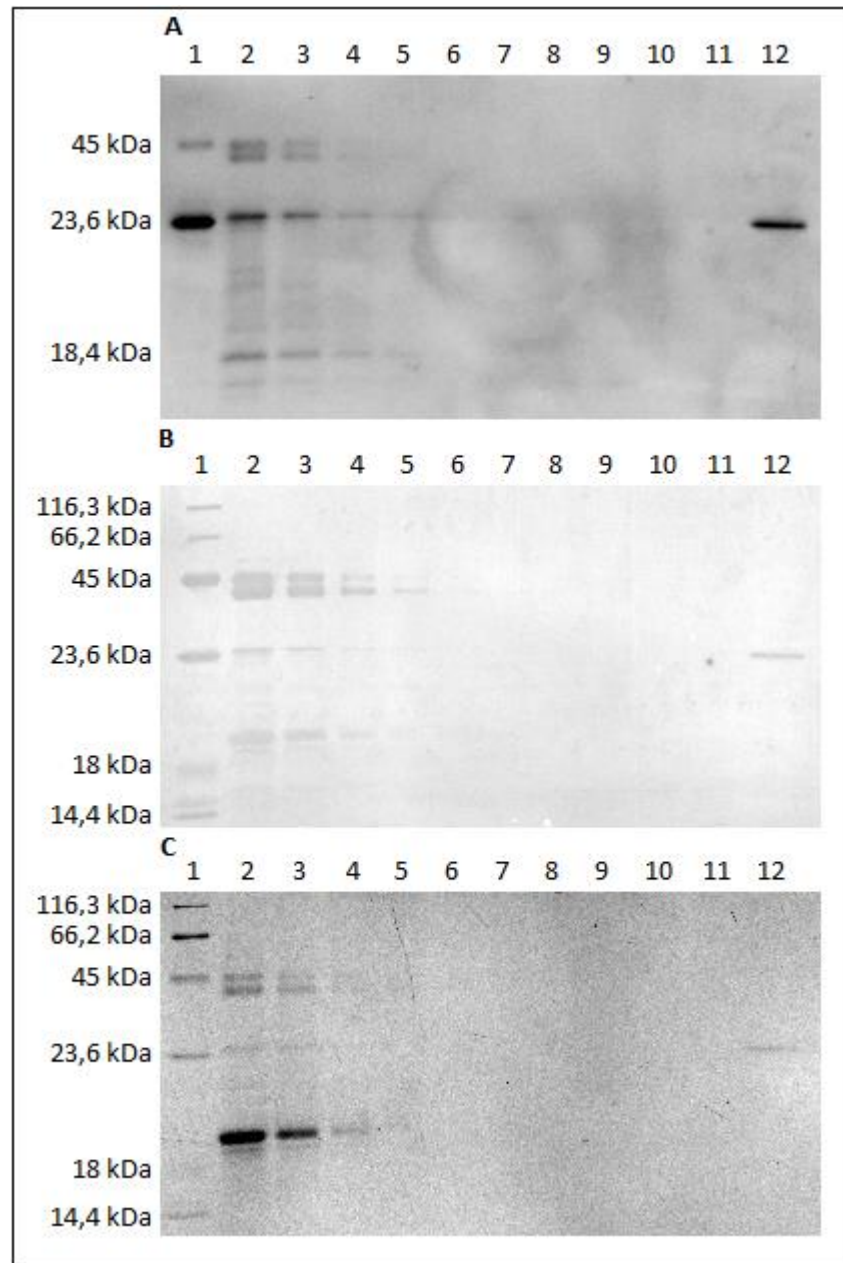
protein byl ve vzorcích zastoupen ve dvojnásobném množství tedy 800 ng, 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng a 1,56 ng. Byly provedeny tři způsoby úpravy vzorků. V prvním případě byly vzorky zředěny vzorkovým pufrům bez přídavku DTT. V druhém případě byly vzorky zředěny vzorkovým pufrům s přídavkem DTT. Při třetím způsobu úpravy vzorků byly vzorky zředěny vzorkovým pufrům s přídavkem DTT a inkubovány s IAA.

Separace připravených vzorků fosfoproteinů pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu s 16,5% gely byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Následně byl proveden polosuchý westernový přenos separovaných fosfoproteinů na PVDF membrány podle postupu uvedeného v kapitole 3.9. Gely po transferu byly barveny roztokem Coomassie G-250 Stain podle postupu uvedeného v kapitole 3.6. Membrány po transferu byly barveny pomocí dendrimera pIMAGO podle postupu uvedeného v kapitole 3.17. Nakonec byly membrány barveny roztokem koloidního zlata podle postupu uvedeného v kapitole 3.12. Na Obrázku 20 je znázorněna membrána a gel po barvení pro případ úpravy vzorků zředěním vzorkovým pufrům s přídavkem DTT a inkubací s IAA.

Marker molekulových hmotností pro detekci fosfoproteinů je tvořen čtyřmi nefosforylovanými proteiny o molekulové hmotnosti 116,3 kDa, 66,2 kDa, 18 kDa a 14,4 kDa a dvěma fosfoproteiny, které jsou představovány ovalbuminem o molekulové hmotnosti 45 kDa a β -kaseinem o molekulové hmotnosti 23,6 kDa. Jak je zřejmé z Obrázku 20, při barvení separovaných proteinů na gelu po transferu roztokem Coomassie G-250 Stain nebo na PVDF membráně po transferu roztokem koloidního zlata jsou detekovány nefosforylované i fosforylované proteiny markeru molekulových hmotností. Zatímco při barvení PVDF membrány pomocí dendrimera pIMAGO s chemiluminiscenční detekcí jsou specificky detekovány pouze fosfoproteiny markeru molekulových hmotností.

Při detekci fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem bylo v případě vzorků upravených zředěním vzorkovým pufrům bez přídavku DTT dosaženo meze detekce ovalbuminu a myelinového bazického proteinu 200 ng a α -kaseinu 100 ng (výsledky neukázány). Při úpravě vzorků zředěním vzorkovým pufrům s přídavkem DTT bylo dosaženo meze detekce ovalbuminu 100 ng, α -kaseinu 50 ng a myelinového bazického proteinu 200 ng (výsledky neukázány). Zlepšení citlivosti bylo dosaženo při úpravě vzorků zředěním vzorkovým pufrům s přídavkem DTT a následnou inkubací s IAA, přičemž byla mez detekce ovalbuminu a myelinového bazického proteinu 100 ng a α -kaseinu 50 ng, jak je zřejmé z Obrázku 20. Pro detekci fosfoproteinů pomocí

dendrimeru pIMAGO lze na základě uvedených výsledků považovat za nejvhodnější úpravu vzorků jejich zředěním vzorkovým pufrům s přidavkem DTT a následnou inkubací s IAA. Pro ověření, zda protein byl nebo nebyl fosforylován a do jaké míry, je nutné současně použít jednu s výše zmíněných barvicích technik, přičemž obě jsou srovnatelně citlivé.

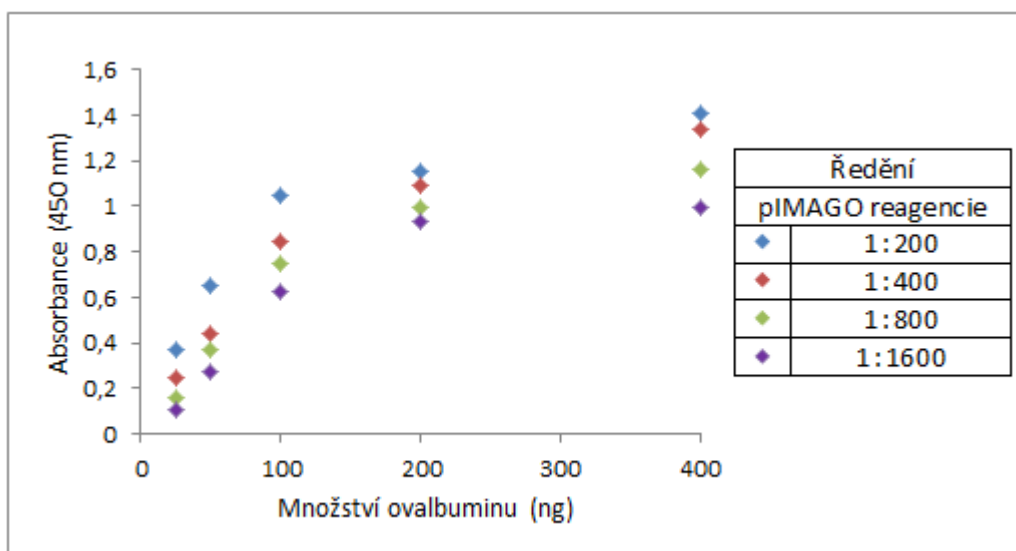


Obrázek 20 Detekce vybraných fosfoproteinů: ovalbumin (44,3 kDa), α -kasein (25 kDa) a myelinový bazický protein (18,4 kDa), vzorky zředěny vzorkovým pufrům s přidavkem DTT a inkubovány s IAA, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností pro detekci fosfoproteinů, 2 – ovalbumin (400 ng), α -kasein (400 ng), MBP (800 ng), 3 – ovalbumin (200 ng), α -kasein (200 ng), MBP (400 ng), 4 – ovalbumin (100 ng), α -kasein (100 ng), MBP (200 ng), 5 – ovalbumin (50 ng), α -kasein (50 ng), MBP (100 ng), 6 – ovalbumin (25 ng), α -kasein (25 ng), MBP (50 ng), 7 – ovalbumin (12,5 ng), α -kasein (12,5 ng), MBP (25 ng), 8 – ovalbumin (6,25 ng), α -kasein (6,25 ng), MBP (12,5 ng), 9 – ovalbumin (3,12 ng), α -kasein (3,12 ng), MBP (6,25 ng), 10 – ovalbumin (1,56 ng), α -kasein (1,56 ng), MBP (3,12 ng), 11 – ovalbumin (0,78 ng), α -kasein (0,78 ng), MBP (1,56 ng), 12 – kontrolní fosfoprotein (A) PVDF membrána, detekce pomocí dendrimeru pIMAGO, B) PVDF membrána, barveno roztokem koloidního zlata, C) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 16,5% gel, gel po transferu barven roztokem Coomassie G-250 Stain)

4.3.3. Detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO v uspořádání na mikrotitrační destičce

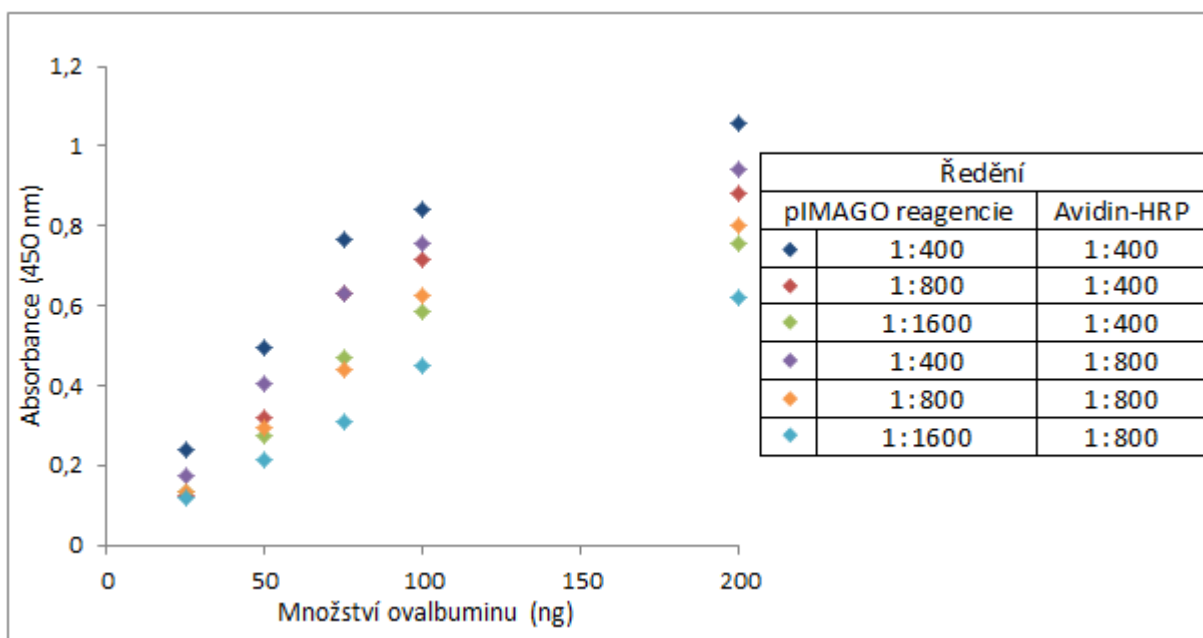
Detekce fosforylovaných proteinů pomocí dendrimeru pIMAGO je možná i v jamkách mikrotitrační destičky podle postupu uvedeného v kapitole 3.18. Při prvním provedení experimentu byla použita mikrotitrační destička s upraveným povrchem jamek pro sorpci proteinů. Do jamek vždy dvou sloupců destičky byl dávkován protein ovalbumin v množství 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 0 ng. Biotinylovaná pIMAGO reagencie byla zředěna pIMAGO pufrém v poměru 1 : 200 a poté dávkována do jamek lichých řádků destičky, přičemž do jamek sudých řádků destičky byl dávkován pouze pIMAGO pufr. Komplex avidin-HRP byl zředěn blokačním roztokem v poměru 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 a 1 : 800 a dávkován do jamek vždy dvou řádků destičky. Z naměřených hodnot absorbance při vlnové délce 450 nm byly patrné příliš vysoké hodnoty absorbance slepého vzorku (výsledky neukázány). Příčinou by mohla být vysoká nespecifická vazba některé z reagensů na destičku.

Z uvedeného důvodu byla při druhém provedení experimentu použita mikrotitrační destička Anicrin bez speciální úpravy vnitřního povrchu jamek. Do jamek vždy dvou sloupců destičky byl dávkován protein ovalbumin v množství 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 0 ng. Biotinylovaná pIMAGO reagencie byla zředěna pIMAGO pufrém v poměru 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 a 1 : 1600 a dávkována postupně do jamek lichých řádků destičky, přičemž do jamek sudých řádků destičky byl dávkován pouze pIMAGO pufr. Komplex avidin-HRP byl zředěn blokačním roztokem v poměru 1 : 400 a dávkován do jamek všech řádků destičky. Pro jednotlivá ředění biotinylované pIMAGO reagencie byly z průměrných hodnot naměřené absorbance ze dvou opakování a po odečtení absorbance slepého vzorku sestrojeny kalibrační závislosti vyjadřující závislost absorbance na množství ovalbuminu, jak je znázorněno v Grafu 1. Významného snížení nespecifického pozadí oproti předchozímu experimentu bylo dosaženo změnou použité mikrotitrační destičky. Nicméně zejména u ředění biotinylované pIMAGO reagencie 1 : 200 a 1 : 400 byly pozorovány hodnoty absorbance slepého vzorku stále mírně zvýšené (0,371 a 0,262). Z tohoto důvodu bylo při dalším provedení experimentu znovu optimalizováno nejen ředění biotinylované pIMAGO reagencie, ale také ředění komplexu avidin-HRP. Z kalibračních závislostí lze přibližně odečíst lineární rozsah metody, který je přibližně do 150 ng ovalbuminu, proto bylo při dalším provedení experimentu také sníženo množství ovalbuminu vázaného na destičku.



Graf 1 Graf závislosti absorbance na množství ovalbuminu (jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené absorbance ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku)

Při třetím provedení experimentu byla opět použita mikrotitrační destička Anicrin. Do jamek vždy dvou sloupců destičky byl dávkován protein ovalbumin v množství 200 ng, 100 ng, 75 ng, 50 ng, 25 ng a 0 ng. Biotinylovaná pIMAGO reagencie byla zředěna pIMAGO pufrem v poměru 1 : 400, 1 : 800 a 1 : 1600 a dávkována do jamek destičky. Komplex avidin-HRP byl zředěn blokačním roztokem v poměru 1 : 400 a 1 : 800 a dávkován do jamek destičky. Pro jednotlivá ředění biotinylované pIMAGO reagencie a komplexu avidin-HRP byla z průměrných hodnot naměřené absorbance ze dvou opakování a po odečtení absorbance slepého vzorku sestrojena kalibrační závislost vyjadřující závislost absorbance na množství ovalbuminu, jak je znázorněno v Grafu 2. Zejména u ředění biotinylované pIMAGO reagencie 1 : 400 a komplexu avidin-HRP 1 : 400 lze pozorovat hodnotu absorbance slepého vzorku stále mírně zvýšenou (0,252). Nicméně při ředění biotinylované pIMAGO reagencie 1 : 400 a komplexu avidin-HRP 1 : 800 již bylo dosaženo snížení hodnoty absorbance slepého vzorku (0,190), přičemž ze směrnice odpovídající kalibrační závislosti lze usuzovat na přijatelnou citlivost metody. Z kalibračních závislostí lze přibližně odečíst lineární rozsah metody, který je přibližně do 150 ng ovalbuminu.



Graf 2 Graf závislosti absorbance na množství ovalbuminu (jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené absorbance ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku)

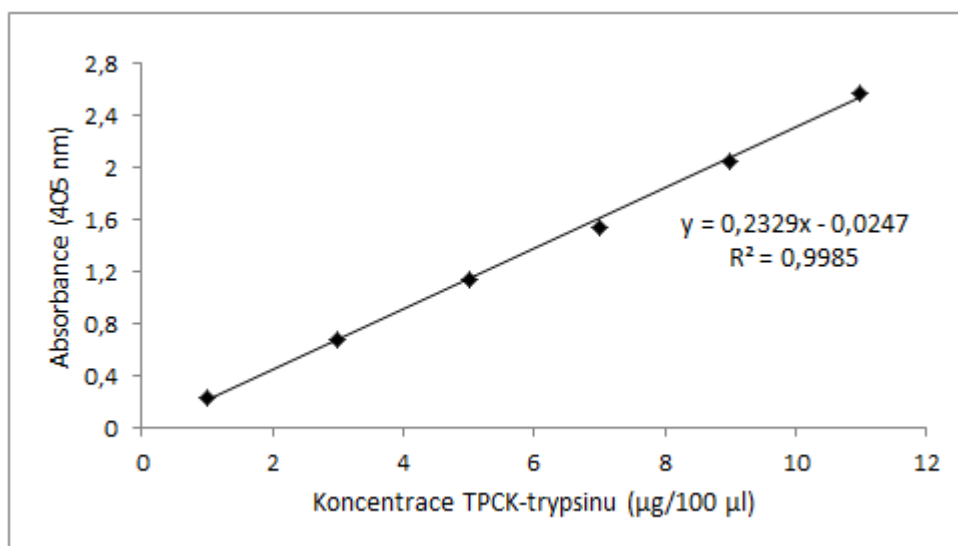
Při provedení detekce fosfoproteinů pomocí dendrimera pIMAGO v uspořádání na mikrotitrační destičce bylo dosaženo vyšší citlivosti metody než v případě kombinace s polosuchým westernovým přenosem. Tato metoda s mikrotitrační destičkou Anicrin je dle našich dosažených výsledků vhodná pro monitorování fosforylace proteinů.

4.4. Imobilizace modelových enzymů na magnetické částice a stanovení jejich aktivity

Další část diplomové práce byla zaměřena na imobilizaci modelových enzymů, konkrétně dvou proteolytických enzymů TPCK-trypsinu a α -chymotrypsinu a enzymu používaného pro defosforylaci proteinů označovaného alkalická fosfatáza, na magnetické částice včetně stanovení enzymové aktivity.

4.4.1. Imobilizace TPCK-trypsinu na magnetické částice a stanovení jeho aktivity

Imobilizace 3 mg TPCK-trypsinu na 1 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.20 a stanovení jeho aktivity bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.21. Průměrné hodnoty naměřené absorbance kalibračních roztoků ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byly použity pro sestavení kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci TPCK-trypsinu, jak je znázorněno v Grafu 3.



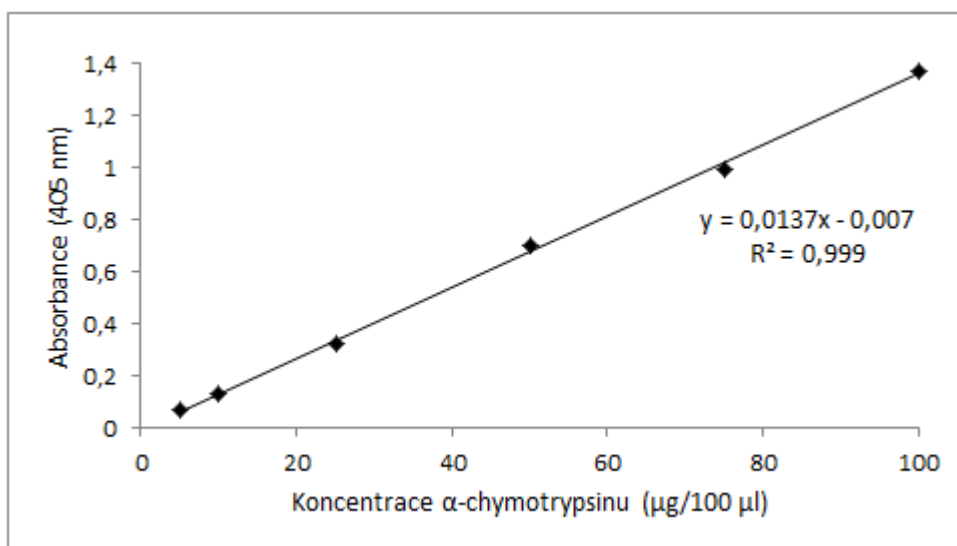
Graf 3 Graf závislosti absorbance na koncentraci TPCK-trypsinu (jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené absorbance ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku)

Průměrná hodnota naměřené absorbance vzorku imobilizovaného TPCK-trypsinu ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byla 0,505 (vztaženo k 0,1 mg nosiče). S využitím rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace imobilizovaného TPCK-trypsinu odpovídající 22,7 µg na 1 mg magnetických částic a jeho aktivita odpovídající 292,5 U na 1 mg magnetických částic. Tento nosič s navázaným TPCK-trypsinem byl poté použit pro štěpení myelinového bazického proteinu (viz kapitola 4.5).

4.4.2. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetické částice a stanovení jeho aktivity

Imobilizace 3 mg α -chymotrypsinu na 1 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.22 a stanovení jeho aktivity bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.23. Průměrné hodnoty naměřené absorbance kalibračních roztoků ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byly použity pro sestavení kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci α -chymotrypsinu, jak je znázorněno v Grafu 4.

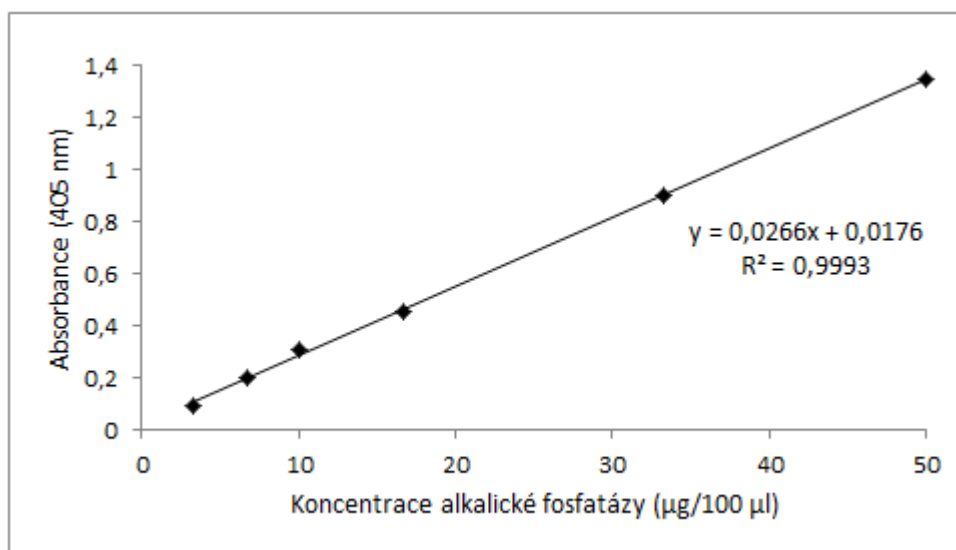
Průměrná hodnota naměřené absorbance vzorku imobilizovaného α -chymotrypsinu ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byla 0,079 (vztaženo k 0,1 mg nosiče). S využitím rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace imobilizovaného α -chymotrypsinu odpovídající 62,8 µg na 1 mg magnetických částic a jeho aktivita odpovídající 3,6 U na 1 mg magnetických částic. Tento nosič s navázaným α -chymotrypsinem byl poté použit pro štěpení myelinového bazického proteinu (viz kapitola 4.5).



Graf 4 Graf závislosti absorpce na koncentraci α-chymotrypsinu (jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené absorpce ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku)

4.4.3. Imobilizace alkalické fosfatázy na magnetické částice a stanovení její aktivity

Imobilizace 3 mg alkalické fosfatázy na 1 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.24 a stanovení její aktivity bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.25. Průměrné hodnoty naměřené absorpce kalibračních roztoků ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byly použity pro sestavení kalibrační přímky závislosti absorpce na koncentraci alkalické fosfatázy, jak je znázorněno v Grafu 5.



Graf 5 Graf závislosti absorpce na koncentraci alkalické fosfatázy (jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené absorpce ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku)

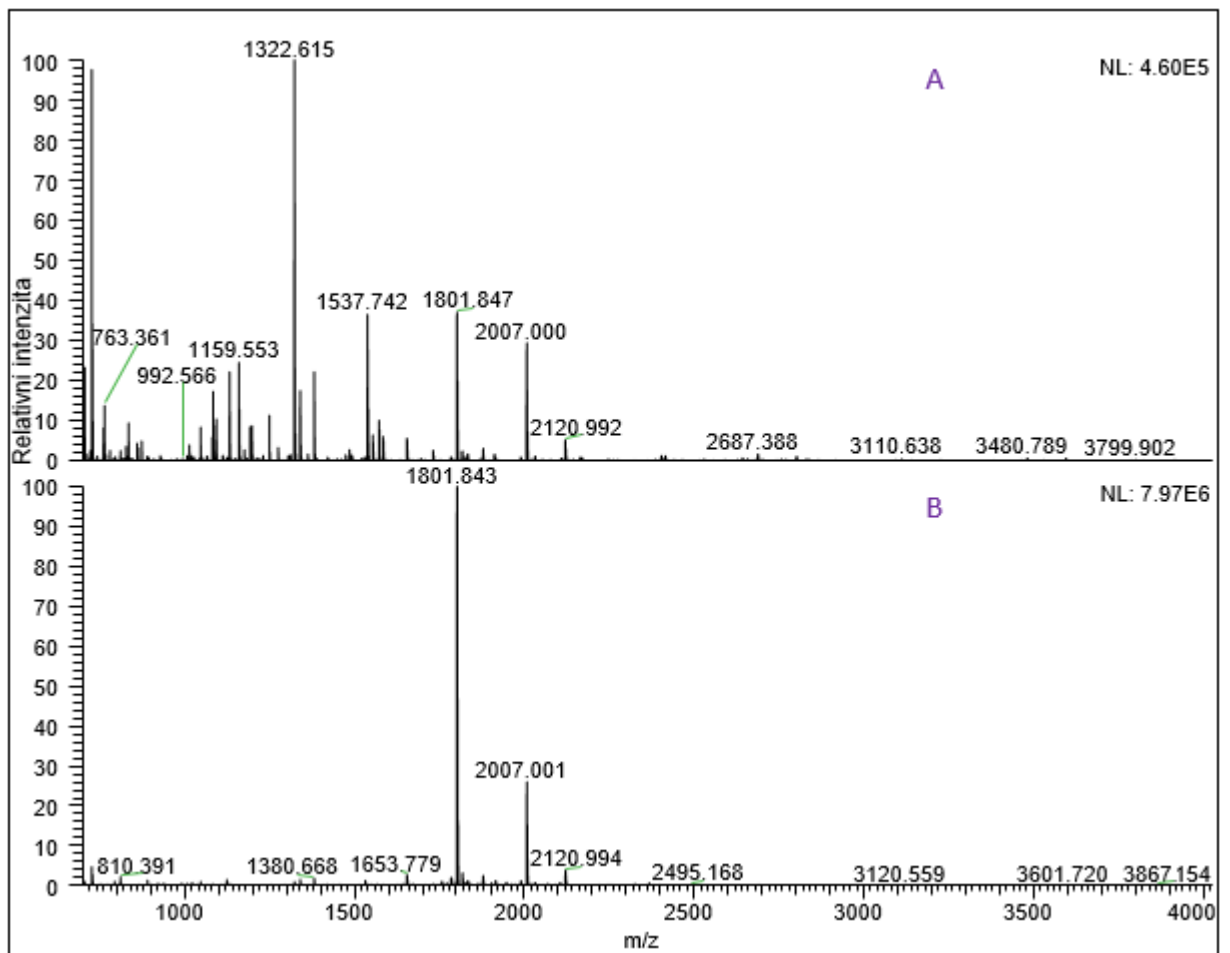
Průměrná hodnota naměřené absorbance vzorku imobilizované alkalické fosfatázy ze dvou opakování a po odečtení slepého vzorku byla 0,041 (vztaženo k 0,1 mg nosiče). S využitím rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace imobilizované alkalické fosfatázy odpovídající 8,8 μg na 1 mg magnetických částic a její aktivita odpovídající 0,03 U na 1 mg magnetických částic. Uvedené hodnoty byly vypočteny i přesto, že hodnota absorbance vzorku byla nižší než absorbance odpovídající prvnímu bodu kalibrační závislosti. Dle dosažených výsledků lze konstatovat, že nosič vykazuje extrémně nízkou aktivitu vzhledem k množství vázaného enzymu. Domníváme se, že mohla být velice nízká účinnost vazby nebo byla alkalická fosfatáza po vazbě inaktivována. Tento nosič s navázanou alkalickou fosfatázou nebyl pro další experimenty použit.

4.5. Štěpení myelinového bazického proteinu imobilizovanými proteolytickými enzymy

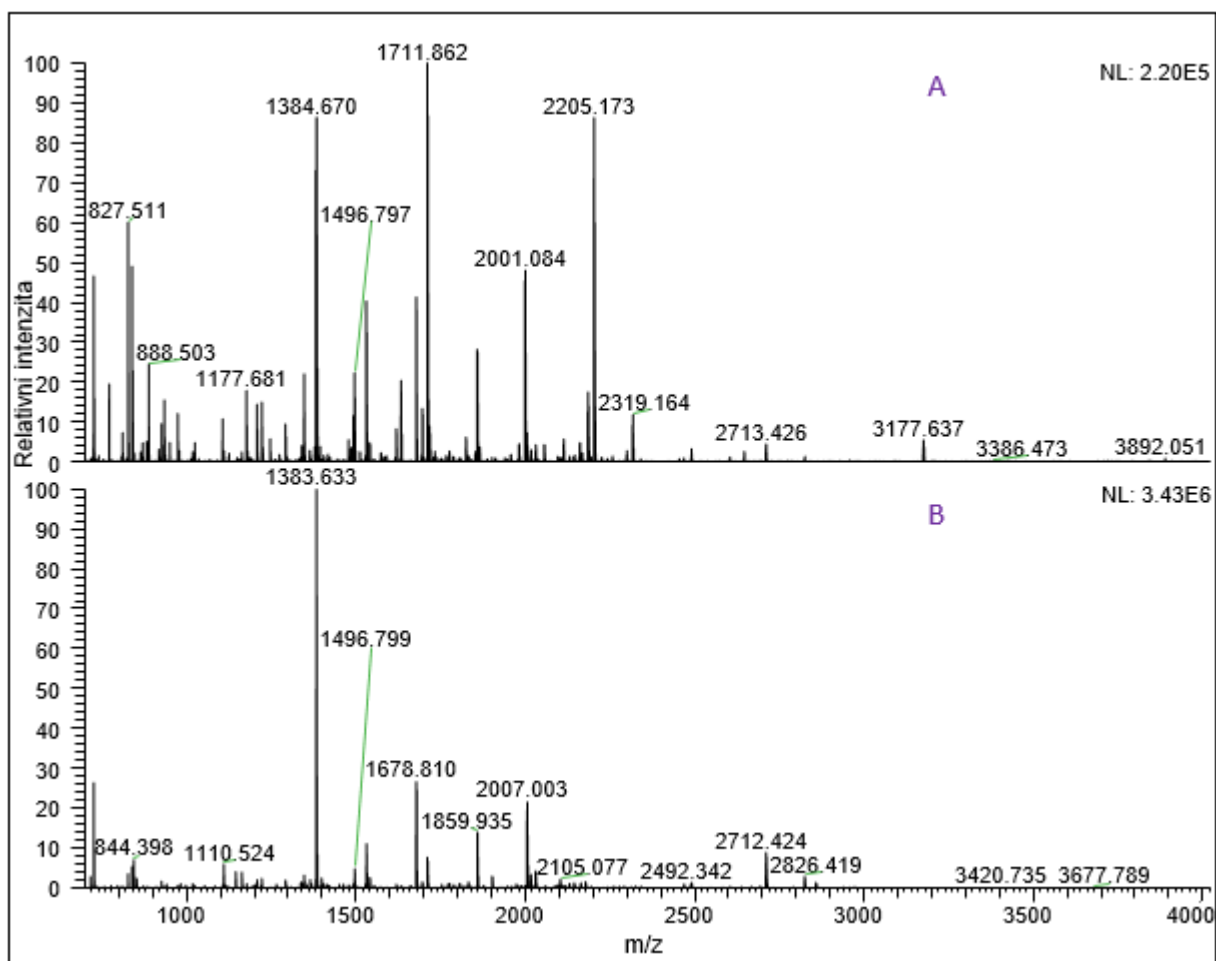
Proteolytické enzymy zahrnující TPCK-trypsin a α -chymotrypsin byly imobilizovány na magnetické částice podle postupu uvedeného v kapitole 3.20 a 3.22 a byla stanovena jejich aktivita podle postupu uvedeného v kapitole 3.21 a 3.23. Pro enzymatické štěpení byl použit rozvolněný, případně nerozvolněný, redukovaný a alkylovaný myelinový bazický protein podle postupu uvedeného v kapitole 3.26. Štěpení MBP bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.27.

Získané produkty štěpení MBP odebrané v čase 3 hod byly odsoleny a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19, jak je znázorněno na Obrázku 21 a 22. Výsledky analýzy produktů štěpení MBP pomocí hmotnostní spektrometrie byly vyhodnoceny metodou Peptide Mass Fingerprinting v online programu MS-Fit, který je součástí ProteinProspector (v 5.19.1). Experimentální data byla porovnána pomocí MS-Fit proti Swiss-Prot databázi. V případě štěpení rozvolněného MBP TPCK-trypsinem bylo dosaženo 81,7% sekvenčního pokrytí, zatímco při štěpení nerozvolněného MBP TPCK-trypsinem bylo dosaženo 69,8% sekvenčního pokrytí. V případě štěpení rozvolněného MBP α -chymotrypsinem bylo dosaženo 32% sekvenčního pokrytí, zatímco při štěpení nerozvolněného MBP α -chymotrypsinem bylo dosaženo 66,9% sekvenčního pokrytí. Při analýze produktů štěpení MBP pomocí hmotnostní spektrometrie se pro štěpení TPCK-trypsinem osvědčilo pracovat s rozvolněným MBP. Potvrdilo se, že oba nosiče s imobilizovaným enzymem jsou vhodné pro cílenou fragmentaci

proteinů před MS analýzou. Pro fragmentaci proteinu tau-441 však tyto nosiče s imobilizovanými enzymy nebyly použity.

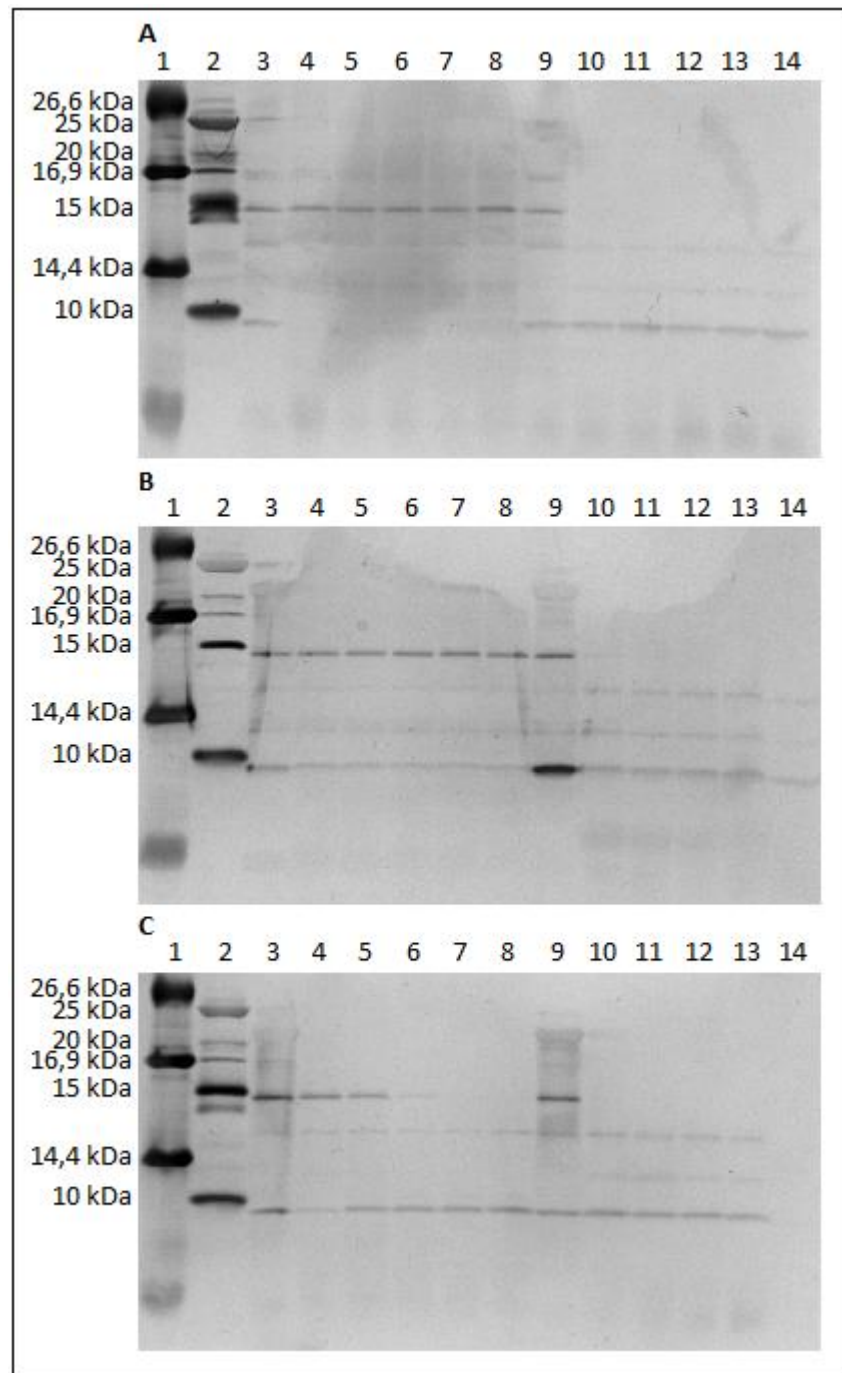


Obrázek 21 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum MBP A) rozvolněného pomocí RapiGest SF Surfactantu, B) nerozvolněného, s následným naštěpením pomocí imobilizovaného TPCK-trypsinu (matrice CHCA)



Obrázek 22 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum MBP A) rozvolněného pomocí RapiGest SF Surfaktantu, B) nerozvolněného, s následným naštěpením pomocí imobilizovaného α -chymotrypsinu (matrice CHCA)

Produkty štěpení modelového proteinu MBP byly také analyzovány pomocí SDS-PAGE v prostředí tricinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Gely byly barveny pomocí ProteoSilver™ Silver Stain Kit podle postupu uvedeného v kapitole 3.8. Z uvedených výsledků znázorněných na Obrázku 23 lze usuzovat, že není nutné MBP před vlastním štěpením rozvolňovat například pomocí roztoku RapiGest SF Surfaktant, případně provést redukcí a alkylací.



Obrázek 23 Detekce produktů štěpení rozvolněného pomocí roztoku RapiGest SF Surfaktant, případně nerozvolněného, redukovaného a alkylovaného MBP pomocí SDS-PAGE v prostředí tricinu, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností polypeptidový, 2 – marker molekulových hmotností proteinový, 3 – MBP (2 µg) rozvolněný, 4 – MBP (2 µg) rozvolněný, štěpený (15 min), 5 – MBP (2 µg) rozvolněný, štěpený (30 min), 6 – MBP (2 µg) rozvolněný, štěpený (1 hod), 7 – MBP (2 µg) rozvolněný, štěpený (2 hod), 8 – MBP (2 µg) rozvolněný, štěpený (3 hod), 9 – MBP (2 µg) nerozvolněný, 10 – MBP (2 µg) nerozvolněný, štěpený (15 min), 11 – MBP (2 µg) nerozvolněný, štěpený (30 min), 12 – MBP (2 µg) nerozvolněný, štěpený (1 hod), 13 – MBP (2 µg) nerozvolněný, štěpený (2 hod), 14 – MBP (2 µg) nerozvolněný, štěpený (3 hod) (štěpení imobilizovaným A) TPCK-trypsinem, B) α -chymotrypsinem, C) TPCK-trypsinem a α -chymotrypsinem, 16,5% T, 6% C gel, barveno pomocí ProteoSilverTM Silver Stain Kit)

4.6. Fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí proteinkinázy A

Součástí úkolů v rámci diplomové práce bylo zavést metodu pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů/proteinů. Metoda vycházela z principu uvedeného Kemp (1977). Metoda byla založena na reakci krátkého peptidu s ATP za katalýzy kinázou v přítomnosti Mg^{2+} v prostředí pH 7,2 za vzniku fosforylovaného peptidu a ADP. Vyhodnocení aktivity kináz bylo provedeno pomocí hmotnostní spektrometrie jako procentuální míra fosforylace peptidu na základě poměru relativní intenzity píku odpovídajícího fosforylované formě peptidu a celkové intenzity signálu dané součtem relativních intenzit píků odpovídajících fosforylované a nefosforylované formě peptidu podle postupu uvedeného Bowley (2005).

4.6.1. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí solubilní proteinkinázy A v čase

Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí solubilní PKA v čase bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.28. Reakční složky byly tvořeny reakčním pufrem, solubilní PKA v celkové koncentraci 16,6 nM, 8,3 nM, 6,1 nM, 4,1 nM a 2,1 nM, kemptidem (1) v množství 10 μ g a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každou koncentraci solubilní PKA byl 100 μ l. Reakční frakce o objemu odpovídajícím 1 μ g kemptidu byly sbírány v časech 5 min, 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod. Vybraná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra kemptidu (1) fosforylovaného solubilní PKA jsou znázorněna na Obrázku 24.

Poměr hmotnosti a náboje (m/z) nefosforylovaného kemptidu odpovídá hodnotě 772,48, zatímco poměr m/z fosforylovaného kemptidu odpovídá hodnotě 852,45. Minoritní píky odpovídající poměru m/z nefosforylovaného kemptidu vznikají až při analýze hmotnostním spektrometrem, kdy dochází k částečnému odlomení H_3PO_4 (minimálně i HPO_3) ve zdroji hmotnostního spektrometru. Ze získaných hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity fosforylovaného a nefosforylovaného kemptidu v daném čase a z těchto hodnot byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném čase (Rovnice 1), jak je uvedeno v Tabulce 11.

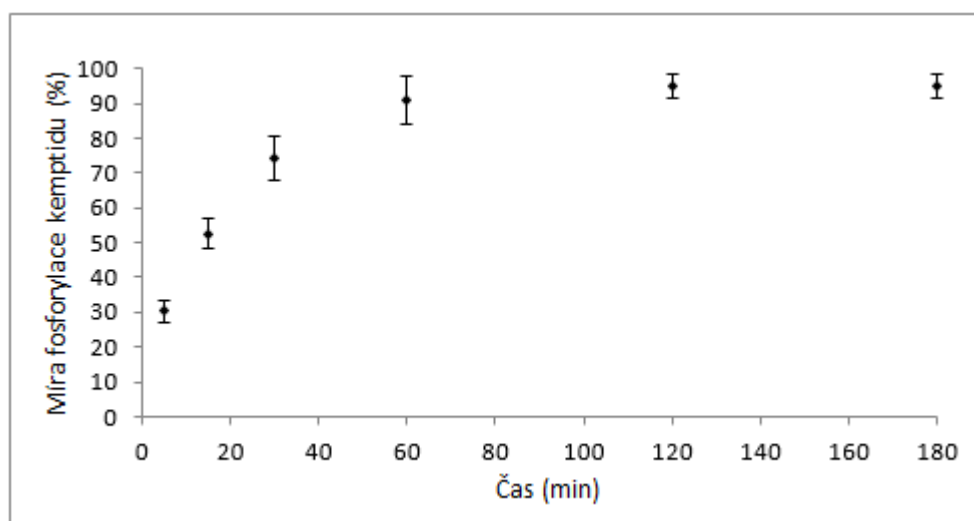
$$\text{Míra fosforylace substrátu (\%)} = \frac{I(\text{fosforylovaný substrát})}{I(\text{fosforylovaný substrát}) + I(\text{nefosforylovaný substrát})} \cdot 100$$

Rovnice 1 Výpočet míry fosforylace substrátu, I – relativní intenzita

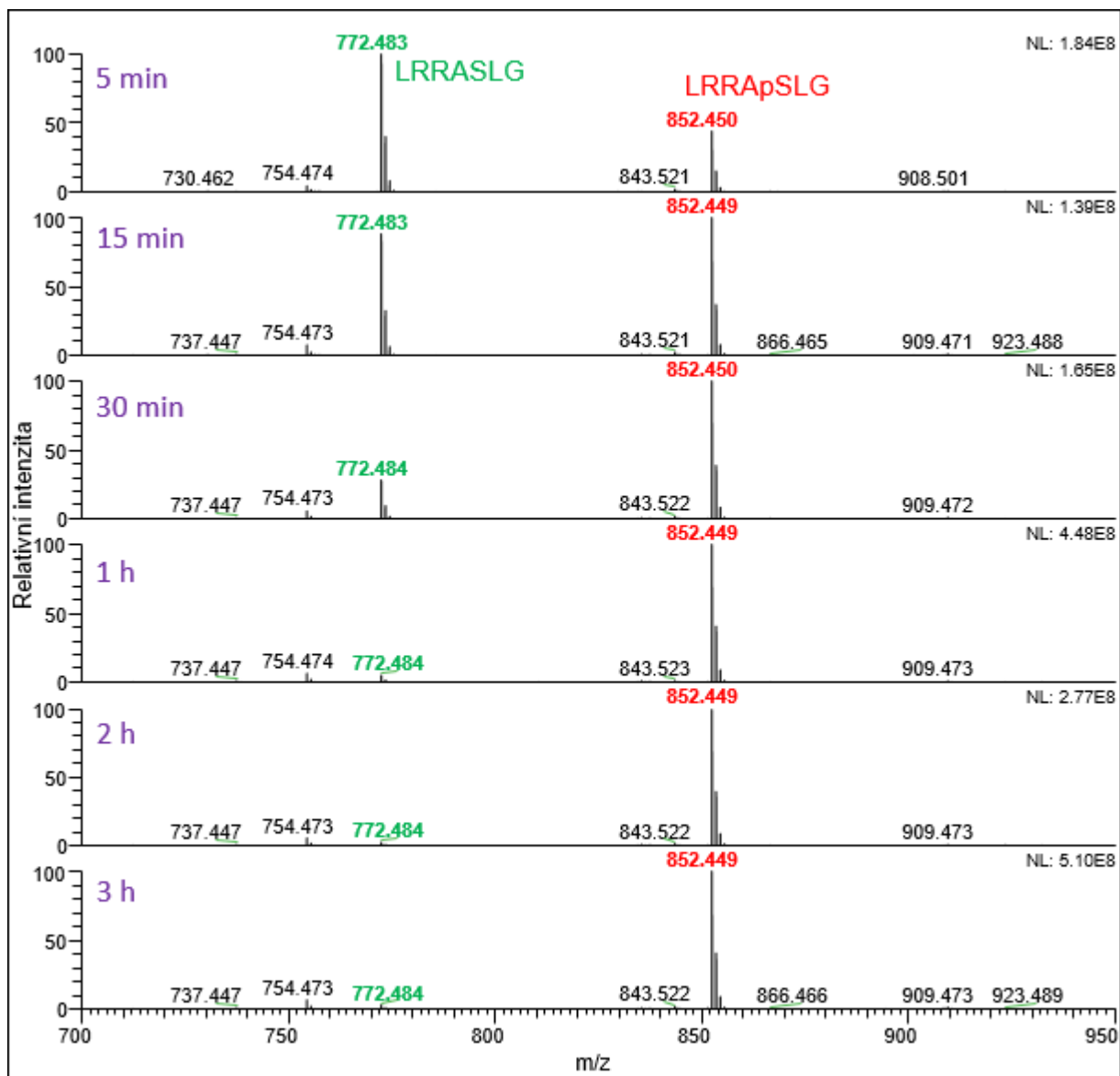
Tabulka 11 Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí solubilní PKA v čase

Solubilní PKA (ng/100μl)	Solubilní PKA (nM)	Míra fosforylace kemptidu (%)						
		5 min	15 min	30 min	1 hod	2 hod	3 hod	
68	16,6	97,46	99,30	98,06	97,82	97,88	97,81	
34	8,3	79,90	98,00	97,75	98,28	97,81	97,64	
1	25	6,1	26,41	46,90	65,07	81,48	89,77	90,20
2	25	6,1	30,70	53,05	78,01	95,36	97,67	97,24
3	25	6,1	34,08	57,95	79,22	96,09	96,64	97,35
∅	25	6,1	30,4	52,63	74,1	90,98	94,69	94,93
σ	25	6,1	3,14	4,52	6,40	6,72	3,51	3,34
17	4,1	20,72	40,94	53,97	62,40	68,82	69,75	
8,5	2,1	5,83	11,39	13,41	15,99	18,86	18,08	

Z výsledků uvedených v Tabulce 11 je zřejmé, že při celkové koncentraci solubilní PKA 16,6 nM bylo dosaženo plné fosforylace kemptidu již po 5 min a při celkové koncentraci solubilní PKA 8,3 nM bylo dosaženo plné fosforylace kemptidu po 15 min. Proto bylo dále snižováno množství PKA přidávané do reakce, nicméně při celkové koncentraci solubilní PKA 4,1 nM a 2,1 nM nebylo dosaženo plné fosforylace kemptidu ani po 3 hod. Jako optimální pro stanovení časové závislosti fosforylace kemptidu byla zvolena celková koncentrace solubilní PKA 6,1 nM, přičemž byl experiment proveden ve třech opakováních a z průměru získaných hodnot a odpovídajících směrodatných odchylek byl sestrojen Graf 6 závislosti míry fosforylace kemptidu na čase.



Graf 6 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí solubilní PKA o koncentraci 6,1 nM na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a odpovídající směrodatné odchylky)

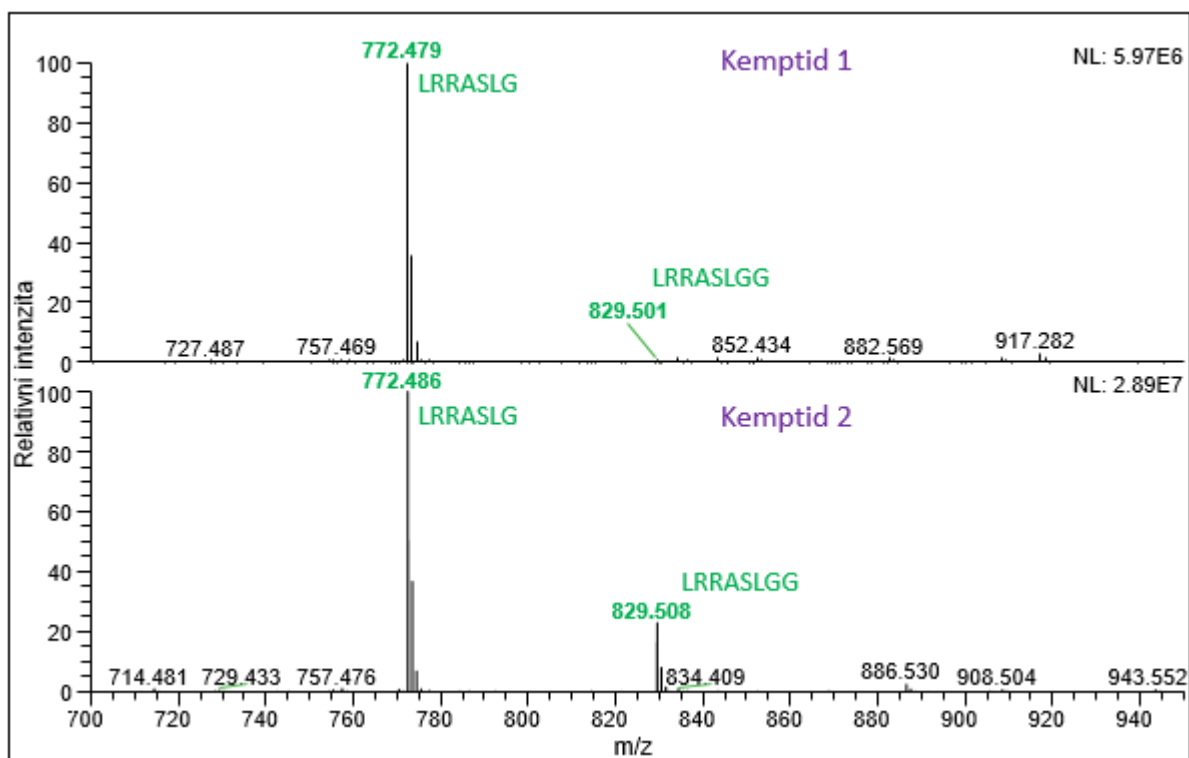


Obrázek 24 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) fosforylovaného pomocí solubilní PKA o koncentraci 6,1 nM (jsou uvedena hmotnostní spektra ze druhého opakování experimentu) (matrice DHB)

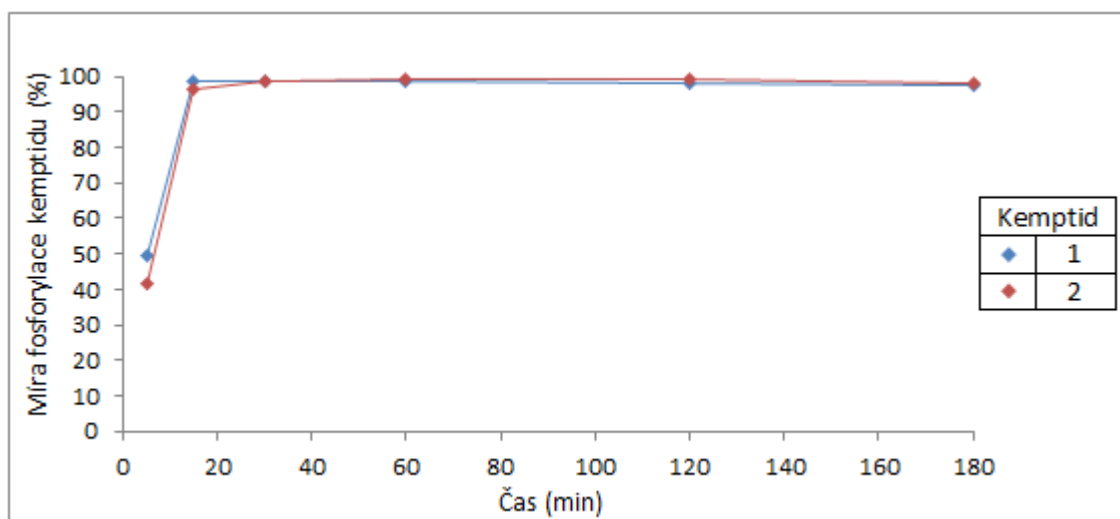
4.6.2. Porovnání míry fosforylace peptidových substrátů kemptid poskytnutých dvěma výrobci

Fosforylace dvou kemptidů byla provedena podle upraveného postupu uvedeného v kapitole 3.28 a vyhodnocena v závislosti na čase. Reakční složky byly tvořeny reakčním pufrům, solubilní PKA v celkové koncentraci 6,1 nM, kemptidem (1 nebo 2) v množství 10 μ g a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý kemptid byl 100 μ l. Reakční frakce o objemu odpovídajícím 1 μ g kemptidu byly sbírány v časech 5 min, 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod. MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra obou nefosforylovaných kemptidů jsou znázorněna na Obrázku 25. Standardní sekvence kemptidu

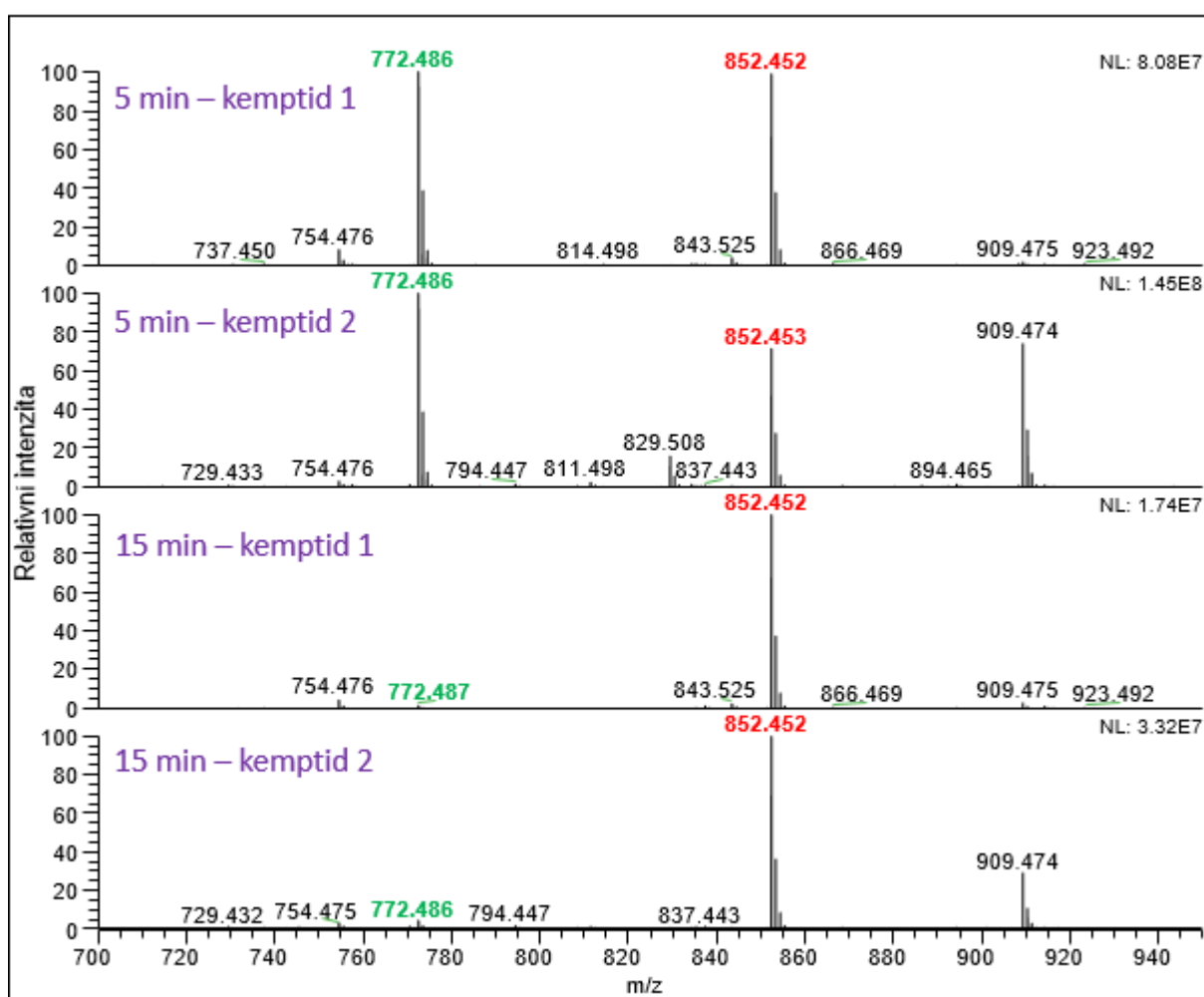
Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly s poměrem m/z 772 je rozšířena o jeden glycin Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-Gly s poměrem m/z 829, kdy u kemptidu (1) byl tento peptid velice minoritní, zatímco u kemptidu (2) má vyšší intenzitu. Vybraná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra obou kemptidů fosforylovaných solubilní PKA jsou znázorněna na Obrázku 26. S využitím získaných hmotnostních spekter pro každý kemptid byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném čase. Ze získaných hodnot byl sestaven Graf 7 závislosti míry fosforylace obou kemptidů na čase. Z naměřených hodnot je zřejmé, že se míra fosforylace kemptidu (1) a kemptidu (2) významně neliší.



Obrázek 25 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidových substrátů pro PKA označovaných kemptid (1) a kemptid (2) (matrice DHB)



Graf 7 Graf závislosti míry fosforylace peptidových substrátů pro PKA označovaných kemptid (1) a kemptid (2) pomocí solubilní PKA o koncentraci 6,1 nM na čase



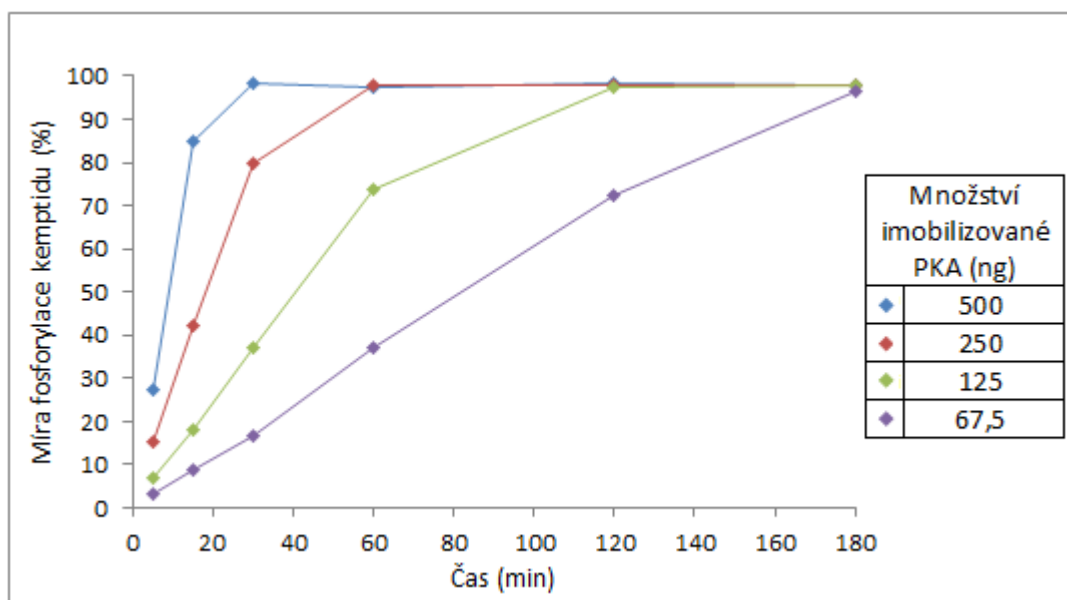
Obrázek 26 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidových substrátů pro PKA označovaných kemptid (1) a kemptid (2) fosforylovaných pomocí solubilní PKA o koncentraci 6,1 nM (matrice DHB)

4.6.3. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu kemptid pomocí imobilizované proteinkinázy A v čase

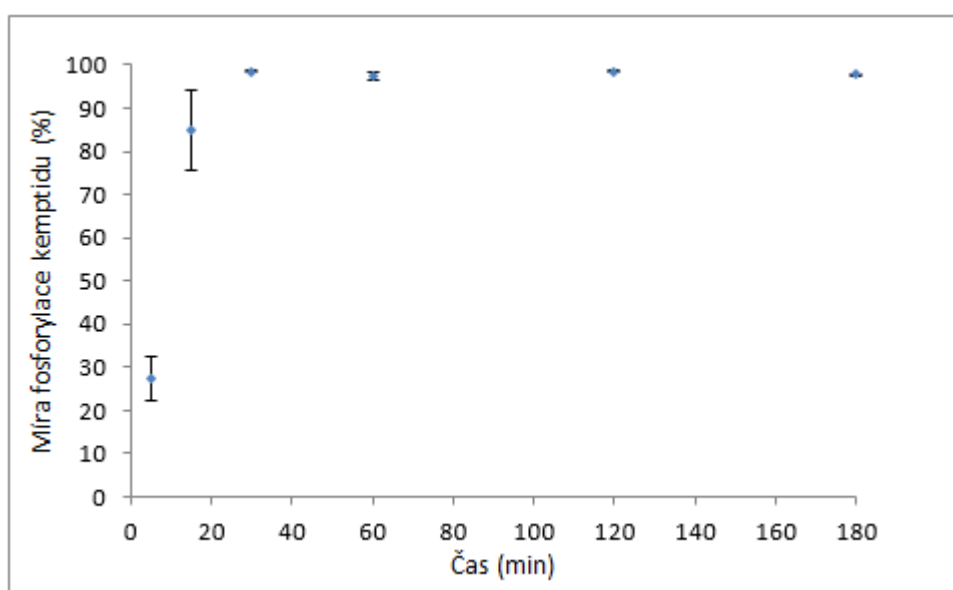
Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA v čase bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.30. Imobilizace 1,5 μg PKA na 0,6 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Po zkušenostech s imobilizací PKA lze předpokládat, že byla veškerá PKA vyvázána na magnetické částice (výsledky neukázány).

Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny alikvoty o množství 0,2 mg, 0,1 mg, 0,05 mg a 0,027 mg magnetických částic, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním pufrem, kemptidem (1) v množství 10 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl . Reakční frakce o objemu odpovídajícím 1 μg kemptidu byly sbírány v časech 5 min, 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod.

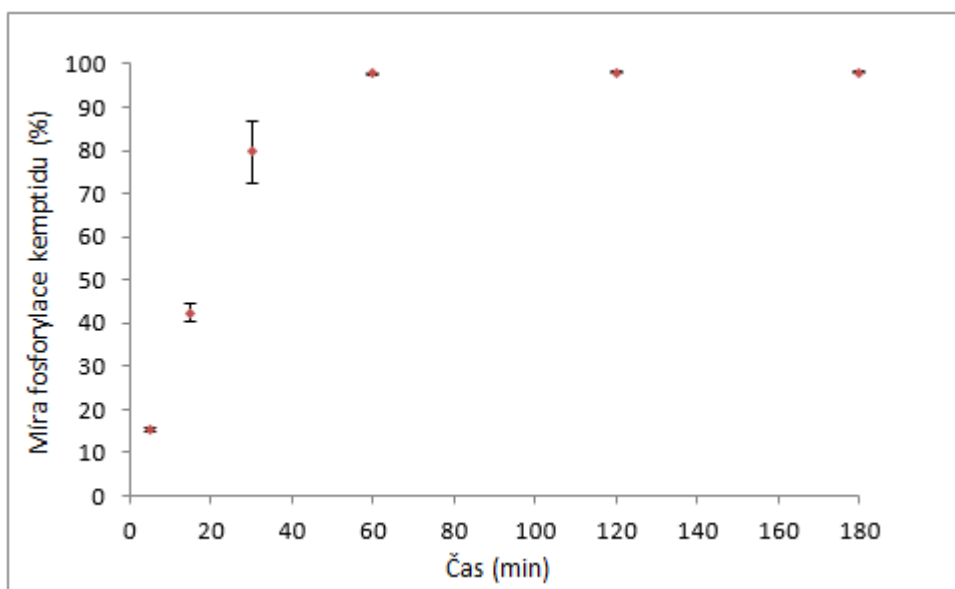
Vybraná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra kemptidu (1) fosforylovaného imobilizovanou PKA jsou znázorněna na Obrázku 27. S využitím získaných hmotnostních spekter byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném čase. Experiment byl proveden ve dvou opakováních a pro jednotlivá množství imobilizované PKA byly z průměrných hodnot míry fosforylace kemptidu v daném čase a odpovídajících směrodatných odchylek sestrojeny grafy závislosti míry fosforylace kemptidu na čase (Graf 8 – 12). Z výsledků vyplývá, že se míra fosforylace zvyšuje úměrně s časem a množstvím vázaného enzymu vloženého do reakce. Na základě výsledků dosažených pro peptidový substrát lze usuzovat, že pro kvantitativní fosforylaci proteinů je možné použít nosič s 500 ng a 250 ng vázané PKA, kde fosforylace proběhne do 60 min. Pro kontrolovanou fosforylaci měnící se v čase je vhodné použít nosič s 125 ng a 67,5 ng vázané PKA a takto si připravit pro další studie protein s různou mírou fosforylace.



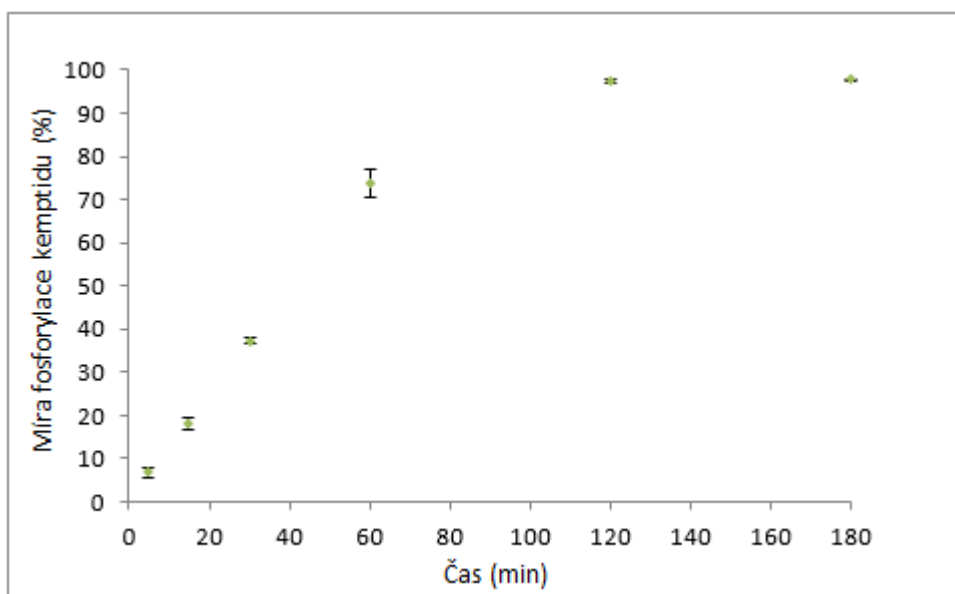
Graf 8 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze dvou opakování)



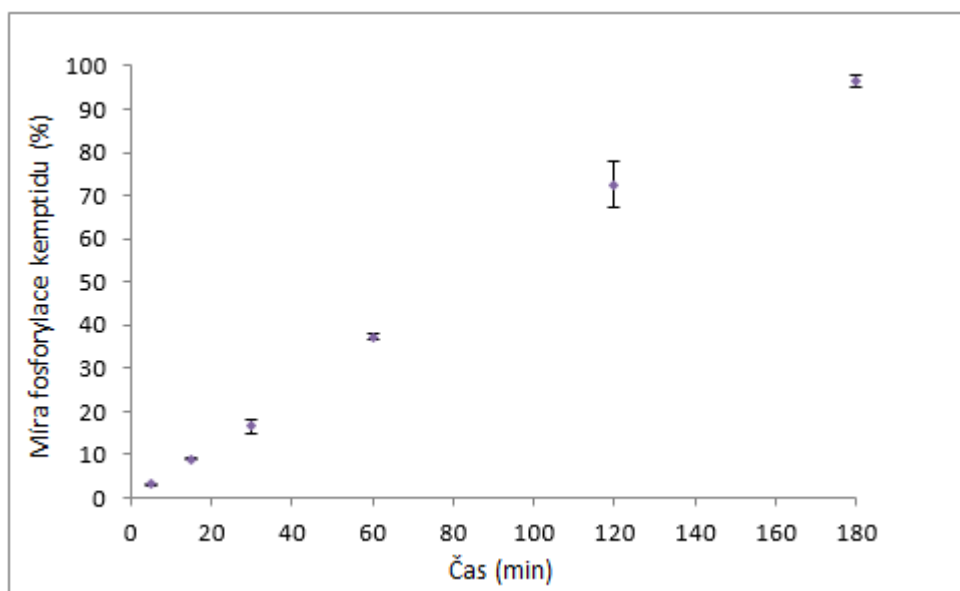
Graf 9 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA (500 ng PKA/0,2 mg magnetických částic) na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze dvou opakování a odpovídající směrodatné odchylky)



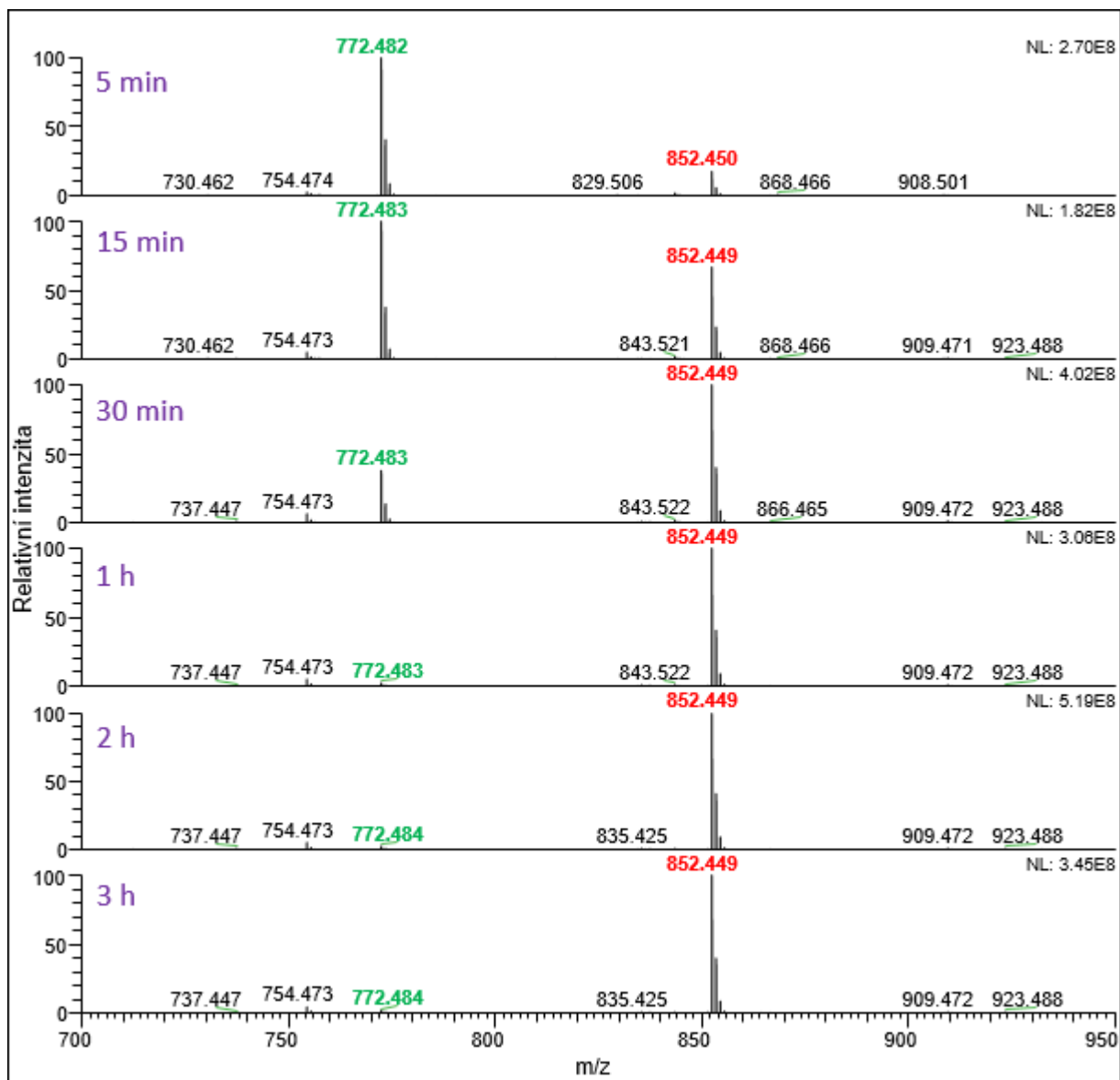
Graf 10 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA (250 ng PKA/0,1 mg magnetických částic) na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze dvou opakování a odpovídající směrodatné odchylky)



Graf 11 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA (125 ng PKA/0,05 mg magnetických částic) na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze dvou opakování a odpovídající směrodatné odchylky)



Graf 12 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) pomocí imobilizované PKA (67,5 ng PKA/0,027 mg magnetických částic) na čase (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze dvou opakování a odpovídající směrodatné odchylky)



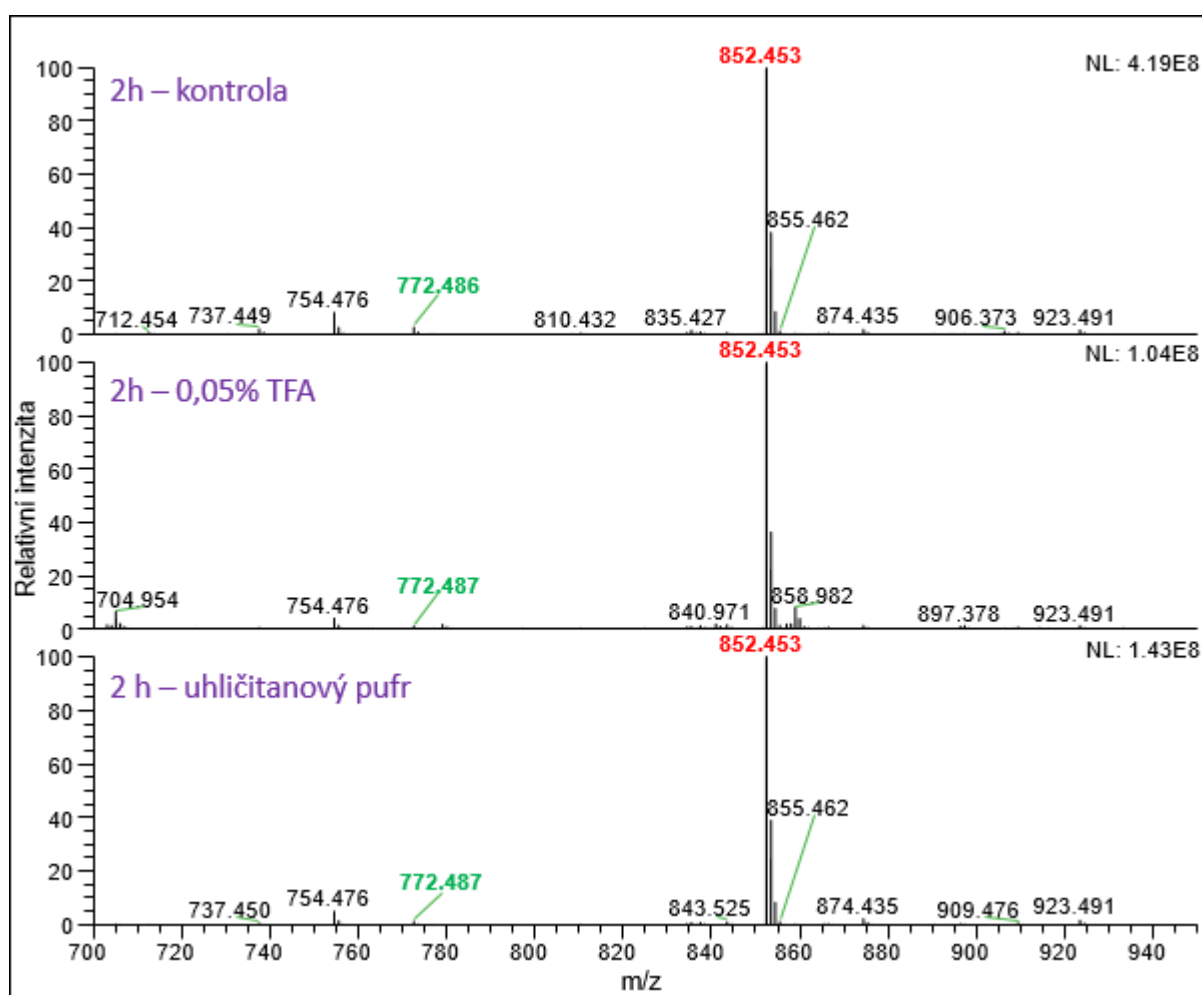
Obrázek 27 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) fosforylovaného pomocí imobilizované PKA (250 ng PKA/0,1 mg magnetických částic) (matrice DHB)

4.6.4. Zhodnocení vlivu promývacích roztoků na aktivitu vázané proteinkinázy A

Z důvodu pozorované zvýšené nescifické sorpce proteinu tau-441 bylo nutné experimentálně ověřit, za jakých podmínek je možné sorbované molekuly proteinu tau-441 kvantitativně uvolnit z povrchu nosiče, aniž by byla ovlivněna jeho enzymatická aktivita.

Zkoumání změn aktivity PKA imobilizované na magnetických částicích po inkubaci s promývacími roztoky bylo provedeno na základě stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) podle upraveného postupu uvedeného v kapitole 3.30. Imobilizace 3 μ g PKA na 0,6 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny tři alikvoty. První alikvot magnetických částic byl použit jako kontrolní. Druhý alikvot

magnetických částic byl inkubován s 0,2 ml 0,05% TFA po dobu 5 min. Třetí alikvot magnetických částic byl inkubován s 0,2 ml uhličitanového pufru (70 mM NaHCO₃, 30 mM Na₂CO₃·10 H₂O pH 9,2) po dobu 5 min. Po promytí magnetických částic byly k jednotlivým alikvotům přidány reakční složky tvořené reakčním pufrem, kemptidem (1) v množství 5 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl a inkubace byla provedena po dobu 2 hod. Získaná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra kemptidu (1) fosforylovaného imobilizovanou PKA po inkubaci s promývacími roztoky jsou znázorněna na Obrázku 28. Z výsledků je zřejmé, že imobilizovaná PKA je i po promytí uvedenými typy roztoků nadále aktivní.



Obrázek 28 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) fosforylovaného pomocí imobilizované PKA po inkubaci s promývacími roztoky (matrice DHB)

4.6.5. Zhodnocení vlivu roztoků detergentů na aktivitu vázané proteinkinázy A

Zajímalo nás, zda je možné do promývacího roztoku přidat detergent a zvýšit tak sílu roztoku a jeho schopnost uvolnit sorbované molekuly proteinu tau-441 z povrchu nosiče. Následující experiment ověřuje, zda takový přírůstek detergentu nesníží aktivitu imobilizovaného enzymu.

Zkoumání změn aktivity PKA imobilizované na magnetických částicích po inkubaci s roztoky detergentů bylo provedeno na základě stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (2) podle upraveného postupu uvedeného v kapitole 3.30. Imobilizace 1,5 μg PKA na 0,6 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny tři alikvoty. První alikvot magnetických částic byl použit jako kontrolní a byl inkubován s 0,1 ml HEPES pufru po dobu 20 min. Druhý alikvot magnetických částic byl inkubován s 0,1 ml 0,05% Tweenu 20 v HEPES pufru po dobu 20 min. Třetí alikvot magnetických částic byl inkubován s 0,1 ml 0,05% Tritonu[®] X-100 v HEPES pufru po dobu 20 min. Po promytí magnetických částic byly k jednotlivým alikvotům přidány reakční složky tvořené reakčním pufrům, kemptidem (2) v množství 10 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl a inkubace byla provedena po dobu 1 hod. S využitím získaných MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter kemptidu (2) fosforylovaného imobilizovanou PKA po inkubaci s roztoky detergentů byla vypočtena míra fosforylace kemptidu, jak je uvedeno v Tabulce 12. Z výsledků je zřejmé, že přítomnost detergentů Tween a Triton v koncentraci 0,05 % nemá na aktivitu imobilizované PKA vliv.

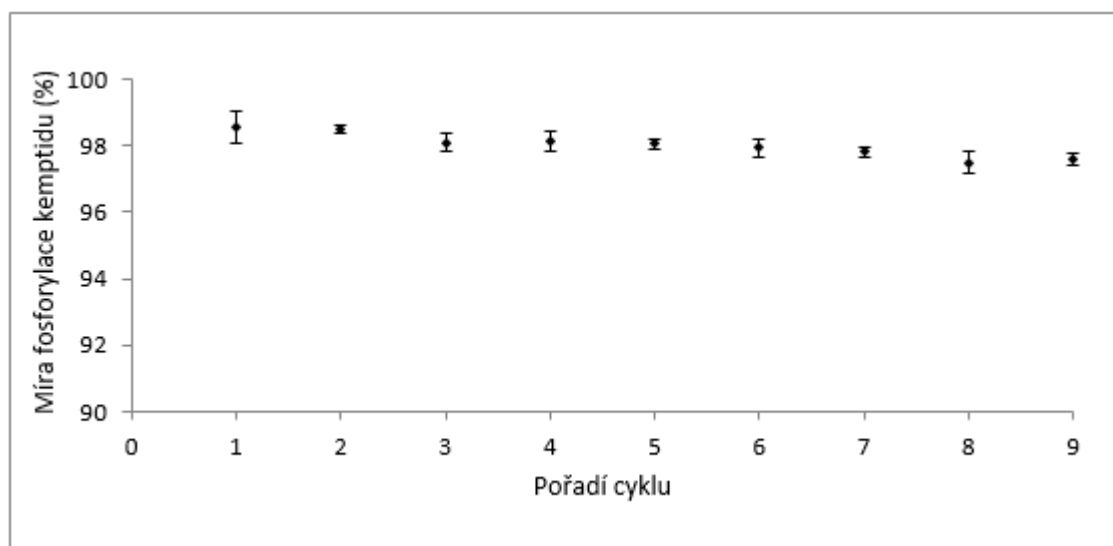
Tabulka 12 Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (2) pomocí imobilizované PKA po inkubaci s roztoky detergentů

Roztok detergentu	Množství imobilizované PKA (ng)	Množství mg. částic (mg)	Míra fosforylace kemptidu (%) (1 hod)
Kontrola	500	0,2	91,17
0,05% Tween	500	0,2	86,37
0,05% Triton	500	0,2	96,48

4.6.6. Stanovení operační stability imobilizované proteinkinázy A

Běžně se u imobilizovaných bioaktivních systémů sleduje tzv. operační stabilita, což je zhodnocení změn aktivity nosiče s vázaným enzymem při jeho opakovaném použití v průběhu 12 hod. Stanovení operační stability imobilizované PKA bylo provedeno podle postupu

uvedeného v kapitole 3.31. Imobilizace 1,5 μg PKA na 0,6 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním puforem, kemptidem (2) v množství 10 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl . S využitím získaných MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter kemptidu (2) fosforylovaného imobilizovanou PKA pro každý cyklus byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném cyklu. Z průměrných hodnot míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a s využitím odpovídajících směrodatných odchylek byl sestrojen Graf 13 závislosti míry fosforylace kemptidu na pořadí cyklu. Imobilizovaná PKA v rámci 9 opakování je stále vysoce aktivní, vždy je fosforylováno minimálně 97,5 % substrátu.

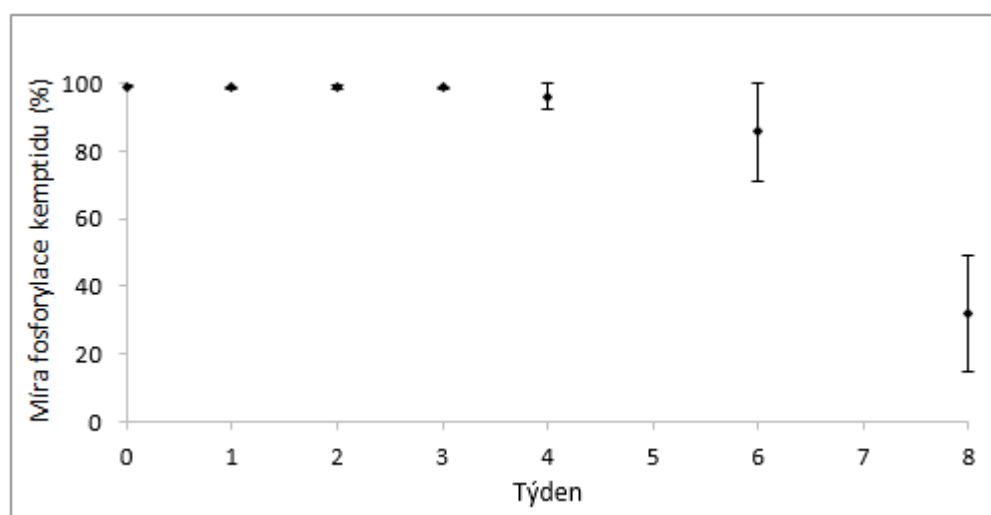


Graf 13 Graf znázorňující operační stabilitu imobilizované PKA prostřednictvím závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (2) na pořadí cyklu (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a odpovídající směrodatné odchylky)

4.6.7. Stanovení skladovací – operační stability imobilizované proteinkinázy A

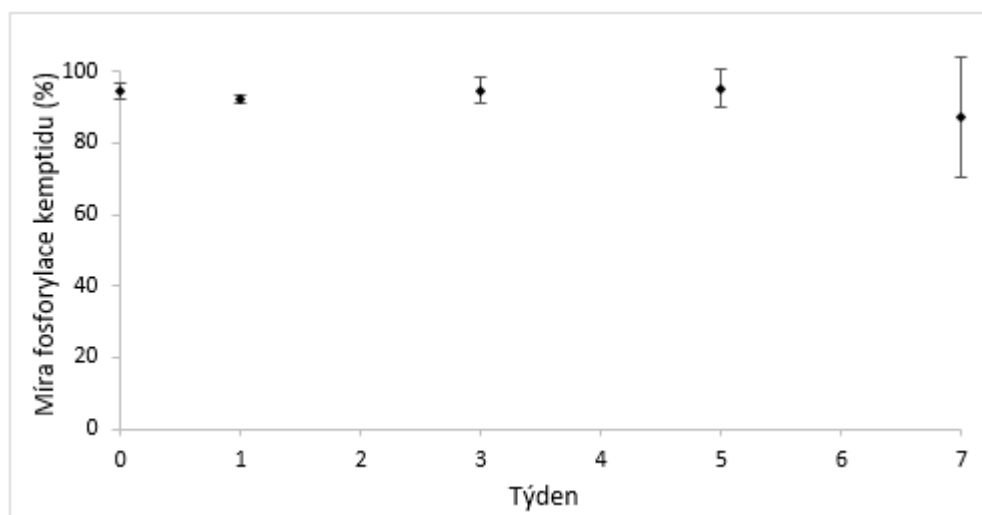
U imobilizovaných bioaktivních systémů se také běžně sleduje tzv. skladovací – operační stabilita, což je zhodnocení změn aktivity nosiče s vázaným enzymem při jeho opakovaném použití v delších časových intervalech (1 – 2 týdny), mezi kterými je nosič za vhodných podmínek skladován. Stanovení skladovací – operační stability imobilizované PKA bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.32. Při prvním experimentu byla provedena imobilizace 3 μg PKA na 0,6 mg magnetických částic podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním puforem, kemptidem (1) v množství 1 μg a ATP v celkové koncentraci 1 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 50 μl a inkubace

byla provedena po dobu 6 hod. Magnetické částice byly v tomto případě uskladněny v HEPES pufru s 0,01% azidem sodným. S využitím získaných MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter kemptidu (1) fosforylovaného imobilizovanou PKA byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném týdnu opakování. Z průměrných hodnot míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a s využitím odpovídajících směrodatných odchylek byl sestrojen Graf 14 závislosti míry fosforylace kemptidu na daném týdnu. Z grafu je zřejmé, že imobilizovaná PKA je až do 6. týdne stále vysoce aktivní (fosforylováno minimálně 85,5 % substrátu).



Graf 14 Graf znázorňující skladovací – operační stabilitu imobilizované PKA prostřednictvím závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (1) na daném týdnu (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a odpovídající směrodatné odchylky)

Při druhém experimentu byla provedena imobilizace 1,5 μg PKA na 0,6 mg magnetických částic podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou PKA byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním pufrem, kemptidem (2) v množství 10 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl a inkubace byla provedena po dobu 1 hod. Magnetické částice byly v tomto případě uskladněny v HEPES pufru. S využitím získaných MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter kemptidu (2) fosforylovaného imobilizovanou PKA byla vypočtena míra fosforylace kemptidu v daném týdnu opakování. Z průměrných hodnot míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a s využitím odpovídajících směrodatných odchylek byl sestrojen Graf 15 závislosti míry fosforylace kemptidu na daném týdnu. Z grafu je zřejmé, že imobilizovaná PKA je až do 7. týdne stále vysoce aktivní (fosforylováno minimálně 87 % substrátu).



Graf 15 Graf znázorňující skladovací – operační stabilitu imobilizované PKA prostřednictvím závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro PKA označovaného kemptid (2) na daném týdnu (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace kemptidu ze třech opakování a odpovídající směrodatné odchylky)

4.7. Fosforylace peptidového substrátu pomocí GSK-3

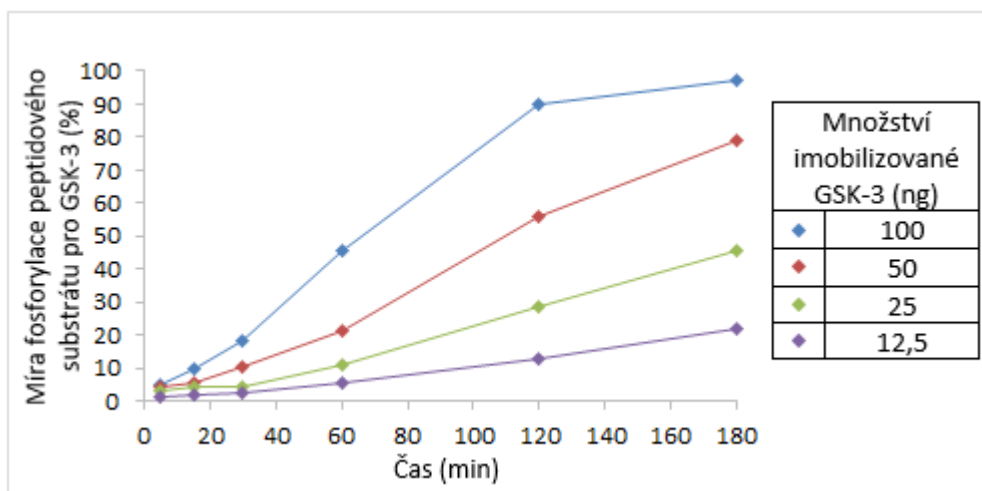
Další část diplomové práce byla zaměřena na fosforylací peptidového substrátu pomocí imobilizované GSK-3.

4.7.1. Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pomocí imobilizované GSK-3 v čase

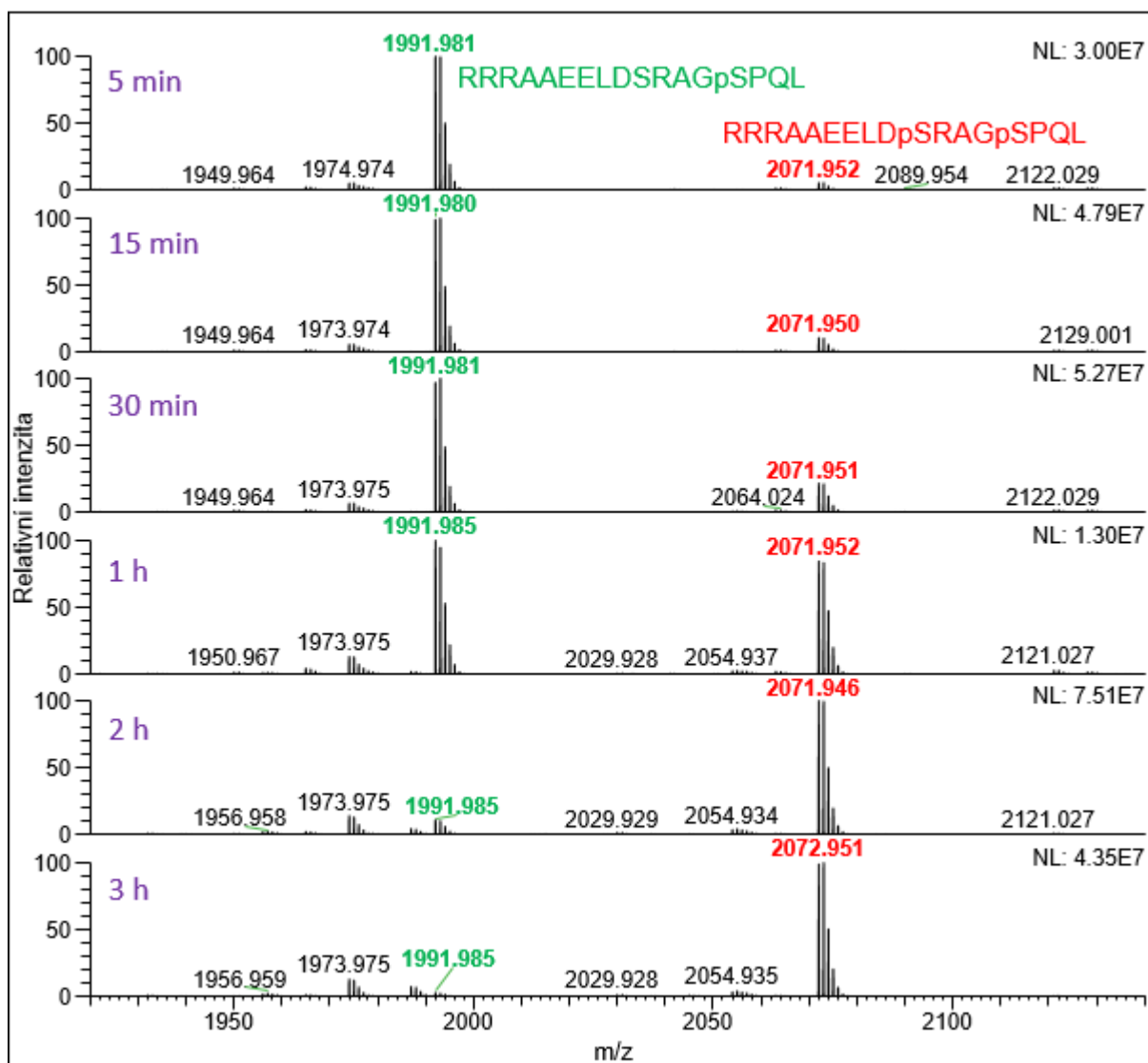
Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu pomocí imobilizované GSK-3 v čase bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.30. Imobilizace 0,2 μg GSK-3 na 0,4 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou GSK-3 byly vytvořeny alikvoty o množství 0,2 mg, 0,1 mg, 0,05 mg a 0,025 mg magnetických částic, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním pufrem, peptidovým substrátem pro GSK-3 v množství 5 μg a ATP v celkové koncentraci 0,5 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 100 μl . Reakční frakce o objemu odpovídajícím 0,5 μg peptidového substrátu byly sbírány v časech 5 min, 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod.

Vybraná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu fosforylovaného imobilizovanou GSK-3 jsou znázorněna na Obrázku 29. Poměr hmotnosti a náboje (m/z) nefosforylovaného peptidového substrátu pro GSK-3 odpovídá hodnotě 1991,98, zatímco poměr m/z fosforylovaného peptidového substrátu pro GSK-3 odpovídá hodnotě 2071,95. Ze získaných hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity fosforylovaného a nefosforylovaného peptidového substrátu v daném čase a z těchto hodnot byla vypočtena

míra fosforylace peptidového substrátu v daném čase (Rovnice 1). Ze získaných hodnot byl sestrojen Graf 16 závislosti míry fosforylace peptidového substrátu na čase. K plné fosforylaci peptidového substrátu dochází po přidavku 100 ng imobilizované GSK-3 (0,2 mg magnetických částic) po 3 hod a je vždy úměrná času a množství enzymu.



Graf 16 Graf závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro GSK-3 pomocí imobilizované GSK-3 na čase

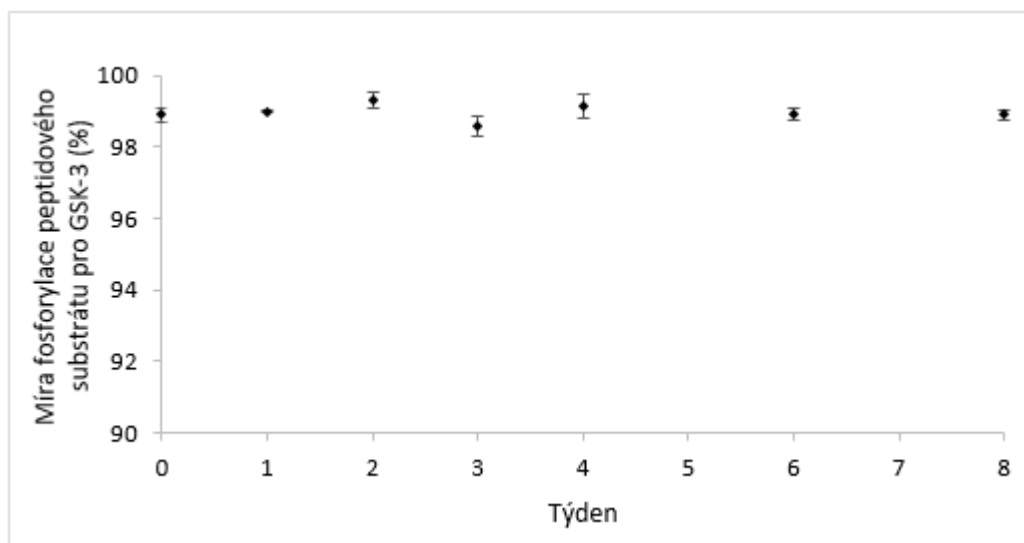


Obrázek 29 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro GSK-3 fosforylovaného pomocí imobilizované GSK-3 (100 ng GSK-3/0,2 mg magnetických částic) (matrice DHB)

4.7.2. Stanovení skladovací – operační stability imobilizované GSK-3

Stanovení skladovací – operační stability imobilizované GSK-3 bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.32. Imobilizace 2 μg GSK-3 na 0,6 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Z magnetických částic s vázanou GSK-3 byly vytvořeny 3 alikvoty, k nimž byly přidány reakční složky tvořené reakčním pufrům, peptidovým substrátem pro GSK-3 v množství 1 μg a ATP v celkové koncentraci 1 mM. Celkový reakční objem pro každý alikvot byl 50 μl a inkubace byla provedena po dobu 6 hod. Magnetické částice byly uskladněny v HEPES pufru s 0,01% azidem sodným. S využitím získaných MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter peptidového substrátu fosforylovaného imobilizovanou GSK-3 byla vypočtena míra fosforylace peptidového substrátu v daném týdnu opakování. Z průměrných hodnot míry fosforylace peptidového

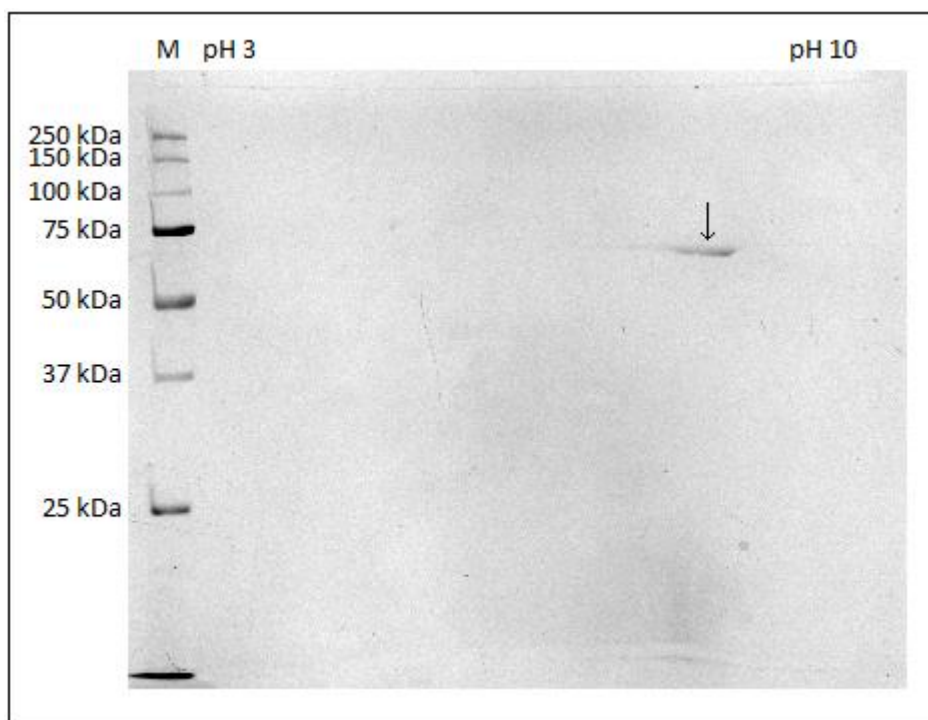
substrátu ze třech opakování a s využitím odpovídajících směrodatných odchylek byl sestrojen Graf 17 závislosti míry fosforylace peptidového substrátu na daném týdnu. Z grafu je zřejmé, že imobilizovaná GSK-3 je až do 8. týdne stále vysoce aktivní (fosforylováno minimálně 98,5 % substrátu).



Graf 17 Graf znázorňující skladovací – operační stabilitu imobilizované GSK-3 prostřednictvím závislosti míry fosforylace peptidového substrátu pro GSK-3 na daném týdnu (jsou uvedeny průměrné hodnoty míry fosforylace peptidového substrátu pro GSK-3 ze třech opakování a odpovídající směrodatné odchylky)

4.8. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinu tau-441

S cílem si ověřit kvalitu rekombinantního proteinu tau-441, zda není fragmentován nebo neagreguje, byla provedena 2D-PAGE podle postupu uvedeného v kapitole 3.5. Na gel byl nanesen protein tau-441 v množství 3 μg . Gel byl barven roztokem amoniakálního stříbra podle postupu uvedeného v kapitole 3.7 a je znázorněn na Obrázku 30. Protein tau-441 je na gelu detekován v zóně odpovídajícího izoelektrického bodu a předpokládané molekulové hmotnosti.



Obrázek 30 Detekce proteinu tau-441 (3 μ g) pomocí 2D-PAGE, separační dráha M – marker molekulových hmotností proteinový, šipkou je označen protein tau-441 (12% gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra)

4.9. Enzymová fosforylace proteinu tau-441

Další část diplomové práce byla zaměřena na fosforylaci proteinu tau-441 vybranými kinázami, konkrétně PKA a GSK-3.

4.9.1. Fosforylace proteinu tau-441 pomocí solubilní PKA a GSK-3

Fosforylace proteinu tau-441 pomocí solubilní PKA a GSK-3 byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.33. Reakční složky byly tvořeny reakčním pufrem, proteinem tau-441 v množství 2 μ g, ATP v celkové koncentraci 1 mM a solubilními kinázami v množství uvedeném v Tabulce 13. Celkový reakční objem byl 50 μ l. Připravené vzorky fosforylovaného proteinu tau-441 byly separovány pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu na 12% gelu podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Poté byl proveden polosuchý westernový přenos na NC membránu podle postupu uvedeného v kapitole 3.9. Gel po transferu byl barven roztokem Coomassie G-250 Stain podle postupu uvedeného v kapitole 3.6. Membrána po transferu byla barvena roztokem Ponceau S podle postupu uvedeného v kapitole 3.11. Následně byla membrána značena příslušnou primární protilátkou o daném ředění specifikovaném v Tabulce 14 podle postupu uvedeného v kapitole 3.13. Ředění příslušných sekundárních protilátek konjugovaných s HRP bylo 1 : 15000. Uvolnění vázaných protilátek z membrány bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.14.

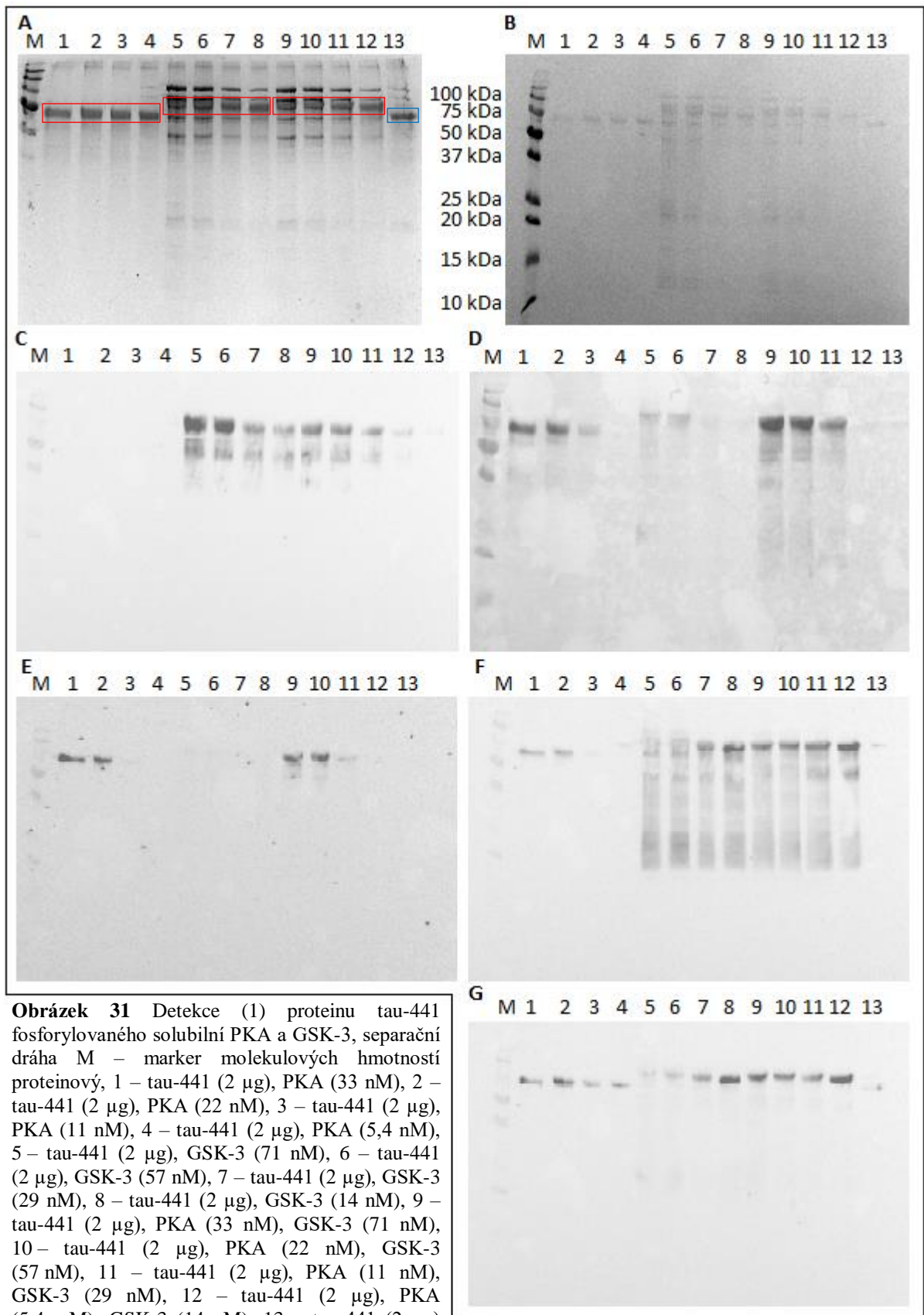
Metoda byla provedena dvakrát, přičemž bylo změněno pořadí použitých primárních protilátek a jejich ředění, jak je uvedeno v Tabulce 14. Výsledky experimentu jsou znázorněny na Obrázku 31 a 32.

Tabulka 13 Koncentrace solubilní PKA a GSK-3 v reakčních roztocích pro fosforylaci proteinu tau-441

Reakce	PKA (nM)	GSK-3 (nM)
1	33	-
2	22	-
3	11	-
4	5,4	-
5	-	71
6	-	57
7	-	29
8	-	14
9	33	71
10	22	57
11	11	29
12	5,4	14

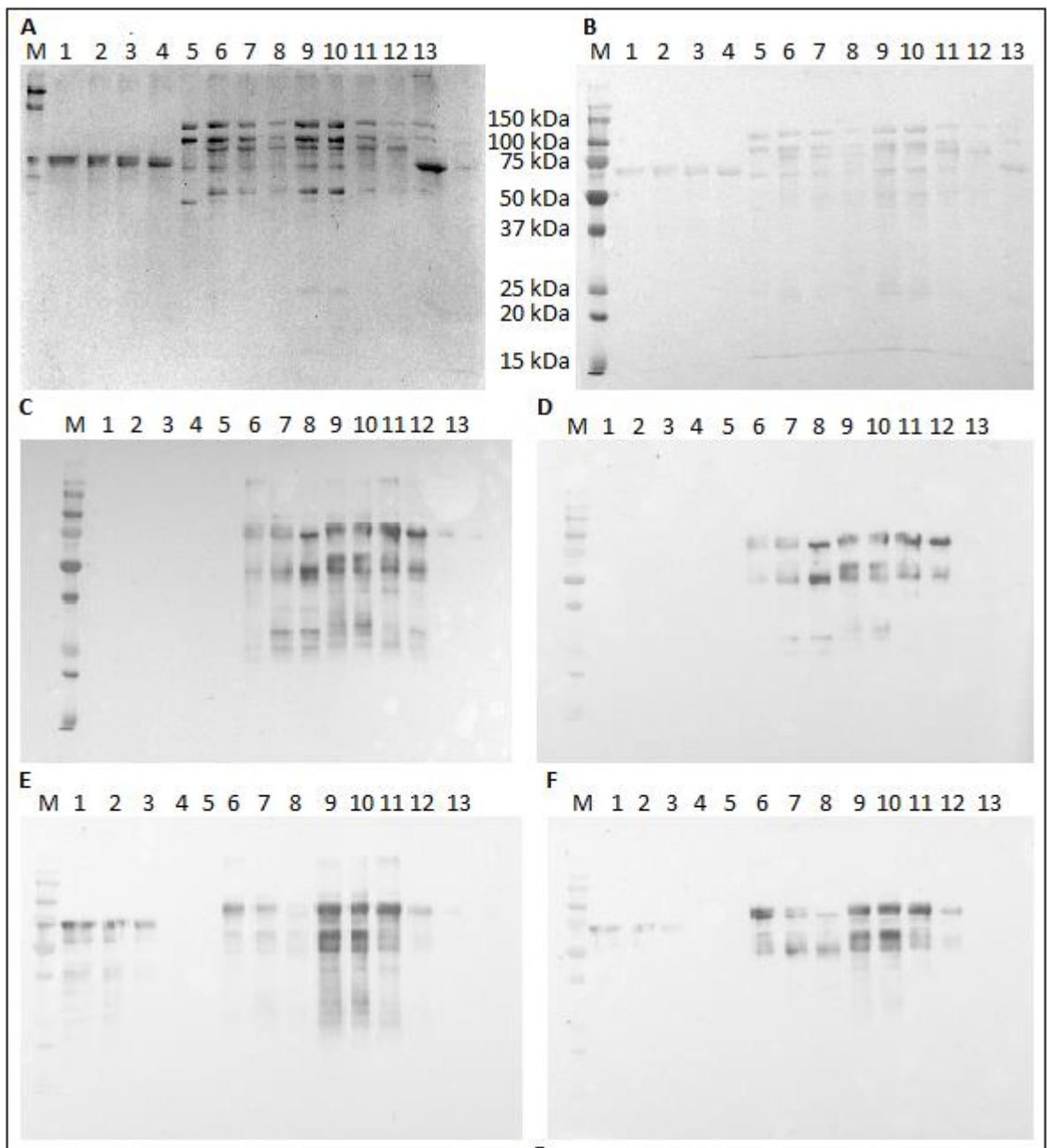
Tabulka 14 Pořadí a ředění primárních protilátek použitých pro značení membrány

Pořadí primárních protilátek	Experiment 1		Experiment 2	
	Primární protilátka	Ředění	Primární protilátka	Ředění
1	AT180	1 : 2000	pS396	1 : 3000
2	pS356	1 : 2000	AT8	1 : 2000
3	AT8	1 : 2000	pS356	1 : 4000
4	pS396	1 : 2000	AT180	1 : 2000
5	Tau 46.1	1 : 60000	Tau 46.1	1 : 60000



Obrázek 31 Detekce (1) proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA a GSK-3, separační dráha M – marker molekulových hmotností proteinový, 1 – tau-441 (2 µg), PKA (33 nM), 2 – tau-441 (2 µg), PKA (22 nM), 3 – tau-441 (2 µg), PKA (11 nM), 4 – tau-441 (2 µg), PKA (5,4 nM), 5 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (71 nM), 6 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (57 nM), 7 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (29 nM), 8 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (14 nM), 9 – tau-441 (2 µg), PKA (33 nM), GSK-3 (71 nM), 10 – tau-441 (2 µg), PKA (22 nM), GSK-3 (57 nM), 11 – tau-441 (2 µg), PKA (11 nM), GSK-3 (29 nM), 12 – tau-441 (2 µg), PKA (5,4 nM), GSK-3 (14 nM), 13 – tau-441 (2 µg)

(A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, gel po transferu barven Coomassie G-250 Stain, červené rámečky – fosforylovaný tau-441, modrý rámeček – nefosforylovaný tau-441, B) NC membrána, barveno Ponceau S, C) NC membrána, značeno AT180, D) NC membrána, značeno pS356, E) NC membrána, značeno AT8, F) NC membrána, značeno pS396, G) NC membrána, značeno Tau 46.1)



Obrázek 32 Detekce (2) proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA a GSK-3, separační dráha M – marker molekulových hmotností proteinový, 1 – tau-441 (2 µg), PKA (33 nM), 2 – tau-441 (2 µg), PKA (22 nM), 3 – tau-441 (2 µg), PKA (11 nM), 4 – tau-441 (2 µg), PKA (5,4 nM), 5 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (71 nM), 6 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (57 nM), 7 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (29 nM), 8 – tau-441 (2 µg), GSK-3 (14 nM), 9 – tau-441 (2 µg), PKA (33 nM), GSK-3 (71 nM), 10 – tau-441 (2 µg), PKA (22 nM), GSK-3 (57 nM), 11 – tau-441 (2 µg), PKA (11 nM), GSK-3 (29 nM), 12 – tau-441 (2 µg), PKA (5,4 nM), GSK-3 (14 nM), 13 – tau-441 (2 µg)

(A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, gel po transferu barven Coomassie G-250 Stain, B) NC membrána, barveno Ponceau S, C) NC membrána, značeno pS396, D) NC membrána, značeno AT8, E) NC membrána, značeno pS356, F) NC membrána, značeno AT180, G) NC membrána, značeno Tau 46.1

Teoretická molekulová hmotnost nefosforylovaného proteinu tau-441 je 45,9 kDa. Zvýšená detekovaná molekulová hmotnost nefosforylovaného proteinu tau-441 je způsobena jeho nižší mobilitou v prostředí PAA gelu za přítomnosti SDS. V případě proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA i GSK-3 lze pozorovat další zvýšení molekulové hmotnosti. Výsledky obou experimentů detekce fosforylovaného proteinu tau-441 s využitím specifických protilátek se mírně liší. Tyto odlišnosti jsou zřejmě způsobeny nedokonalým uvolněním vázaných protilátek z membrány před jejím značením další primární protilátkou. Právě z tohoto důvodu byly provedeny dva experimenty s odlišným pořadím použitých primárních protilátek. SDS-PAGE analýzou vzorků proteinu tau-441, kam byla přidána solubilní forma enzymu GSK-3, byla zjištěna velká kontaminace jinými blíže nespecifikovanými proteiny/fragmety. Že se jedná o kontaminaci a nehomogenitu roztoku enzymu GSK-3 je zřejmé z klesající intenzity proužků odpovídající klesajícímu množství enzymu přidávaného do roztoku. Přesto je proužek odpovídající fosforylované formě proteinu tau-441 zřetelný ve všech separačních dráhách.

Protilátka AT180 je namířena proti pThr231. U experimentu 1 byl při značení membrány protilátkou AT180 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3 a směsí solubilní PKA a GSK-3. U experimentu 2 byl při značení membrány protilátkou AT180 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3, nicméně u tau-441 fosforylovaného GSK-3 v nejvyšší koncentraci signál nebyl detekován, a to ani v případě dalších protilátek, což mohlo být způsobeno nedokonalým transferem na membránu. Signál byl detekován také u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného směsí solubilní PKA a GSK-3. Signál detekovaný u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA lze v tomto případě přičíst právě nedokonalému promytí membrány. Protilátka pS356 je namířena proti pSer356. U experimentu 1 byl při značení membrány protilátkou pS356 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA, GSK-3 i směsí PKA a GSK-3. U experimentu 2 byl při značení membrány protilátkou pS356 také detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA, GSK-3 i směsí PKA a GSK-3.

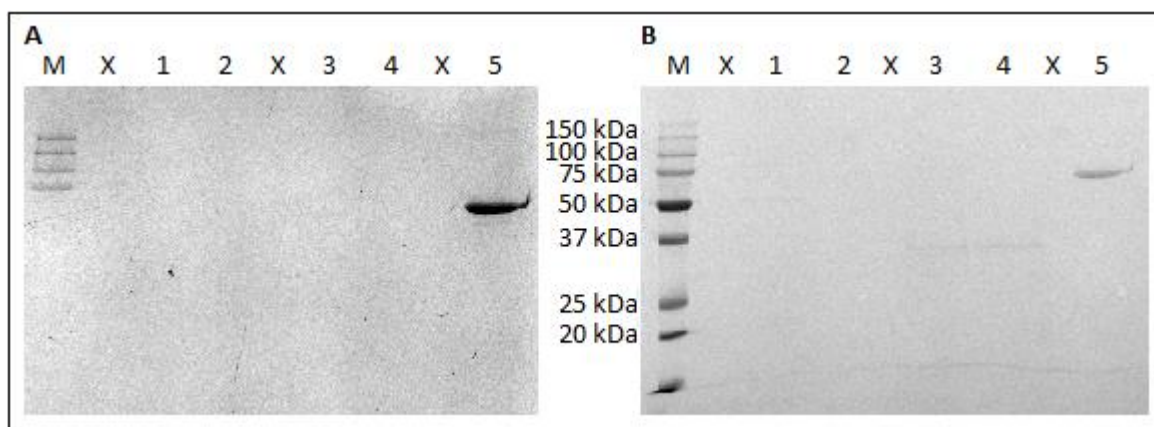
Protilátka AT8 je namířena proti pSer202 a pThr205. U experimentu 1 byl při značení membrány protilátkou AT8 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní PKA, což mohlo být v tomto případě způsobeno nedokonalým promytím membrány a směsí PKA a GSK-3. U experimentu 2 byl při značení membrány protilátkou AT8 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3 a směsí PKA

a GSK-3. Protilátka pS396 je namířena proti pSer396. U experimentu 1 byl při značení membrány protilátkou pS396 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3 a směsí PKA a GSK-3, přičemž signál u solubilní PKA byl zřejmě způsoben nedokonalým promytím membrány. U experimentu 2 byl při značení membrány protilátkou pS396 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3 a směsí PKA a GSK-3. U obou experimentů byla jako poslední použita pro značení membrány protilátka Tau 46.1 namířena proti všem formám proteinu tau-441. U experimentu 2 nebyl při značení membrány protilátkou Tau 46.1 detekován signál u vzorku proteinu tau-441 fosforylovaného solubilní GSK-3 v nejvyšší koncentraci, což lze přikládat nedokonalému transferu na membránu.

Potvrdilo se, že metoda využívající fosfo-specifické protilátky je vhodná pro monitorování fosforylace proteinů. Nicméně vzhledem ke zmíněnému nedokonalému promývání membrány před jejím značením další primární protilátkou lze pro další experimenty doporučit uvolnění vázaných protilátek z membrány s využitím 2-merkptoethanolu podle postupu uvedeného v kapitole 3.15.

4.9.2. Fosforylace proteinu tau-441 pomocí imobilizované PKA

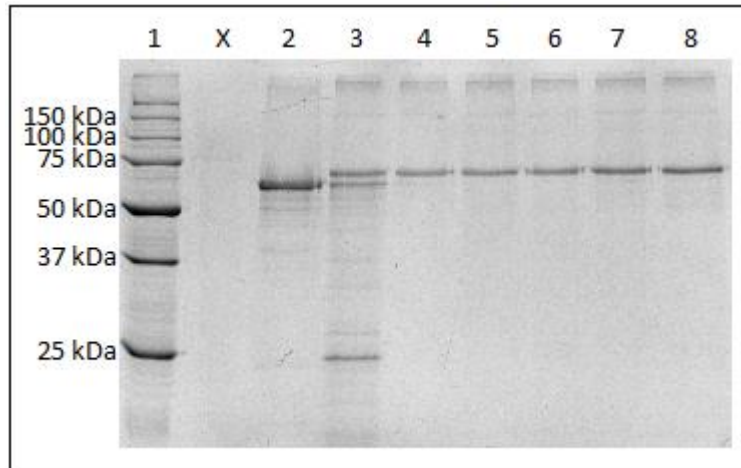
Imobilizace 2 μ g PKA na 0,4 mg magnetických částic byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.29. Byla připravena také kontrola 0,4 mg magnetických částic bez vázané PKA. Do zkumavek Protein LoBind byly přidány magnetické částice s a bez vázané PKA, reakční pufr, protein tau-441 v množství 5 μ g a ATP v celkové koncentraci 0,25 mM. Celkový reakční objem byl 200 μ l. Reakce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.34. Uvolnění molekuly proteinu tau-441 bylo provedeno pomocí 0,05% TFA podle postupu uvedeného v kapitole 3.35. Následně byly magnetické částice promyty 4 \times 0,4 ml reakčního pufru a experiment byl opakován. Byla provedena separace připravených vzorků pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Poté byl proveden polosuchý westernový přenos na NC membránu podle postupu uvedeného v kapitole 3.9. Gel po transferu byl barven roztokem Coomassie G-250 Stain podle postupu uvedeného v kapitole 3.6 a je znázorněn na Obrázku 33 A. Membrána po transferu byla barvena roztokem Ponceau S podle postupu uvedeného v kapitole 3.11 a je znázorněna na Obrázku 33 B.



Obrázek 33 Detekce proteinu tau-441 po fosforylaci imobilizovanou PKA, uvolnění pomocí 0,05% TFA, separační dráha M – marker molekulových hmotností proteinový, 1 – tau-441 (2,5 µg) po fosforylaci, 20 h, 1. experiment, 2 – tau-441 (2,5 µg) nefosforylovaný, 1. experiment, 3 – tau-441 (2,5 µg) po fosforylaci, 20 h, 2. experiment, 4 – tau-441 (2,5 µg) nefosforylovaný, 2. experiment, 5 – tau-441 (2 µg) (A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, gel po transferu barven Coomassie G-250 Stain, B) NC membrána, barveno Ponceau S)

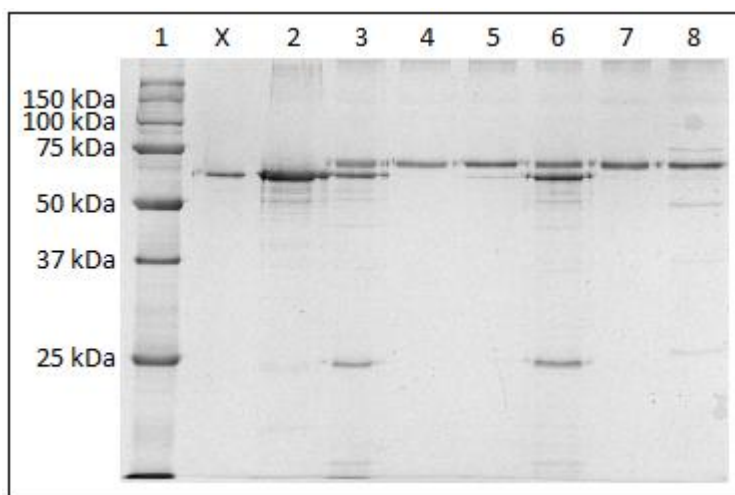
Z výsledků je zřejmé, že ve vzorku proteinu tau-441 po fosforylaci imobilizovanou PKA nebyl protein tau-441 na gelu detekován a vzhledem ke stejnému výsledku u vzorku, kde byly s proteinem tau-441 inkubovány holé magnetické částice se lze domnívat, že protein tau-441 silně sorboval na povrch částic. Ani promývací krok s přidavkem 0,05% TFA nepomohl sorbované molekuly uvolnit. Také detekce fosforylovaného proteinu tau-441 na membráně pomocí vybraných fosfo-specifických protilátek nebyla úspěšná, což dokladovalo sorpci.

Protože protein tau-441 nebyl ve vzorcích po fosforylaci, případně po kontaktu s magnetickým nosičem prokázán metodou SDS-PAGE, byly zařazeny i experimenty ověřující, zda molekuly proteinu tau-441 sorbovaly na povrch nosiče nebo zkumavky a zda mícháním s magnetickými částicemi nedocházelo k nespecifické fragmentaci. Mechanická degradace proteinu se nepotvrdila. S cílem uvolnit sorbované molekuly proteinu tau-441 z pevné fáze byly použity další promývací roztoky. V případě použití 0,1% deoxycholátu sodného ve 40 mM HEPES pufru (viz kapitola 3.36) nebylo dosaženo dostatečného uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi. V případě použití 0,05% Tritonu[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru (viz kapitola 3.38) nebo 0,05% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru (viz kapitola 3.37) již bylo dosaženo dostatečného uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi, jak je znázorněno na Obrázku 34.



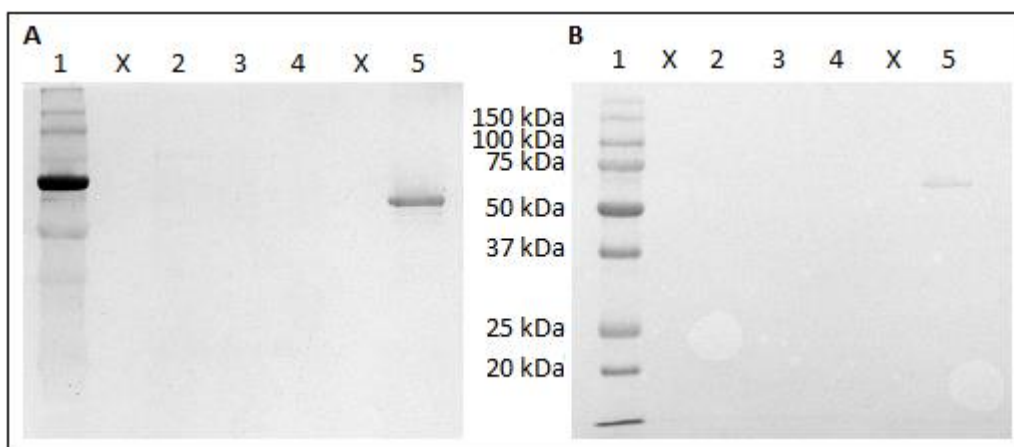
Obrázek 34 Optimalizace uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí 0,05% Tritonu[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru a 0,05% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností proteinový, 2 – tau-441 (1 µg), 3 – tau-441 (1 µg) bez nosiče, 6 hod, uvolnění Tritonem, 4 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 6 hod, uvolnění Tritonem, 5 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 3 hod, uvolnění Tritonem, 6 – tau-441 (1 µg) bez nosiče, 6 hod, uvolnění Tweenem, 7 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 6 hod, uvolnění Tweenem, 8 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 3 hod, uvolnění Tweenem (SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra)

Vzhledem k dobrým výsledkům experimentu pro uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí 0,05% Tritonu[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru a 0,05% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru byla provedena další optimalizace, přičemž byl experiment proveden stejným způsobem jako předchozí, jen se dvěma obměnami. Zmíněné obměny zahrnovaly prodloužení doby inkubace reakčních roztoků s magnetickými částicemi a snížení koncentrace detergentů, přičemž byl protein tau-441 uvolněn pomocí 0,01% Tritonu[®] X-100 ve 40 mM HEPES pufru a 0,01% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru. Výsledky experimentu jsou znázorněny na Obrázku 35. Jak je zřejmé z obrázku, i v případě snížení koncentrace detergentů bylo uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi úspěšné.



Obrázek 35 Optimalizace uvolnění proteinu tau-441 po inkubaci s magnetickými částicemi pomocí 0,01% Tritonu® X-100 ve 40 mM HEPES pufru a 0,01% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností proteinový, 2 – tau-441 (1 µg), 3 – tau-441 (1 µg) bez nosiče, 20 hod, uvolnění Tritonem, 4 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 20 hod, uvolnění Tritonem, 5 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 6 hod, uvolnění Tritonem, 6 – tau-441 (1 µg) bez nosiče, 20 hod, uvolnění Tweenem, 7 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 20 hod, uvolnění Tweenem, 8 – tau-441 (1 µg) inkubace s magnetickými částicemi, 6 hod, uvolnění Tweenem (SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra)

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byl znovu proveden experiment fosforylace proteinu tau-441 s PKA vázanou na nosič. Nejprve byla provedena imobilizace 1,5 µg PKA na 0,6 mg magnetických částic. Byla připravena také kontrola 0,6 mg magnetických částic bez vázané PKA. Do zkumavek Protein LoBind byly přidány alikvoty magnetických částic s a bez vázané PKA po 0,2 mg, k nimž byl přidán reakční pufr, protein tau-441 v množství 5 µg a ATP v celkové koncentraci 0,25 mM. Celkový reakční objem byl 200 µl. Uvolnění proteinu tau-441 bylo provedeno pomocí 0,01% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru. Byla provedena separace připravených vzorků pomocí SDS-PAGE v prostředí glycinu. Poté byl proveden polosuchý westernový přenos na NC membránu. Gel po transferu byl barven roztokem amoniakálního stříbra a je znázorněn na Obrázku 36 A. Membrána po transferu byla barvena roztokem Ponceau S a je znázorněna na Obrázku 36 B.



Obrázek 36 Detekce proteinu tau-441 po fosforylaci imobilizovanou PKA, uvolnění pomocí 0,01% Tweenu 20 ve 40 mM HEPES pufru, separační dráha 1 – marker molekulových hmotností proteinový, 2 – tau-441 (2,5 µg) po fosforylaci, 20 hod, 3 – tau-441 (2,5 µg) nefosforylovaný, 20 hod, 4 – tau-441 (2,5 µg) po fosforylaci, 6 hod, 5 – tau-441 (2 µg) (A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 12% gel, gel po transferu barven roztokem amoniakálního stříbra, B) NC membrána, barveno Ponceau S)

Z výsledků je zřejmé, že opětovně došlo ke ztrátě proteinu tau-441 během fosforylace a následné přípravy vzorků pro analýzu. I přesto, že ve vzorcích nebyla metodou SDS-PAGE prokázána přítomnost proteinu tau-441, byly vzorky proteinu tau-441 po fosforylaci imobilizovanou PKA analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie, viz Tabulka 15. Vzorek proteinu tau-441 po fosforylaci byl štěpen pomocí trypsinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.39 a následně obohacen podle postupu uvedeného v kapitole 3.40. Poté byl vzorek odsolen a analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie podle postupu uvedeného v kapitole 3.19. Vyhodnocení bylo provedeno na základě neutrálních ztrát H_3PO_4 ve zdroji, predikce fosforylačních míst a přímým porovnáním posunů m/z pro tau-441 a jeho *in vitro* fosforylovanou formu. Přičemž bylo takto detekováno několik fosopeptidů pocházejících z fosforylované formy tau-441, což dokazuje jeho úspěšnou *in vitro* fosforylaci.

Tabulka 15 Vyhodnocení fosforylace proteinu tau-441 imobilizovanou PKA pomocí hmotnostní spektrometrie

m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba (Δ ppm)	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
1500,750	1500,746	3,03	1Fosfo	212	224	1	(R)TPSLPTPTREPK(K)
1658,795	1658,790	3,15	1Fosfo	354	369	0	(K)IGSLDNITHVPGGGNK(K)
1743,885	1743,879	3,39	1Fosfo	210	224	2	(R)SRTPSLPTPTREPK(K)
1786,890	1786,885	2,85	1Fosfo	354	370	1	(K)IGSLDNITHVPGGGNKK(I)
1823,849	1823,845	1,79	2Fosfo	210	224	2	(R)SRTPSLPTPTREPK(K)
2060,063	2060,058	2,38	1Fosfo	299	317	0	(K)HVPGGGSVQIVYKPVDSLK(V)

Dosažené výsledky potvrdily, že nosič s imobilizovanou PKA je možné použít pro cílenou fosforylaci proteinů, avšak u proteinu tau-441 s vysokou a opakovaně prokázanou tendencí sorbovat a spontánně agregovat je nutné dořešit krok kvantitativního uvolnění proteinu z povrchu magnetických částic.

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavést metodu pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů/proteinů pomocí solubilních a imobilizovaných kináz.

V rámci ověření možnosti detekce míry fosforylace vybraných peptidů pomocí metod SDS-PAGE v prostředí tricinu bez/s přidavkem močoviny a bodového přenosu na membránu bylo potvrzeno, že pro tento účel není ani jedna ze zmíněných metod vhodná. Proto byla pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů vybrána instrumentálně náročnější avšak osvědčená metoda hmotnostní spektrometrie.

Dalším úkolem bylo zavést metodu pro průkaz fosforylace proteinů pomocí dendrimera pIMAGO. Byla provedena optimalizace metody v kombinaci s bodovým přenosem na membránu, dále v kombinaci s polosuchým westernovým přenosem na membránu a v uspořádání na mikrotitrační destičce. Bylo potvrzeno, že metoda využívající dendrimer pIMAGO je vhodná pro monitorování fosforylace proteinů, přičemž byla prokázána vyšší citlivost metody v uspořádání na mikrotitrační destičce, než v případě její kombinace s polosuchým westernovým přenosem.

Další část diplomové práce byla zaměřena na imobilizaci vybraných modelových enzymů na magnetické částice včetně stanovení jejich enzymové aktivity. Bylo ověřeno, že nosiče s imobilizovanými proteolytickými enzymy jsou vhodné pro cílenou fragmentaci proteinů před jejich analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie.

V rámci dalších experimentů byla úspěšně zavedena metoda pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů s využitím hmotnostní spektrometrie. Dále bylo prokázáno, že pro monitorování enzymové fosforylace proteinů je vhodná kombinace polosuchého westernového přenosu a detekce pomocí fosfo-specifických protilátek a metoda hmotnostní spektrometrie.

6. SEZNAM ZKRATEK

2,5-DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (z angl. 2,5-dihydroxybenzoic acid)

2D – dvourozměrný (z angl. two-dimensional)

2D fluorescence DIGE – dvourozměrná fluorescenční diferenční gelová elektroforéza (z angl. two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis)

AA – aminokyselina (z angl. amino acid)

Ab – protilátka (z angl. antibody)

Abl – Abl tyrosin kinázy

ACN – acetonitril (z angl. acetonitrile)

AGC – skupina proteinkináz obsahující PKA, PKG a PKC rodiny (z angl. containing PKA, PKG, PKC families)

AQUA – absolutní kvantifikace (z angl. absolute quantification)

ATP – adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)

BAPNA – N- α -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)

CAK – CDK-aktivační kinázy (z angl. CDK-activating kinases)

CAMK – Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinázy (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinases)

CaMK1, CaMK2 – Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinázy 1, 2 (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinases 1, 2)

CAMKK – kinázy Ca²⁺/kalmodulin-dependentních proteinkináz (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinases)

CAMKL – Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinázy like (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinases like)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (z angl. cyclic adenosine monophosphate)

CASK – Ca²⁺/kalmodulin-dependentní serin proteinkinázy (z angl. calcium/calmodulin-dependent serine protein kinases)

CDK, CDK2, CDK5 – cyklin-dependentní kinázy 2, 5 (z angl. cyclin-dependent kinases 2, 5)

CDKL – cyklin-dependentní kinázy like (z angl. cyclin-dependent kinases-like)

CID – kolizně indukovaná disociace (z angl. collision-induced dissociation)

CK, CK1, CK2 – kasein kinázy 1, 2 (z angl. casein kinases 1, 2)

CLK – Cdc2-like kinázy (z angl. cdc2-like kinases)

CMGC – skupina proteinkináz obsahující CDK, MAPK, GSK-3 a CLK rodiny (z angl. containing CDK, MAPK, GSK-3, CLK families)

DAHC – hydrogencitrát dvojamonný (z angl. diammonium hydrogen citrate)

DAPK – proteinkinázy asociované se smrtí (z angl. death-associated protein kinases)

DCAMKL – Doublecortin- a CAMK-like kinázy (z angl. doublecortin- and CAMK-like kinases)

DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (z angl. 2,5-dihydroxybenzoic acid)

DIPPL – metoda diferenciálního značení fosfoproteinů (z angl. differential phosphoprotein labeling)

DMPK – proteinkinázy myotonické dystrofie (z angl. dystrophia myotonica protein kinases)

DTT – dithiothreitol (z angl. dithiothreitol)

DYRK – duálně specifické kinázy regulované fosforylací tyrosinu (z angl. dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase)

ECD – disociace záchytem elektronů (z angl. electron capture dissociation)

EDAC – N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid

ELISA – enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA-PLA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay – proximity ligation assay)

ERK – extracelulárně regulované kinázy (z angl. extracellular signal-regulated kinases)

ESI – elektrosprejová ionizace (z angl. electrospray ionization)

ETD – disociace přenosem elektronu (z angl. electron transfer dissociation)

FDIT – detekce fluorescence ve zkumavce (z angl. fluorescence detection in tube)

FTICR – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transform ion cyclotron resonance)

FWHM – plná šířka píku v polovině jeho výšky (z angl. full width at half maximum)

GRK – receptorové kinázy spojené s G proteinem (z angl. G protein-coupled receptor kinases)

GSK-3 – glykogen syntáza kináza-3 (z angl. glycogen synthase kinase-3)

GTP – guanosintrifosfát (z angl. guanosine triphosphate)

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (z angl. hydrophilic interaction chromatography)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)

HRP – křenová peroxidáza (z angl. horseradish peroxidase)

CHCA – kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (z angl. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

IAA – iodacetamid (z angl. iodoacetamide)

IMAC – afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (z angl. immobilized metal affinity chromatography)

IMAEP – afinitní elektroforéza na imobilizovaných iontech kovů (z angl. immobilized metal affinity electrophoresis)

IPG – imobilizovaný pH gradient (z angl. immobilized pH gradient)

IRAK – kinázy asociované s receptorem pro interleukin-1 (z angl. interleukin-1 receptor-associated kinases)

iTRAQ – izobarické tagy pro relativní a absolutní kvantifikaci (z angl. isobaric tags for relative and absolute quantification)

JNK – c-Jun N-terminální kinázy (z angl. c-Jun N-terminal kinases)

LA – kyselina mléčná (z angl. lactic acid)

LC – kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)

MALDI – laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy (z angl. mitogen-activated protein kinases)

MAPKAPK – MAPK-aktivované proteinkinázy (z angl. MAPK-activated protein kinases)

MAPKKK – MAPK kináza kinázy (z angl. MAPK kinase kinases)

MAST – s mikrotubuly asociované serin/threonin kinázy (z angl. microtubule associated serin/threonin kinases)

MBP – myelinový bazický protein (z angl. myelin basic protein)

MKK, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7 – MAPK kinázy (z angl. MAPK kinases)

MLCK – kinázy lehkého řetězce myosinu (z angl. myosin light chain kinases)

MLK – kinázy směsných linií (z angl. mixed-lineage kinases)

mRNA – mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)

MS – hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. tandem mass spectrometry)

NC membrána – nitrocelulósová membrána (z angl. nitrocellulose membrane)

non-PDPK – prolinem neřízené protein kinázy (z angl. non-proline-directed protein kinases)

PAA – polyakrylamid (z angl. polyacrylamide)

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)

PAGIF – izoelektrická fokusace na tenké vrstvě polyakrylamidového gelu (z angl. isoelectric focusing on thin-layer polyacrylamide gel)

PDPK – prolinem řízené proteinkinázy (z angl. proline-directed protein kinases)

PhIAT – izotopicky kódované afinitní tagy pro kvantifikaci fosfoproteinů (z angl. phosphoprotein isotope-coded affinity tags)

PhK – fosforyláza kinázy (z angl. phosphorylase kinases)

pIMAGO (z angl. phospho-imaging)

PKA – proteinkinázy A (z angl. protein kinase A)

PKB – proteinkinázy B (z angl. protein kinase B)

PKC – proteinkinázy C (z angl. protein kinase C)

PKD – proteinkinázy D (z angl. protein kinase D)

PKG – proteinkinázy G (z angl. protein kinase G)

PKN – proteinkinázy N (z angl. protein kinase N)

PLK – polo-like kinázy (z angl. polo-like kinases)

PNPP – hexahydrát disodné soli 4-nitrofenyl fosfátu (z angl. 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate)

PolyMAC – afinitní zachycení na polymeru funkcionalizovaném kovovými ionty (z angl. polymer-based metal ion affinity capture)

PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6, PP7 – proteinfosfatáza 1 – 7 (z angl. protein phosphatase 1 – 7)

PPM – metal-dependentní proteinfosfatázy (z angl. metallo-dependent protein phosphatases)

PPP – fosfoproteinfosfatázy (z angl. phosphoprotein phosphatases)

PrP – prionový protein

PrPC – normální buněčný prion

PrPSc – patologický buněčný prion

PTP – protein tyrosin fosfatázy (z angl. protein tyrosine phosphatases)

PVDF membrána – polyvinyliden difluoridová membrána (z angl. polyvinylidene difluoride membrane)

RIPK – proteinkinázy interagující s receptorem (z angl. receptor-interacting protein kinases)

RSK – ribozomální protein S6 kinázy (z angl. ribosomal protein S6 kinases)

SAPK – stresem aktivované proteinkinázy (z angl. stress-activated protein kinases)

SAX – iontově výměnná chromatografie na silném anexu (z angl. strong anion exchange chromatography)

SCX – iontově výměnná chromatografie na silném katexu (z angl. strong cation exchange chromatography)

SDS – dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)

SGK – kinázy regulované sérem a glukokortikoidy (z angl. serum- and glucocorticoid-regulated kinases)

SIMAC – IMAC se sekvenční elucí (z angl. sequential elution from IMAC)

Src – Src tyrosin kinázy

SRPK – serin-arginin proteinkinázy pro sestřihový faktor (z angl. serine-arginine splicing factor protein kinases)

STE – skupina homologů kvasinkových kináz Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 (z angl. homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases)

STE11/MAPKKK – kinázy kináz mitogenem aktivovaných proteinkináz (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase kinases)

STE20/MAPKKKK – kinázy kináz kináz mitogenem aktivovaných proteinkináz (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinases)

STE7/MAPKK – kinázy mitogenem aktivovaných proteinkináz (z angl. mitogen-activated protein kinase kinases)

Sulfo-NHS – N-hydroxysulfosukcinimid sodný

SUPHEPA – N-sukcinyln-L-fenylalanin-p-nitroanilid (z angl. N-succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid)

Tec – Tec tyrosin kinázy

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin

TFA – kyselina trifluoroctová (z angl. trifluoroacetic acid)

TK – tyrosinové kinázy (z angl. tyrosine kinases)

TKL – tyrosinové kinázy like (z angl. tyrosine kinase-like)

TOF – analyzátoru doby letu (z angl. time of flight)

TPCK – L-1-tosylamido-2-fenylethyl chloromethyl keton (z angl. L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone)

Tris – Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TSSK – testis-specifické serin kinázy (z angl. testis-specific serine kinases)

TTBK – tau tubulin kinázy (z angl. tau tubulin kinases)

VRK – kinázy spojené s vakcinií (z angl. vaccinia-related kinases)

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD, K. A., WANG, G., UNGER, G., SLATON, J., AHMED, K. Protein kinase CK2 – a key suppressor of apoptosis. *Advances in Enzyme Regulation* 2008, 48(1), 179 – 187.

ALKON, D. L., SUN, M. - K., NELSON, T. J. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2007, 28(2), 51 – 60.

ANNE, S. L., SAUDOU, F., HUMBERT, S. Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *The Journal of Neuroscience* 2007, 27(27), 7318 – 7328.

ATKINS, C. M., YON, M., GROOME, N. P., SWEATT, J. D. Regulation of myelin basic protein phosphorylation by mitogen-activated protein kinase during increased action potential firing in the hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 1999, 73(3), 1090 – 1097.

BAHK, Y. Y., AHSAN-UL-BARI, M., KIM, Y. J. Biomedical application of phosphoproteomics in neurodegenerative diseases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013, 23(3), 279 – 288.

BALLARD, C., GAUTHIER, S., CORBETT, A., BRAYNE, C., AARSLAND, D., JONES, E. Alzheimer's disease. *Lancet* 2011, 377(9770), 1019 – 1031.

BARBIERI, C. M., STOCK, A. M. Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Analytical Biochemistry* 2008, 376(1), 73 – 82.

BECKER, J. S., PRZYBYLSKI, M. Studies of structure and phosphorylation of tau protein using high resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2007, 22, 761 – 765.

BERTRAND, J., SÉNÉCHAL, P., ZUMMO-SOUCY, M., PLOUFFE, V., LECLERC, N. The formation of tau pathological phospho-epitopes in the axon is prevented by the dephosphorylation of selective sites in primary hippocampal neurons over-expressing human tau. *Journal of Neurochemistry* 2010, 114(5), 1353 – 1367.

BODE, A. M., DONG, Z. The functional contrariety of JNK. *Molecular Carcinogenesis* 2007, 46(8), 591 – 598.

BOERSEMA, P. J., MOHAMMED, S., HECK, A. J. R. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2009, 44(6), 861 – 878.

BOGGS, J. M., RANGARAJ, G., DICKO, A. Effect of phosphorylation of phosphatidylinositol on myelin basic protein-mediated binding of actin filaments to lipid bilayers in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1818(9), 2217 – 2227.

BOGOYEVITCH, M. A., NGOEI, K. R. W., ZHAO, T. T., YEAP, Y. Y. C., NG, D. C. H. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010, 1804(3), 463 – 475.

- BOUSKILA, M., ESOF, N., GAY, L., FANG, E. H., DEAK, M., BEGLEY, M. J., CANTLEY, L. C., PRESCOTT, A., STOREY, K. G., ALESSI, D. R. TTBK2 kinase substrate specificity and the impact of spinocerebellar-ataxia-causing mutations on expression, activity, localization and development. *The Biochemical Journal* 2011, 437(1), 157 – 167.
- BOWLEY, E., MULVIHILL, E., HOWARD, J. C., PAK, B. J., GAN, B. S., O'GORMAN, D. B. A novel mass spectrometry-based assay for GSK-3 β activity. *BMC Biochemistry* 2005, 6:29.
- BRODBELT, J. S., WILSON, J. J. Infrared multiphoton dissociation in quadrupole ion traps. *Mass Spectrometry Reviews* 2009, 28(3), 390 – 424.
- BROWN, M. T., COOPER, J. A. Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1287(2-3), 121 – 149.
- BROWN, R., STUART, S. S., HOUEL, S., AHN, N. G., OLD, W. M. Large-scale examination of factors influencing phosphopeptide neutral loss during collision induced dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2015, 26(7), 1128 – 1142.
- BRUNDEN, K. R., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. - Y. Advances in Tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009, 8(10), 783 – 793.
- BRUSHIA, R. J., WALSH, D. A. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Frontiers in Bioscience* 1999, 4, 618 – 641.
- BUÉE, L., TROQUIER, L., BURNOUF, S., BELARBI, K., VAN DER JEUGD, A., AHMED, T., FERNANDEZ-GOMEZ, F., CAILLIEREZ, R., GROSJEAN, M. - E., BEGARD, S., BARBOT, B., DEMEYER, D., OBRIOT, H., BRION, I., BUÉE-SCHERRER, V., MAURAGE, C. - A., BALSCHUN, D., D'HOOGHE, R., HAMDANE, M., BLUM, D., SERGEANT, N. From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? *Biochemical Society Transactions* 2010, 38(4), 967 – 972.
- BUNGEROTH, M., APPENZELLER, S., REGULIN, A., VÖLKER, W., LORENZEN, I., GRÖTZINGER, J., PENDZIWIAT, M., KUHLENBÄUMER, G. Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiology of Aging* 2014, 35(8), 1913 – 1919.
- CAMPBELL, D. G., MORRICE, N. A. Identification of protein phosphorylation sites by a combination of mass spectrometry and solid phase Edman Sequencing. *Journal of Biomolecular Techniques* 2002, 13(3), 119 – 130.
- Cell Signaling Technology [online]. 2017 [cit. 12. 6. 2017]. Dostupné z: <https://www.cellsignal.com/contents/science/protein-kinases-introduction/kinases>.
- CLOKIE, S., FALCONER, H., MACKIE, S., DUBOIS, T., AITKEN, A. The interaction between casein kinase I α and 14-3-3 is phosphorylation dependent. *The FEBS Journal* 2009, 276(23), 6971 – 6984.
- COBB, M. H., GOLDSMITH, E. J. How MAP kinases are regulated. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270(25), 14843 – 14846.

- COLE, A., FRAME, S., COHEN, P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *The Biochemical Journal* 2004, 377(1), 249 – 255.
- CONG, W. - T., YE, W. - J., CHEN, M., ZHAO, T., ZHU, Z. - X., NIU, C., RUAN, D. - D., NI, M. - W., ZHOU, X., JIN, L. - T. Improved staining of phosphoproteins with high sensitivity in polyacrylamide gels using Stains-All. *Electrophoresis* 2013, 34(24), 3277 – 3286.
- CUENDA, A., ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, 1773(8), 1358 – 1375.
- DANI, M., BROOKS, D. J., EDISON, P. Tau imaging in neurodegenerative diseases. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2016, 43(6), 1139 – 1150.
- DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000, 103(2), 239 – 252.
- DAWOUD, A. A., SARVAIYA, H. A., LAZAR, I. M. Microfluidic platform with mass spectrometry detection for the analysis of phosphoproteins. *Electrophoresis* 2007, 28(24), 4645 – 4660.
- DE VIVO, M., BOTTEGONI, G., BERTEOTTI, A., RECANATINI, M., GERVASIO, F. L., CAVALLI, A. Cyclin-dependent kinases: bridging their structure and function through computations. *Future Medicinal Chemistry* 2011, 3(12), 1551 – 1559.
- DEL GOBBO, A., PEVERELLI, E., TREPPIEDI, D., LANIA, A., MANTOVANI, G., FERRERO, S. Expression of protein kinase A regulatory subunits in benign and malignant human thyroid tissues: a systematic review. *Experimental Cell Research* 2016, 346(1), 85 – 90.
- DELOM, F., CHEVET, E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Science* 2006, 4:15.
- DHAWAN, P., SINGH, A. B., ELLIS, D. L., RICHMOND, A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor- κ B and tumor progression. *Cancer Research* 2002, 62(24), 7335 – 7342.
- DI DOMENICO, F., SULTANA, R., BARONE, E., PERLUIGI, M., CINI, C., MANCUSO, C., CAI, J., PIERCE, W. M., BUTTERFIELD, D. A. Quantitative proteomics analysis of phosphorylated proteins in the hippocampus of Alzheimer's disease subjects. *Journal of Proteomics* 2011, 74(7), 1091 – 1103.
- DIDICHENKO, S. A., TILTON, B., HEMMINGS, B. A., BALLMER-HOFER, K., THELEN, M. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47^{phox} by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Current Biology* 1996, 6(10), 1271 – 1278.
- DOBLE, B. W., WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* 2003, 116(7), 1175 – 1186.
- ENGHOLM-KELLER, K., BIRCK, P., STØRLING, J., POCIOT, F., MANDRUP-POULSEN, T., LARSEN, M. R. TiSH – a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *Journal of Proteomics* 2012, 75(18), 5749 – 5761.

- ERICKSON, A. K., PAYNE, D. M., MARTINO, P. A., ROSSOMANDO, A. J., SHABANOWITZ, J., WEBER, M. J., HUNT, D. F., STURGILL, T. W. Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, 265(32), 19728 – 19735.
- ERIKSSON, A., BERGQUIST, J., EDWARDS, K., HAGFELDT, A., MALMSTRÖM, D., AGMO HERNÁNDEZ, V. Optimized protocol for on-target phosphopeptide enrichment prior to matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry using mesoporous titanium dioxide. *Analytical Chemistry* 2010, 82(11), 4577 – 4583.
- FANG, X., YU, S. X., LU, Y., BAST, R. C. Jr., WOODGETT, J. R., MILLS, G. B. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(22), 11960 – 11965.
- FENG, L., YUNOUE, S., TOKUO, H., OZAWA, T., ZHANG, D., PATRAKITKOMJORN, S., ICHIMURA, T., SAYA, H., ARAKI, N. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Letters* 2004, 557(1-3), 275 – 282.
- FERRER, I., BLANCO, R., CARMONA, M., RIBERA, R., GOUTAN, E., PUIG, B., REY, M. J., CARDOZO, A., VIÑALS, F., RIBALTA, T. Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathology* 2001, 11(2), 144 – 158.
- FRAME, S., COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical Journal* 2001, 359(1), 1 – 16.
- FREELEY, M., KELLEHER, D., LONG, A. Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cellular Signalling* 2011, 23(5), 753 – 762.
- FUNCHAL, C., DE ALMEIDA, L. M. V., OLIVEIRA LOUREIRO, S., VIVIAN, L., DE LIMA PELAEZ, P., DALL BELLO PESSUTTO, F., ROSA, A. M., WAJNER, M., PESSOA PUREUR, R. In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain Research Protocols* 2003, 11(2), 111 – 118.
- GEMBITSKY, D. S., LAWLOR, K., JACOVINA, A., YANEVA, M., TEMPST, P. A prototype antibody microarray platform to monitor changes in protein tyrosine phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004, 3(11), 1102 – 1118.
- GERBER, S. A., RUSH, J., STEMMAN, O., KIRSCHNER, M. W., GYGI, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(12), 6940 – 6945.
- GIAMAS, G., HIRNER, H., SHOSHIASHVILI, L., GROTHEY, A., GESSERT, S., KÜHL, M., HENNE-BRUNS, D., VORGAS, C. E., KNIPPSCHILD, U. Phosphorylation of CK1δ: identification of Ser³⁷⁰ as the major phosphorylation site targeted by PKA in vitro and in vivo. *The Biochemical Journal* 2007, 406(3), 389 – 398.

- GIANNOPOULOS, P. N., ROBERTSON, C., JODOIN, J., PAUDEL, H., BOOTH, S. A., LeBLANC, A. C. Phosphorylation of prion protein at serine 43 induces prion protein conformational change. *The Journal of Neuroscience* 2009, 29(27), 8743 – 8751.
- GOEDERT, M., HASEGAWA, M., JAKES, R., LAWLER, S., CUENDA, A., COHEN, P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Letters* 1997, 409(1), 57 – 62.
- GOEDERT, M., JAKES, R., CROWTHER, R. A., COHEN, P., VANMECHELEN, E., VANDERMEEREN, M., CRAS, P. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *The Biochemical Journal* 1994, 301(3), 871 – 877.
- GOLDBERG, H. A., WARNER, K. J. The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of "Stains-All" staining in combination with silver nitrate. *Analytical Biochemistry* 1997, 251(2), 227 – 233.
- GOODMAN, T., SCHULENBERG, B., STEINBERG, T. H., PATTON, W. F. Detection of phosphoproteins on electroblot membranes using a small-molecule organic fluorophore. *Electrophoresis* 2004, 25(15), 2533 – 2538.
- GOSHE, M. B., VEENSTRA, T. D., PANISKO, E. A., CONRADS, T. P., ANGELL, N. H., SMITH, R. D. Phosphoprotein isotope-coded affinity tags: application to the enrichment and identification of low-abundance phosphoproteins. *Analytical Chemistry* 2002, 74(3), 607 – 616.
- GOZKE, E., ERDAL, N., UNAL, M. Creutzfeldt-Jacob Disease: a case report. *Cases Journal* 2008, 1:146.
- GRAHAM, K. C., LITCHFIELD, D. W. The regulatory β subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(7), 5003 – 5010.
- GRAY, N., DÉTIVAUD, L., DOERIG, C., MEIJER, L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Current Medicinal Chemistry* 1999, 6(9), 859 – 875.
- GREEN, M. R., PASTEWKA, J. V., PEACOCK, A. C. Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye. *Analytical Biochemistry* 1973, 56(1), 43 – 51.
- GRØNBORG, M., KRISTIANSEN, T. Z., STENSALLE, A., ANDERSEN, J. S., OHARA, O., MANN, M., JENSEN, O. N., PANDEY, A. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002, 1(7), 517 – 527.
- HAN, G., YE, M., ZHOU, H., JIANG, X., FENG, S., JIANG, X., TIAN, R., WAN, D., ZOU, H., GU, J. Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *Proteomics* 2008, 8(7), 1346 – 1361.
- HANADA, M., FENG, J., HEMMING, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1697(1-2), 3 – 16.

- HARDCASTLE, I. R., GOLDING, B. T., GRIFFIN, R. J. Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2002, 42, 325 – 348.
- HE, T., ALVING, K., FEILD, B., NORTON, J., JOSELOFF, E. G., PATTERSON, S. D., DOMON, B. Quantitation of phosphopeptides using affinity chromatography and stable isotope labeling. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004, 15(3), 363 – 373.
- HILL, C. M. D., LIBICH, D. S., HARAUZ, G. Assembly of tubulin by classic myelin basic protein isoforms and regulation by post-translational modification. *Biochemistry* 2005, 44(50), 16672 – 16683.
- HOULDEN, H., JOHNSON, J., GARDNER-THORPE, C., LASHLEY, T., HERNANDEZ, D., WORTH, P., SINGLETON, A. B., HILTON, D. A., HOLTON, J., REVESZ, T., DAVIS, M. B., GIUNTI, P., WOOD, N. W. Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nature Genetics* 2007, 39(12), 1434 – 1436.
- HROMADKOVA, L., KOLAROVA, M., JANKOVICOVA, B., BARTOS, A., RICNY, J., BILKOVA, Z., RIPOVA, D. Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *Journal of Neuroimmunology* 2015, 289, 121 – 129.
- HUI, L., BAKIRI, L., STEPNIAK, E., WAGNER, E. F. p38 α : a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 2007, 6(20), 2429 – 2433.
- CHAMBERLAIN, J. S., VAN TUINEN, P., REEVES, A. A., PHILIP, B. A., CASKEY, C. T. Isolation of cDNA clones for the catalytic γ subunit of mouse muscle phosphorylase kinase: expression of mRNA in normal and mutant Phk mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84(9), 2886 – 2890.
- CHEONG, J. K., VIRSHUP, D. M. Casein kinase 1: complexity in the family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011, 43(4), 465 – 469.
- IKEZU, S., IKEZU, T. Tau-tubulin kinase. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2014, 7:33.
- ILIUK, A. B., MARTIN, V. A., ALICIE, B. M., GEAHLEN, R. L., TAO, W. A. In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanoparticles. *Molecular & Cellular Proteomics* 2010, 9(10), 2162 – 2172.
- ILIUK, A. B., TAO, W. A. Universal non-antibody detection of protein phosphorylation using pIMAGO. *Current Protocols in Chemical Biology* 2015, 7(1), 17 – 25.
- ILIUK, A., LIU, X. S., XUE, L., LIU, X., TAO, W. A. Chemical visualization of phosphoproteomes on membrane. *Molecular & Cellular Proteomics* 2012, 11(9), 629 – 639.
- ILIUK, A., MARTINEZ, J. S., HALL, M. C., TAO, W. A. Phosphorylation assay based on multifunctionalized soluble nanopolymer. *Analytical Chemistry* 2011, 83(7), 2767 – 2774.
- JABBARI, S., ALI, M. K., EMADI, S. Electrophoretic analysis of phospho and non-phospho protein mixtures extracted from zebrafish whole brain samples by immobilized metal affinity electrophoresis. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2014, 11(4), 1165 – 1172.

JANEK, K., WENSCHUH, H., BIENERT, M., KRAUSE, E. Phosphopeptide analysis by positive and negative ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15(17), 1593 – 1599.

JANKOVICOVA, B., ROSNEROVA, S., SLOVAKOVA, M., ZVERINOVA, Z., HUBALEK, M., HERNYCHOVA, L., REHULKA, P., VIOVY, J. - L., BILKOVA, Z. Epitope mapping of allergen ovalbumin using biofunctionalized magnetic beads packed in microfluidic channels The first step towards epitope-based vaccines. *Journal of Chromatography A* 2008, 1206(1), 64 – 71.

JEFFREY, P. D., RUSSO, A. A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUÉ, J., PAVLETICH, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 1995, 376(6538), 313 – 320.

JIA, M., LIN, K. W., SOUCHELNYTSKYI, S. *Phosphoproteomics: Detection, identification and importance of protein phosphorylation, Integrative Proteomics*. 2012, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), InTech, ISBN 978-953-51-0070-6.

JIANG, Q., GU, Z., ZHANG, G., JING, G. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. *Brain Research* 2000, 857(1-2), 71 – 77.

JIANG, S., LIU, S., ZHAO, C., WU, C. Developing protocols of tricine-SDS-PAGE for separation of polypeptides in the mass range 1-30 kDa with minigel electrophoresis system. *International Journal of Electrochemical Science* 2016, 11, 640 – 649.

JIN, X., GOU, J. - Y. A rapid and cost-effective fluorescence detection in tube (FDIT) method to analyze protein phosphorylation. *Plant Methods* 2016, 12:43.

KAUFMANN, H., BAILEY, J. E., FUSSENEGGER, M. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2001, 1(2), 194 – 199.

KEMP, B. E., GRAVES, D. J., BENJAMINI, E., KREBS, E. G. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1977, 252(14), 4888 – 4894.

KIEFER, S. E., CHANG, C. J., KIMURA, S. R., GAO, M., XIE, D., ZHANG, Y., ZHANG, G., GILL, M. B., MASTALERZ, H., THOMPSON, L. A., CACACE, A. M., SHERIFF, S. The structure of human tau-tubulin kinase 1 both in the apo form and in complex with an inhibitor. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 2014, 70(2), 173 – 181.

KIMURA, T., HATSUTA, H., MASUDA-SUZUKAKE, M., HOSOKAWA, M., ISHIGURO, K., AKIYAMA, H., MURAYAMA, S., HASEGAWA, M., HISANAGA, S. The abundance of nonphosphorylated tau in mouse and human tauopathy brains revealed by the use of phos-tag method. *The American Journal of Pathology* 2016, 186(2), 398 – 409.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E. Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 2011, 11(2), 319 – 323.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., KOIKE, T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015, 1854(6), 601 – 608.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., KOIKE, T. Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics* 2012, 12(2), 192 – 202.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., KOIKE, T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols* 2009, 4(10), 1513 – 1521.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., MATSUBARA, M., YAMADA, S., NAKAMURA, H., SHIRO, Y., AOKI, Y., OKITA, K., KOIKE, T. Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics* 2008, 8(15), 2994 – 3003.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., TAKIYAMA, K., KOIKE, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5(4), 749 – 757.

KINOSHITA-KIKUTA, E., KINOSHITA, E., KOIKE, T. A laborsaving, timesaving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in Phos-tag affinity electrophoresis. *International Journal of Chemistry* 2012, 4(5), 1 – 8.

KITANO-TAKAHASHI, M., MORITA, H., KONDO, S., TOMIZAWA, K., KATO, R., TANIO, M., SHIROTA, Y., TAKAHASHI, H., SUGIO, S., KOHNO, T. Expression, purification and crystallization of a human tau-tubulin kinase 2 that phosphorylates tau protein. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 2007, 63(7), 602 – 604.

KNIPPSCHILD, U., GOCHT, A., WOLFF, S., HUBER, N., LÖHLER, J., STÖTER, M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling* 2005, 17(6), 675 – 689.

KOIVUNEN, J., AALTONEN, V., PELTONEN, J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* 2006, 235(1), 1 – 10.

KOLAROVA, M., GARCÍA-SIERRA, F., BARTOS, A., RICNY, J., RIPOVA, D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, 2012:731526.

KOVALSKA, V. B., VALYUKH, I. V., LUKASHOV, S. S., SLOMINSKII, Y. L., YARMOLUK, S. M. An investigation of tricarbocyanines “Stains-All” and “iso-Stains-All” as fluorescent nucleic acids probes. *Journal of Fluorescence* 2002, 12(2), 209 – 212.

KWEON, H. K., HÅKANSSON, K. Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry* 2006, 78(6), 1743 – 1749.

LARSEN, M. R., THINGHOLM, T. E., JENSEN, O. N., ROEPSTORFF, P., JØRGENSEN, T. J. D. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, 4(7), 873 – 886.

- LI, Y., ZHANG, J., GAO, W., ZHANG, L., PAN, Y., ZHANG, S., WANG, Y. Insights on structural characteristics and ligand binding mechanisms of CDK2. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, 16(5), 9314 – 9340.
- LITCHFIELD, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *The Biochemical Journal* 2003, 369(1), 1 – 15.
- LIU, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., GONG, C. - X. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *The European Journal of Neuroscience* 2005, 22(8), 1942 – 1950.
- LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ZIPURSKY, S. L., DARNELL, J. *Molecular cell biology* (5th Edition). New York: W. H. Freeman and Company, 2004, 973 s. ISBN 0-7167-4366-3.
- LOCHHEAD, P. A., SIBBET, G., MORRICE, N., CLEGHON, V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 2005, 121(6), 925 – 936.
- LOLLI, G., JOHNSON, L. N. CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 2005, 4(4), 572 – 577.
- LUND, E. T., MCKENNA, R., EVANS, D. B., SHARMA, S. K., MATHEWS, W. R. Characterization of the in vitro phosphorylation of human tau by tau protein kinase II (cdk5/p20) using mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* 2001, 76(4), 1221 – 1232.
- MA, M. - R., HU, Z. - W., ZHAO, Y. - F., CHEN, Y. - X., LI, Y. - M. Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Scientific Reports* 2016, 6:37130.
- MACHIDA, M., KOSAKO, H., SHIRAKABE, K., KOBAYASHI, M., USHIYAMA, M., INAGAWA, J., HIRANO, J., NAKANO, T., BANDO, Y., NISHIDA, E., HATTORI, S. Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *The FEBS Journal* 2007, 274(6), 1576 – 1587.
- MAMONE, G., CAIRA, S., GARRO, G., NICOLAI, A., FERRANTI, P., PICARIELLO, G., MALORNI, A., CHIANESE, L., ADDEO, F. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2003, 24(16), 2824 – 2837.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002, 298(5600), 1912 – 1934.
- MARTIN, K., STEINBERG, T. H., COOLEY, L. A., GEE, K. R., BEECHEM, J. M., PATTON, W. F. Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Proteomics* 2003, 3(7), 1244 – 1255.
- MARTIN, L., LATYPOVA, X., TERRO, F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 2011, 58(4), 458 – 471.
- MARTIN, L., LATYPOVA, X., WILSON, C. M., MAGNAUDEIX, A., PERRIN, M. - L., YARDIN, C., TERRO, F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 2013a, 12(1), 289 – 309.

MARTIN, L., LATYPOVA, X., WILSON, C. M., MAGNAUDEIX, A., PERRIN, M. - L., TERRO, F. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Research Reviews* 2013b, 12(1), 39 – 49.

McCUBREY, J. A., STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W., CHANG, F., LEHMANN, B., TERRIAN, D. M., MILELLA, M., TAFURI, A., STIVALA, F., LIBRA, M., BASECKE, J., EVANGELISTI, C., MARTELLI, A. M., FRANKLIN, R. A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, 1773(8), 1263 – 1284.

McNULTY, D. E., ANNAN, R. S. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008, 7(5), 971 – 980.

MEHTA, D. C., SHORT, J. L., HILMER, S. N., NICOLAZZO, J. A. Drug access to the central nervous system in Alzheimer's disease: preclinical and clinical insights. *Pharmaceutical Research* 2015, 32(3), 819 – 839.

MENDOZA, J., SEKIYA, M., TANIGUCHI, T., IJIMA, K. M., WANG, R., ANDO, K. Global analysis of phosphorylation of tau by the checkpoint kinases Chk1 and Chk2 in vitro. *Journal of Proteome Research* 2013, 12(6), 2654 – 2665.

MOLDEN, R. C., GOYA, J., KHAN, Z., GARCIA, B. A. Stable isotope labeling of phosphoproteins for large-scale phosphorylation rate determination. *Molecular & Cellular Proteomics* 2014, 13(4), 1106 – 1118.

MOORHEAD, G. B. G., DE WEVER, V., TEMPLETON, G., KERK, D. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *The Biochemical Journal* 2009, 417(2), 401 – 409.

MOTOYAMA, A., XU, T., RUSE, C. I., WOHLSCHEGEL, J. A., YATES, J. R. III. Anion and cation mixed-bed ion exchange for enhanced multidimensional separations of peptides and phosphopeptides. *Analytical Chemistry* 2007, 79(10), 3623 – 3634.

MUKRASCH, M. D., BIBOW, S., KORUKOTTU, J., JEGANATHAN, S., BIERNAT, J., GRIESINGER, C., MANDELKOW, E., ZWECKSTETTER, M. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biology* 2009, 7(2):e1000034.

MUSIEK, E. S., HOLTZMAN, D. M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nature neuroscience* 2015, 18(6), 800 – 806.

MYERS, J. M., VEIS, A., SABSAY, B., WHEELER, A. P. A method for enhancing the sensitivity and stability of Stains-All for phosphoproteins separated in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1996, 240(2), 300 – 302.

NICHOLSON, K. M., ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 2002, 14(5), 381 – 395.

NOBLE, W., HANGER, D. P., MILLER, C. C. J., LOVESTONE, S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology* 2013, 4:83.

NUWAYSIR, L. M., STULTS, J. T. Electrospray ionization mass spectrometry of phosphopeptides isolated by on-line immobilized metal-ion affinity chromatography. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1993, 4(8), 662 – 669.

- PARSONS, S. J., PARSONS, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004, 23(48), 7906 – 7909.
- PAUDEL, H. K., ZWIERS, H., WANG, J. H. Phosphorylase kinase phosphorylates the calmodulin-binding regulatory regions of neuronal tissue-specific proteins B-50 (GAP-43) and neurogranin. *The Journal of Biological Chemistry* 1993, 268(9), 6207 – 6213.
- PEI, J. - J., BRAAK, H., AN, W. - L., WINBLAD, B., COWBURN, R. F., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I. Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research* 2002, 109(1-2), 45 – 55.
- PERLUIGI, M., BARONE, E., DI DOMENICO, F., BUTTERFIELD, D. A. Aberrant protein phosphorylation in Alzheimer disease brain disturbs pro-survival and cell death pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016, 1862(10), 1871 – 1882.
- PETRY, F. R., PELLETIER, J., BRETTEVILLE, A., MORIN, F., CALON, F., HÉBERT, S. S., WHITTINGTON, R. A., PLANEL, E. Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS One* 2014, 9(5):e94251.
- PINKSE, M. W. H., UITTO, P. M., HILHORST, M. J., OOMS, B., HECK, A. J. R. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Analytical Chemistry* 2004, 76(14), 3935 – 3943.
- POSEWITZ, M. C., TEMPST, P. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry* 1999, 71(14), 2883 – 2892.
- PROKOPOVICH, D. V., WHITTAKER, J. W., MUTHEE, M. M., AHMED, A., LARINI, L. Impact of phosphorylation and pseudophosphorylation on the early stages of aggregation of the microtubule-associated protein tau. *The Journal of Physical Chemistry B* 2017, 121(9), 2095 – 2103.
- QIAO, L., ROUSSEL, C., WAN, J., YANG, P., GIRAULT, H. H., LIU, B. Specific on-plate enrichment of phosphorylated peptides for direct MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Proteome Research* 2007, 6(12), 4763 – 4769.
- REHMANN, H., WITTINGHOFER, A., BOS, J. L. Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007, 8(1), 63 – 73.
- REMY, G., RISCO, A. M., IÑESTA-VAQUERA, F. A., GONZÁLEZ-TERÁN, B., SABIO, G., DAVIS, R. J., CUENDA, A. Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cellular Signalling* 2010, 22(4), 660 – 667.
- RUPRECHT, B., KOCH, H., MEDARD, G., MUNDT, M., KUSTER, B., LEMEER, S. Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns. *Molecular & Cellular Proteomics* 2015, 14(1), 205 – 215.
- SACHON, E., MOHAMMED, S., BACHE, N., JENSEN, O. N. Phosphopeptide quantitation using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry: application to proteins isolated by gel electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006, 20(7), 1127 – 1134.

- SAMUEL, F., FLAVIN, W. P., IQBAL, S., PACELLI, C., SRI RENGANATHAN, S. D., TRUDEAU, L. - E., CAMPBELL, E. M., FRASER, P. E., TANDON, A. Effects of serine 129 phosphorylation on α -synuclein aggregation, membrane association, and internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 2016, 291(9), 4374 – 4385.
- SATO, S., CERNY, R. L., BUESCHER, J. L., IKEZU, T. Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *Journal of Neurochemistry* 2006, 98(5), 1573 – 1584.
- SCALES, T. M. E., DERKINDEREN, P., LEUNG, K. - Y., BYERS, H. L., WARD, M. A., PRICE, C., BIRD, I. N., PERERA, T., KELLIE, S., WILLIAMSON, R., ANDERTON, B. H., REYNOLDS, C. H. Tyrosine phosphorylation of tau by the Src family kinases Lck and Fyn. *Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:12.
- SERGEANT, N., BRETTEVILLE, A., HAMDANE, M., CAILLET-BOUDIN, M. – L., GROGNET, P., BOMBOIS, S., BLUM, D., DELACOURTE, A., PASQUIER, F., VANMECHELEN, E., SCHRAEN-MASCHKE, S., BUÉE, L. Biochemistry of tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Review of Proteomics* 2008, 5(2), 207 – 224.
- SHI, S. D. - H., HEMLING, M. E., CARR, S. A., HORN, D. M., LINDH, I., McLAFFERTY, F. W. Phosphopeptide/phosphoprotein mapping by electron capture dissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2001, 73(1), 19 – 22.
- SCHOLZ, T., MANDELKOW, E. Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014, 71(16), 3139 – 3150.
- SCHRAEN-MASCHKE, S., DHAENENS, C. - M., DELACOURTE, A., SABLONNIÈRE, B. Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease* 2004, 15(3), 449 – 460.
- SCHULENBERG, B., AGGELER, R., BEECHEM, J. M., CAPALDI, R. A., PATTON, W. F. Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(29), 27251 – 27255.
- SCHULTE, J., LITTLETON, J. T. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Current Trends in Neurology* 2011, 5, 65 – 78.
- SKALHEGG, B. S., TASKEN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience* 1997, 2, 331 – 342.
- SMAL, C., VERTOMMEN, D., BERTRAND, L., NTAMASHIMIKIRO, S., RIDER, M. H., VAN DEN NESTE, E., BONTEMPS, F. Identification of in vivo phosphorylation sites on human deoxycytidine kinase. Role of Ser-74 in the control of enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(8), 4887 – 4893.
- SOUNDARARAJAN, M., ROOS, A. K., SAVITSKY, P., FILIPPAKOPOULOS, P., KETTENBACH, A. N., OLSEN, J. V., GERBER, S. A., ESWARAN, J., KNAPP, S., ELKINS, J. M. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure* 2013, 21(6), 986 – 996.

STEEN, H., KUSTER, B., FERNANDEZ, M., PANDEY, A., MANN, M. Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(2), 1031 – 1039.

STEINBERG, T. H., AGNEW, B. J., GEE, K. R., LEUNG, W. - Y., GOODMAN, T., SCHULENBERG, B., HENDRICKSON, J., BEECHEM, J. M., HAUGLAND, R. P., PATTON, W. F. Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics* 2003, 3(7), 1128 – 1144.

SYKA, J. E. P., COON, J. J., SCHROEDER, M. J., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(26), 9528 – 9533.

TAYLOR, S. S., ILOUZ, R., ZHANG, P., KORNEV, A. P. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012, 13(10), 646 – 658.

THINGHOLM, T. E., JENSEN, O. N., LARSEN, M. R. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009, 9(6), 1451 – 1468.

THINGHOLM, T. E., JENSEN, O. N., ROBINSON, P. J., LARSEN, M. R. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008, 7(4), 661 – 671.

THINGHOLM, T. E., JØRGENSEN, T. J. D., JENSEN, O. N., LARSEN, M. R. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature Protocols* 2006, 1(4), 1929 – 1935.

THORNTON, T. M., RINCON, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International Journal of Biological Sciences* 2009, 5(1), 44 – 52.

TICHY, A., SALOVSKA, B., REHULKA, P., KLIMENTOVA, J., VAVROVA, J., STULIK, J., HERNYCHOVA, L. Phosphoproteomics: searching for a needle in a haystack. *Journal of Proteomics* 2011, 74(12), 2786 – 2797.

TONG, Q. - H., TAO, T., XIE, L. - Q., LU, H. - J. ELISA–PLA: a novel hybrid platform for the rapid, highly sensitive and specific quantification of proteins and post-translational modifications. *Biosensors & Bioelectronics* 2016, 80, 385 – 391.

TOURNIER, C., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., BARRETT, T., DAVIS, R. J. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH₂-terminal kinase kinases. *Molecular and Cellular Biology* 1999, 19(2), 1569 – 1581.

VILLÉN, J., GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols* 2008, 3(10), 1630 – 1638.

WADA, T., PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004, 23(16), 2838 – 2849.

- WARBY, S. C., CHAN, E. Y., METZLER, M., GAN, L., SINGARAJA, R. R., CROCKER, S. F., ROBERTSON, H. A., HAYDEN, M. R. Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Human Molecular Genetics* 2005, 14(11), 1569 – 1577.
- WAXMAN, E. A., GIASSON, B. I. Characterization of kinases involved in the phosphorylation of aggregated α -synuclein. *Journal of Neuroscience Research* 2011, 89(2), 231 – 247.
- WILSON, K. P., FITZGIBBON, M. J., CARON, P. R., GRIFFITH, J. P., CHEN, W., McCAFFREY, P. G., CHAMBERS, S. P., SU, M. S. - S. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(44), 27696 – 27700.
- WORTZEL, I., SEGER, R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes & Cancer* 2011, 2(3), 195 – 209.
- WYTTENBACH, A., TOLKOVSKY, A. M. Differential phosphoprotein labeling (DIPPL), a method for comparing live cell phosphoproteomes using simultaneous analysis of 33P- and 32P-labeled proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5(3), 553 – 559.
- XU, Z. - B., CHAUDHARY, D., OLLAND, S., WOLFROM, S., CZERWINSKI, R., MALAKIAN, K., LIN, L., STAHL, M. L., JOSEPH-McCARTHY, D., BENANDER, C., FITZ, L., GRECO, R., SOMERS, W. S., MOSYAK, L. Catalytic domain crystal structure of protein kinase C- θ (PKC θ). *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(48), 50401 – 50409.
- YANG, Y., ZHU, X., CHEN, Y., WANG, X., CHEN, R. p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2007, 576(1-3), 26 – 33.
- YAO, K., YOUN, H., GAO, X., HUANG, B., ZHOU, F., LI, B., HAN, H. Casein kinase 2 inhibition attenuates androgen receptor function and cell proliferation in prostate cancer cells. *The Prostate* 2012, 72(13), 1423 – 1430.
- ZAHID, S., OELLERICH, M., ASIF, A. R., AHMED, N. Phosphoproteome profiling of substantia nigra and cortex regions of Alzheimer's disease patients. *Journal of Neurochemistry* 2012, 121(6), 954 – 963.
- ZHANG, G., NEUBERT, T. A. Use of detergents to increase selectivity of immunoprecipitation of tyrosine phosphorylated peptides prior to identification by MALDI quadrupole-TOF MS. *Proteomics* 2006, 6(2), 571 – 578.
- ZHOU, H., TIAN, R., YE, M., XU, S., FENG, S., PAN, C., JIANG, X., LI, X., ZOU, H. Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. *Electrophoresis* 2007, 28(13), 2201 – 2215.
- ZHOU, H., XU, S., YE, M., FENG, S., PAN, C., JIANG, X., LI, X., HAN, G., FU, Y., ZOU, H. Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Proteome Research* 2006, 5(9), 2431 – 2437.