

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Detekce enzymové aktivity proteinkináz imobilizovaných na magnetických  
částicích

Diplomová práce

2022

Michaela Šislerová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Šislerová**  
Osobní číslo: **C20485**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Detekce enzymové aktivity proteinkináz imobilizovaných na magnetických částicích**  
Téma práce anglicky: **Detection Of Enzyme Activity Of Kinases Immobilized On Magnetic Particles**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

1. Informace o enzymech podílejících se na fosforylaci proteinů se zaměřením na proteinkinázu A (PKA) – struktura, funkce, reakční mechanismus, výskyt
2. Metody studia enzymové aktivity kináz a fosforylace proteinů
3. Možnosti monitorování enzymové aktivity PKA elektrochemicky – detekční metoda, elektrody, uspořádání

### Experimentální část:

Fosforylace substrátu Kemptide solubilní PKA v čase a ověření pomocí hmotnostní spektrometrie.  
Imobilizace PKA na magnetické částice, fosforylace substrátu imobilizovanou kinázou a ověření pomocí hmotnostní spektrometrie.  
Zavedení metody elektrochemické detekce fosforylovaného substrátu – volba vhodné elektrody, detekční metody, optimalizace podmínek, modifikace pracovní elektrody. Porovnání účinnosti fosforylace pomocí solubilní a imobilizované PKA.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

**Prohlašuji:**

Práci s názvem Detekce enzymové aktivity proteinkináz imobilizovaných na magnetických částicích 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

.....  
Bc. Michaela Šislerová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Zde bych moc ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a vstřícnost jak při experimentální části v laboratoři, tak při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. a Mgr. Rudolfu Kupčickovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady. Vděčnost a poděkování také patří mým nejbližším, kteří mi byli oporou po celou dobu magisterského studia.

## **ANOTACE**

Cílem diplomové práce bylo zavést metodu elektrochemického stanovení aktivity enzymu proteinkinázy A, a to solubilní a imobilizované na magnetických částicích. Stanovení bylo založeno na square-wave voltametrické analýze nanočástic koloidního zlata (AuNPs), které byly použity jako elektroaktivní částice selektivně navázané na fosforylovaný substrát. Solubilní i imobilizovaná forma proteinkinázy A byla použita k *in vitro* fosforylaci Kemptide a biotin-Kemptide. Účinnost fosforylace byla ověřena také pomocí metody MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

proteinkináza, fosforylace, elektrochemická detekce, enzymová aktivita, zlaté nanočástice

## **TITLE**

Detection of enzyme activity of kinases immobilized on magnetic particles

## **ANNOTATION**

The aim of the thesis was to implement a method of electrochemical determination of enzyme activity of proteinkinase A, namely soluble form and immobilized form on magnetic particles. The determination was based on square-wave voltammetric analysis of colloidal gold nanoparticles (AuNPs), which were used as electroactive particles selectively bound to a phosphorylated substrate. Both forms of proteinkinase A were used for *in vitro* phosphorylation of Kemptide and biotin-Kemptide. The phosphorylation efficiency was also verified by MALDI-Orbitrap mass spectrometry.

## **KEYWORDS**

proteinkinase, phosphorylation, electrochemical detection, enzyme activity, gold nanoparticles

# OBSAH

OBSAH .....	7
Seznam obrázků .....	9
Seznam grafů .....	10
Seznam tabulek .....	10
Seznam rovnic .....	10
Seznam zkratk .....	11
ÚVOD .....	15
1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	16
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	17
2.1 Fosforylace a defosforylace proteinů .....	17
2.2 Proteinkinázy .....	18
2.2.1 Serin/threoninové kinázy .....	18
2.2.2 Tyrosin kinázy (TK).....	24
2.3 Možnosti stanovení enzymové aktivity proteinkináz.....	27
2.3.1 Radiometrické stanovení .....	28
2.3.2 Fluorescenční stanovení .....	28
2.3.3 Elektrochemiluminiscenční stanovení.....	30
2.3.4 Hmotnostní spektrometrie .....	32
2.3.5 Imunochemické stanovení.....	34
2.3.6 Elektrochemické stanovení .....	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
3.1 Přístroje a pomůcky.....	45
3.2 Imobilizace proteinkinázy A na magnetický nosič .....	47
3.3 Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A.....	48
3.3.1 Fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A v čase .....	48
3.3.2 Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetický nosič .....	48
3.3.3 Kalibrační závislost solubilní proteinkinázy A .....	49
3.4 Detekce fosforylovaného substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie .....	49
3.4.1 Odsolení vzorků na mikrokolónkách plněných POROS OLIGO™ R3 reverzní fází....	49
3.4.2 Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií .....	50
3.5 Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu .....	51
3.5.1 Podmínky elektrochemické detekce.....	51
3.5.2 Výběr elektrod a detekčních zlatých nanočástic .....	51
3.5.3 Izolace fosforylovaného substrátu na streptavidinem modifikovaných elektrodách .....	53

3.5.4	Izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem .....	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	55
4.1	Ověření fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A pomocí hmotnostní spektrometrie.....	55
4.2	Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice .....	59
4.2.1	Vytipování vhodných magnetických částic pro imobilizaci proteinkinázy A.....	60
4.3	Stanovení aktivity proteinkinázy A elektrochemicky square-wave voltametrií.....	61
4.3.1	Výběr vhodných elektroaktivních nanočástic .....	61
4.4	Detekce aktivity imobilizované proteinkinázy A pomocí fosforylovaného peptidového substrátu .....	65
4.4.1	Detekce aktivity proteinkinázy A na tištěných elektrodách s pracovní uhlíkovou elektrodou modifikovanou streptavidinem.....	65
4.4.2	Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu s izolací pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem.....	68
4.4.3	Kalibrační závislost solubilní proteinkinázy A pomocí elektrochemické detekce.....	70
4.4.4	Stanovení přesné aktivity imobilizované proteinkinázy A elektrochemicky .....	71
4.4.5	Měření operační stability imobilizované proteinkinázy A .....	72
5	ZÁVĚR .....	76
6	ZDROJE.....	77



## Seznam obrázků

Obr. 1 Doménová organizace proteinkináz C a D, upraveno dle [23] .....	21
Obr. 2 Doménová organizace Src kináz, upraveno dle [1].....	26
Obr. 3 Fosforylační detekce s využitím fluorescenčního vytěšňování, upraveno dle [80] .....	29
Obr. 4 Fluorescenční detekce s využitím Cu NC jako fluorescenční sondy, upraveno dle [82].....	30
Obr. 5 Elektrochemiluminiscenční detekce aktivity PKA s využitím amplifikace signálu R-PSiNP [65] .....	32
Obr. 6 Detekce aktivity PK pomocí hmotností spektrometrie, upraveno dle [93] .....	33
Obr. 7 Schéma měření biosenzoru, upraveno dle [99].....	35
Obr. 8 Tříelektrodový systém, upraveno dle [99] .....	37
Obr. 9 Detekce PKA s využitím Phos-tag, upraveno dle [69].....	38
Obr. 10 Detekce pomocí fotoelektrochemie, upraveno dle [110] .....	39
Obr. 11 Detekce pomocí depozice redoxních sraženin, upraveno dle [62].....	40
Obr. 12 Detekce s využitím $Zr^{4+}$ a hybridizační řetězové reakce pro amplifikaci signálu, upraveno dle [118] .....	43
Obr. 13 Detekce s využitím Au nanočástic, upraveno dle [122].....	44
Obr. 14 Hmotnostní spektra substrátu Kemptide (K) fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP .....	56
Obr. 15 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP-S .....	57
Obr. 16 Hmotnostní spektra substrátu biotin-Kemptide (BK) fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP.....	57
Obr. 17 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP-S.....	58
Obr. 18 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na OrionHT elektrodách .....	62
Obr. 19 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-c110 elektrodách.....	63
Obr. 20 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách.....	63
Obr. 21 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách s různými způsoby měření.....	64
Obr. 22 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs o velikosti 10 nm na DropSens Metrohm DRP- 110STR elektrodách různých šarží .....	65
Obr. 23 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S .....	66
Obr. 24 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S se zvýšeným množstvím AuNPs .....	67
Obr. 25 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S s izolací pomocí streptavidinem modifikované elektrody nebo magnetických částic modifikovaných streptavidinem.....	68
Obr. 26 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S s izolací na magnetických částicích modifikovaných streptavidinem dvěma způsoby .....	69
Obr. 27 Vybrané SWCSV voltamogramy analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S z kalibrační závislosti .....	71
Obr. 28 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP...72	
Obr. 29 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP 73	
Obr. 30 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S .....	73

Obr. 31 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S .....	74
--	----

## Seznam grafů

Graf 1 Porovnání míry fosforylace K/BK solubilní PKA v prostředí ATP/ATP-S .....	59
Graf 2 Porovnání míry fosforylace K a BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP nebo ATP-S.....	60
Graf 3 Kalibrační závislost solubilní PKA v rozmezí 7 500 - 75 000 U.....	70
Graf 4 Kalibrační závislost solubilní PKA v rozmezí 7 500 - 75 000 U, měření provedeno 3x.....	70
Graf 5 Závislost proudové odezvy fosforylovaného substrátu BK v přítomnosti ATP-S na aktivitě imobilizované PKA.....	74

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Složení reakční směsi pro měření kalibrační závislosti solubilní PKA.....	49
Tabulka 2 Podmínky pretreatmentu square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV) .....	51
Tabulka 3 Podmínky měření SWCSV .....	51
Tabulka 4 Proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na OrionHT elektrodách .....	62
Tabulka 5 Proudová odezva AuNPs různých velikostí měřených na DropSens Metrohm DRP-c110 elektrodách.....	63
Tabulka 6 Proudová odezva AuNPs různých velikostí měřených na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách.....	64
Tabulka 7 Proudové odezvy AuNPs o velikosti 10 nm, měřených na DropSenS Metrohm DRP-110STR elektrodách, s různými postupy měření .....	64

## Seznam rovnic

Rovnice 1 Výpočet míry fosforylace substrátu v [%] v přítomnosti ATP .....	50
Rovnice 2 Výpočet míry fosforylace substrátu v [%] v přítomnosti ATP-S.....	51

## Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AgNPs	stříbrné nanočástice (silver nanoparticles)
AKAP	A-kinázové kotvící proteiny (A-kinase anchoring proteins)
ALP	alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
ATP	adenosintrifosfát
ATP-S	adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio] trifosfát tetralithná sůl (adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio] triphosphate tetralithium salt)
AuNC	zlaté nanoklastry (gold nanoclusters)
AuNPs	zlaté nanočástice (Au nanoparticles)
BMPs	kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic proteins)
C	cystein
CAMK	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní kináza (Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent proteinkinase)
cAMP	3',5'-cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CDK	cyklin-dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
CDK5	cyklin-dependentní kináza 5 (cyclin-dependent kinase 5)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CK2	kasein kináza II
CNT	uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes)
Cu NC	Cu nanoklastry (Cu nanoclusters)
DAPK1	se smrtí spojená proteinkináza II (death associated proteinkinase 1)
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (2,5-dihydroxybenzoic acid)
DNA1	deoxyribonukleová kyselina 1
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (enzyme-linked immunosorbent assay)
FAK	fokální adhezní kináza
Fc	ferrocen

Fc-ATP	adenosin 5'-[ $\gamma$ -ferrocen] trifosfát (adenosine 5'-[ $\gamma$ -ferrocen] triphosphate)
FGFR	receptory fibroblastových růstových faktorů (fibroblast growth factor receptor)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
GDNF	neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk (glial cell line-derived neurotropic factor)
GO	oxid grafenu (graphene oxide)
GPCR	receptory spřažené s G-proteinem (G-protein-coupled-receptors)
GQD	grafenové kvantové tečky (graphene quantum dots)
GSK	kináza glykogensyntázy (glycogen synthase kinase)
HCR	hybridizační řetězová reakce (hybridization chain reaction)
h-DNA	vlásečková DNA (hairpin DNA)
HRP	křenuv peroxidáza (horseradish peroxidase)
IFE	efekt vnitřního filtru (inner-filter effect)
ITO	směsný oxid india a cínu (indium tin oxide)
JAK	Janus kináza (Janus kinase)
JNK	c-Jun N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated proteinkinase)
MB	sondy molekulárního majáku (molecular beacons probes)
MIS	anti-Müllerian hormon (Müllerian inhibiting substance)
MOFs	kovové organické kostry (metal-organic frameworks)
MPBA	4-merkaptofenylboronová kyselina (mercaptophenylboronic acid)
m/z	poměr hmotnosti k náboji (mass-to-charge ratio)
MWNTs	vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes)
nRTK	nereceptorové tyrosin kinázy (non-receptor tyrosine kinase)

p-AuNP	zlaté nanočástice funkcionalizované peptidem (peptide functionalized gold nanoparticles)
PB1 box doména	Phox a Bem1 box doména
PDGFR	receptor pro růstový faktor odvozený z krevních destiček (platelet-derived growth factor receptor)
PDMS	polydimethylsiloxan
p-DNA	fosforylovaná DNA (phosphorylated DNA)
PEC	fotoelektrochemie (photoelectrochemistry)
PEI-CuNCs	nanoklastry mědi chráněné polyethyleniminem (polyethyleneimine protected copper nanoclusters)
PH doména	Plekstrinova homologická doména
Phos-tag	molekula vázající fosfát (phosphate-binding tag molecule)
PK	proteinkináza (proteinkinase)
PKA	proteinkináza A (proteinkinase A)
PKC	proteinkináza C (proteinkinase C)
PKG	proteinkináza G (proteinkinase G)
PMA	forbol myristát acetát
PNE	polynorepinefrin
Prkg	geny kógující proteinkinázu G (PKG coding genes)
PTPase	proteinová tyrosinová fosfatáza (protein tyrosine phosphatase)
QD	kvantové tečky (quantum dots)
RAFT	reverzibilně přidaný fragmentační řetězec (reversible addition-fragmentation chain transfer)
RB	tumor-supresorový retinoblastom
rGO	redukovaný oxid grafenu
R-PsiNP	nanočástice oxidu křemičitého zakončené fosforylátem a zapouzdřené Ru (Ru encapsulated phosphorylate-terminated silica nanoparticles)
RTK	receptorová tyrosinkináza (receptor tyrosine kinase)
SAMDI	samostatně sestavené monovrstvy pro MALDI (self-assembled monolayers for MALDI)

SF2	serin/arginin bohatý sestřihový faktor 1 (serine/arginine-rich splicing factor 1)
SFK	kinázy rodiny Src (kinases of the Src family)
SH2	Src homologie 2
SH3	Src homologie 3
S-peptid	substrátový peptid
SWCSV	square-wave katodická rozpouštěcí voltametrie (square wave cathodic stripping voltammetry)
TGF- $\beta$	transformační růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )
TK	tyrosinkináza (tyrosine kinase)
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
TOF-MS	hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu (time-of-flight mass spectrometry)
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor receptor)

## ÚVOD

Fosforylace a defosforylace jsou využívány v celé *in vivo* signálních drah pro rychlou změnu aktivity proteinu. Jedná se o jednu z nejčastějších posttranslačních modifikací proteinů. Může dojít k ovlivnění vlastností proteinu, subcelulární lokalizace či stability. Vlivem deregulace enzymů zajišťujících fosforylaci, proteinkináz (PK), dochází k nekontrolovaným změnám fosforylace, což může vést až ke zvratu v buňky nádorové. PK jsou děleny do skupin serin/threoninových kináz a tyrosin kináz, a to dle aminokyseliny, na které katalyzují přenos fosfátové skupiny. *In vitro* fosforylace rekombinantních proteinů je využívána pro studium buněčné exprese, pro vakcíny nové generace, pro produkci specifických protilátek a pro diagnostické a terapeutické aplikace. Může být také využívána při přípravě standardních proteinů a peptidů s fyziologickým průběhem fosforylace pro porovnání s patologickými formami.

Z metod, které mohou být využity pro stanovení aktivity, byla dříve využívána zejména radiometrická metoda, ale v dnešní době se od ní upouští z důvodu potřeby radioaktivního adenosintrifosfátu pro stanovení. Nahradily ji zejména metody fluorescenční, fotoluminiscenční, elektrochemiluminiscenční, hmotnostní spektrometrie a také metody elektrochemické. Ty mají výhodu v jednoduchosti, citlivosti a přesnosti. Mezi elektrochemické metody řadíme potenciometrii, amperometrii, konduktometrii a coulometrii. Pro účinné stanovení aktivity PK je třeba rozlišit fosforylovaný produkt od nefosforylovaného substrátu.

Pro elektrochemickou detekci aktivity PK byly využity nanočástice koloidního zlata (AuNPs), které jsou využívány jako elektroaktivní detekční částice. Metoda, která využila AuNPs, byla založena na specifické fosforylační reakci biotinylovaného peptidového substrátu solubilní nebo imobilizovanou proteinkinázou A v přítomnosti adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio] trifosfát tetralithné soli (ATP-S). AuNPs mají schopnost vazby na thiolové skupiny přenesené z ATP-S na fosforylovaný substrát. Vlastní detekce spočívala v detekci Au(III) iontů uvolněných z AuNPs v kyselém prostředí metodou square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie.

# 1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vytvořit rešerši shrnující informace o:

- enzymech podílejících se na fosforylaci proteinů se zaměřením na proteinkinázu A (PKA)
- metodách stanovení enzymové aktivity kináz a fosforylace proteinů
- možnostech stanovení enzymové aktivity PKA elektrochemicky

Cílem experimentální části diplomové práce byla:

- fosforylace substrátů Kemptide a biotin-Kemptide v přítomnosti ATP či ATP-S solubilní PKA v čase a ověření pomocí hmotnostní spektrometrie
- imobilizace PKA na magnetické částice, fosforylace substrátů Kemptide a biotin-Kemptide v přítomnosti ATP či ATP-S imobilizovanou kinázou a ověření pomocí hmotnostní spektrometrie
- práce na zavedení metody elektrochemické detekce pro ověření aktivity PKA



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fosforylace a defosforylace proteinů

Fosforylace a defosforylace mají schopnost významně ovlivnit vlastnosti proteinu, nevyjímaje jeho enzymatickou aktivitu, subcelulární lokalizaci a stabilitu. Pro rychlou změnu aktivity proteinu se využívá reverzibilní fosforylace, která je považována za klíčovou reakci ve spoustě signálních transdukčních drahách, včetně regulace mitochondriálních funkcí. Velké množství kináz a fosfatáz je zaměřeno na mitochondrie, kde mohou ovlivňovat většinu mitochondriálních procesů [1–3].

Při nefyziologických a nekontrolovatelných změnách fosforylace dochází ke změnám biologické regulace signálních drah. Objasnění regulační role ve funkci proteinkináz (PK) je důležitá pro objasnění biologických procesů a patogenezi onemocnění. Nerovnoměrná exprese kináz zapříčiní nerovnováhu v signálních drahách. Dysfunkce PK může vést až ke změnám buněčných funkcí v nádorové buňky. Fosforylace polypeptidového řetězce je tedy životně důležitá pro správnou biochemickou a biologickou povahu a reaktivitu [2, 4, 5].

Vztah mezi fosforylací proteinů a mechanismy buněčné signalizace je klíčový pro pochopení souvislosti mezi změnami fosforylace klíčových proteinů a některých civilizačních chorob. Je potřeba standardních proteinů a peptidů, kde fosforylace proběhla správně, pro porovnání s patologickými formami (např. hyperfosforylovaný tau protein jako příčina neurodegenerace). Dysregulace kinázy či aktivita fosfatázy ovlivněná mutací, je důležitý faktor u dalších onemocnění. Rekombinantní fosfoproteiny jsou vhodné pro studium buněčné regulace, jsou používány jako hlavní složka vakcín nové generace [6, 7] a pro produkci specifických monoklonálních protilátek [8]. Produkce fosforylovaných rekombinantních peptidů a proteinů je využita pro diagnostické a terapeutické aplikace [4, 9]. U lidských malignit, způsobených deregulací kináz, zastupují kinázy 20 % předpokládaných cílů léčiv. Z toho důvodu je důležité porozumět principům regulace aktivity kináz a jejich substrátové specifitě [5].

Fosforylace proteinu je zprostředkována kovalentní vazbou fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu aminokyselin (serin, threonin, tyrosin, příležitostně hydroxyl-prolin). Defosforylace je naopak odstranění fosfátové skupiny z proteinů. Pokud dochází k tzv. aberantní fosforylaci, bylo prokázáno spojení s nemocemi, jako je rakovina [10], zánětlivé onemocnění, cukrovka [11] a neurodegenerativní onemocnění [12] (např. Alzheimerova choroba) [2, 13–16].

Fosforylační reakci *in vitro* lze modulovat použitím různých kináz s různou aktivitou, specifitou a stabilitou [9].

## 2.2 Proteinkinázy

Enzymy, které katalyzují fosforylaci buněčných substrátů, se nazývají proteinkinázy. Jedná se o všude přítomné enzymy, které přenášejí fosfátovou skupinu z adenosintrifosfátu (ATP) na proteinový substrát, čímž dojde k jejich fosforylaci. Ta u proteinů mění jejich funkce [13].

Fyziologické funkce proteinů jsou regulovány reverzibilní fosforylací zahrnující účast PK a fosfoproteinových fosfatáz. Pokud dojde k patologickým procesům, jsou PK deregulovány. To zapříčiní deregulaci fosforylace, která má za následek nekontrolovatelné dělení buněk, inhibici apoptózy a další abnormality [13, 14, 17].

Aktivita PK je regulována podjednotkami, doménami, druhými posly a fosforylací [18]. Fosforylace PK přímo koreluje s regulací katalytických mechanismů. Pro zvýšení katalytické aktivity PK je nezbytná zejména fosforylace aktivačních smyček. Neméně důležitá pro aktivitu je i fosforylace katalytických domén, regulačních podjednotek a regulačních domén. Pro objasnění jejich aktivity je vhodné studium procesu fosforylace [2].

Kompletní sada PK je nazývána kinom. Jedná se o dynamický systém, reagující na vnitřní a vnější podněty. Každá aktivní PK regulovaným způsobem fosforyluje rozdílný soubor substrátů. Pochopení složité signalizační sítě, která je založena na fosforylaci, je nutné pro pochopení fungování buňky ve fyziologických a patologických stavech s využitím v terapii [19, 20].

### 2.2.1 Serin/threoninové kinázy

Velká proteinová rodina serin/threoninových kináz zahrnuje více než 500 enzymů. Katalyzují fosforylaci na hydroxylové skupině serinu nebo threoninu, které jsou zabudovány ve specifické aminokyselinové sekvenci, kterou rozpoznává každá kináza [19, 21].

Do této rodiny patří např. proteinkináza A (PKA), proteinkináza C (PKC), proteinkináza D (PKD), proteinkináza G (PKG), kasein kináza II (CK2), pim-1 kináza, cyklin-dependentní kinázy (CDK), s buněčnou smrtí spojená proteinkináza 1 (DAPK1), kinázy závislé na  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulin (CAMK), kinázy aktivované mitogenem (MAPK), kinázy glykogen syntázy (GSK) a mnoho dalších [17, 21, 22].

PKC a PKD spolu patří do nadrodiny kináz závislých na  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulinu. Jedná se o evolučně neměnné kinázy, které jsou aktivovány velkým množstvím extracelulárních podnětů. Mohou to být hormony, růstové faktory a agonisté receptoru spřaženého s G-proteinem. Signální kaskáda vyvolaná těmito PK reguluje buněčné a fyziologické procesy a účastní se také

tumorigeneze, včetně buněčné proliferace, migrace, invaze a angiogeneze. Pozitivně regulují některé lidské malignity, jako je karcinom prsu, prostaty a vaječnicků [23].

Druhým typem serin/threoninových kináz jsou kinázy, které fosforylují receptorové molekuly (receptorové proteinové serinové/threoninové kinázy). Patří sem například kináza aktivující receptor a nadrodina transformačního růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Do TGF- $\beta$  nadrodiny patří TGF- $\beta$  podrodina, aktivin/inhibin podrodina, kostní morfogenetické proteiny (BMPs), anti-Müllerian hormon (MIS) a neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk (GDNF) [21, 24].

### **Proteinkináza A (PKA)**

PKA, spolu s jejím transkripčním faktorem CRE-vazebným proteinem, zprostředkovává biologické účinky cirkulujících hormonů, kam patří glukagon (důležitý pro regulaci metabolismu glukózy, především stimulací transkripční aktivity glukóza-6-fosfatázy) a geny fosfoenolpyruvátcarboxykinázy, jejichž kódované proteiny působí jako enzymy, které omezují rychlost pro glykolýzu a/nebo glukoneogenezi. Dále se účastní procesů v intracelulárních signalizačních dráhách, včetně metabolismu, genové expresi a buněčné proliferaci [21, 25–28].

PKA prostřednictvím  $\gamma$ -fosfátu ATP tvoří fosfátové monoestery, pomocí proteinových alkoholových skupin (nacházejících na serinu a threoninu), jako akceptory fosfátů. PKA je heterotetramerní holoenzym, který se skládá z dimeru regulační podjednotky, který se váže na dvě katalytické podjednotky v inaktivovaném stavu. Pro katalytickou podjednotku existují tři izoformy:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a pro regulační podjednotku čtyři izoformy: I $\alpha$ , I $\beta$ , II $\alpha$ , II $\beta$ . Regulační podjednotky typu I $\alpha$  a I $\beta$  se nachází v rozpustné frakci. Isoformy II $\alpha$  a II $\beta$  se vyskytují ve frakcích cytoskeletu a organel. Vnitřní neuspořádané oblasti zahrnují linkery, které lemují sekvenci inhibitoru v regulační podjednotce a spojují velmi stabilní dimerizační doménu, a dobře poskládané cyklické nukleotidové vazebné domény [25, 29–31].

Hlavním intracelulárním efektozem druhého posla, cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), je PKA. K aktivaci PKA dochází při zvýšené intracelulární koncentraci cAMP, která vede k disociaci holoenzymu a uvolnění volné aktivní katalytické podjednotky. Aktivní katalytická podjednotka fosforyluje proteinové substráty, které obsahují konsenzuální fosforylační motivy [25].

Expresí genů ve správnou chvíli na správném místě, neboli časoprostorová regulace, je řízena pomocnými proteiny, např. A-kinázové kotvicí proteiny (AKAP), které interakcí s regulačními podjednotkami lokalizují katalytickou podjednotku blízko substrátu. Substrátem

pro PKA je např. SREBP serin 331/332 v lipidových buňkách v ledvinách a dalších tkáních či serin/arginin bohatý sestříhový faktor 1 (SF2) [4, 29, 30].

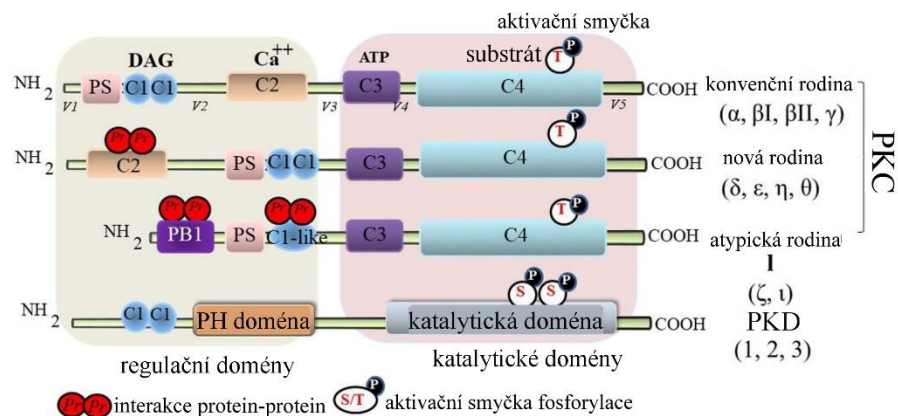
### **Proteinkináza C (PKC)**

PKC katalyzuje fosforylaci hydroxylových skupin serinových a threoninových zbytků na buněčných proteinech. Ta hraje důležitou roli v signálních transdukčních drahách, zejména buněčném růstu, genové expresi a imunitní odpovědi [17, 23].

PKC lze aktivovat diacylglycerolem, fosfatidylserinem a dalšími forbolovými estery, jako je forbol myristát acetát (PMA) v  $\text{Ca}^{2+}$  závislých způsobech aktivace [23, 32, 33].

Existuje několik izoform PKC, které byly identifikovány na základě sekvenční homologie, požadavku kofaktorů a substrátové specifity. Dle substrátové homologie a biochemických vlastností se savčí PKC skládají z 10 členů, které jsou dále rozřazeny do 3 podrodin. Konvenční rodina PKC (cPKC) zahrnuje  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\beta\text{I}$ ,  $\text{PKC}\beta\text{II}$  a  $\text{PKC}\gamma$ . Do nových PKC (nPKCS) patří  $\text{PKC}\delta$ ,  $\text{PKC}\epsilon$ ,  $\text{PKC}\eta$  a  $\text{PKC}\theta$ . K atypickým PKC (aPKC) se řadí  $\text{PKC}\zeta$  a  $\text{PKC}\iota$ . Podrodiny cPKC a nPKC lze aktivovat pomocí esterů diacylglycerolu, fosfatidylserinu a forbolu. cPKC vyžadují pro aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$ , zatímco nPKC a aPKC jsou na  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislé. aPKC pro aktivaci nevyžaduje ani estery DAG nebo forbol [23, 33].

Ve své struktuře obsahuje PKC několik regulačních domén (viz. Obr. 1), jako je PS doména (vazba na pseudo-substrát), PB1, C1 domény, které jsou bohaté na cystein a mohou se vázat na diacylglycerol, C2 a C3 domény, které se mohou navázat na  $\text{Ca}^{2+}$  a ATP, případně C-koncovou katalytickou doménu. C-koncová katalytická doména je zodpovědná za rozpoznávání substrátu a funkční regulaci. Na fosforylovaných katalytických doménách se nacházejí serinové nebo threoninové zbytky, které kinázu aktivují. N-terminální doména izoform PKC spolu s regulační doménou C-terminální kinázy je spojena pomocí přizpůsobivého pantového segmentu. Regulační doména C1, kterou obsahují cPKC a nPKC, je tvořena dvěma opakováními Zn-finger domén a je zodpovědná za navázání forbolesterů podporujících nádor, jako je například PMA [23].



Obr. 1 Doménová organizace proteinkináz C a D, upraveno dle [23]

Diacylglycerol soutěží s PMA o vazebné místo na C1 doméně. Kromě C1 domény, obsahují cPKC také C2 doménu, která kinázám pomáhá vázat  $\text{Ca}^{2+}$ . Tandemové repetice domény C1 a varianty domény C2 tvoří nPKC. Kvůli této variantě je nPKC nezávislé na  $\text{Ca}^{2+}$  po navázání diacylglycerolu. Varianta C1 domény a protein-protein interagující PB1 box doména (Phox a Bem1) tvoří aPKC. Z tohoto důvodu vážou ceramidy, ale ne  $\text{Ca}^{2+}$ , diacylglycerol nebo PMA. Navíc PB1 doména umožňuje PKC interagovat s jinými proteiny, které také obsahují PB1 (p62, PAR, MAPK) [23].

Doména V3 se nachází mezi regulační a katalytickou doménou a při aktivaci a konformační změně PKC je proteolyticky štěpena. Doména V3 tedy může regulovat intramolekulární interakci mezi N- a C-koncovými doménami a funkci PKC. Předpokládá se, že doména V5, kterou tvoří 50 aminokyselin, a je umístěna na C-koncové doméně, je důležitá pro regulaci fosforylace a funkce PKC [23].

### Proteinkináza D (PKD)

PKD se skládá ze tří izoform - PKD1, PKD2 a PKD3, které vykazují vysokou sekvenční identitu. PKD je nezbytná pro zvířata a lidi, neboť řídí celou řadu různých buněčných funkcí. Účastní se základních procesů, ke kterým patří vezikulární transport v trans-Golgiho síti a mitogeneze. Podílí se i na specializovanějších procesech, jako je sekrece inzulínu v  $\beta$ -buňkách pankreatu nebo aktivace inflamazómu v makrofázích [22, 23, 34].

PKD je složena ze dvou N-koncových domén C1, Plekstrinovy homologické (PH) domény a C-koncové katalytické domény kinázy, která patří do CAMK. Diacylglycerol, lipidový druhý posel, přísně řídí signalizaci PKD. Diacylglycerol je produkován v buňkách fosfolipázou C za přítomnosti receptorů spřažených s G-proteinem (GPCR) nebo pomocí signalizací receptoru tyrosin kinázy. Diacylglycerol rekrutuje PKD pomocí svých dvou domén C1 na specifické

membráně, která se nachází v buňce a je podobná plazmatické membráně. Kromě náboru na membrány aktivuje diacylglycerol PKD také přímo [22, 23].

V přítomnosti diacylglycerolu či forbolesterů podobných diacylglycerolu, má imunoprecipitovaná PKD *in vitro* vyšší katalytickou aktivitu. Odstraněním regulačních C1 domén dojde k vytvoření kinázy necitlivé na stimulace diacylglycerolem či forbolesterem. Dochází ale ke zvýšení bazální aktivity. Odstranění PH domény také vede ke zvýšení katalytické aktivity PKD. Domény C1 a PH udržují PKD v autoinhibovaném stavu, který je aktivován vazbou domén C1 na membrány, které obsahují diacylglycerol [22].

Fosforylace dvou serinových zbytků - Ser738 a Ser742 v lidské PKD1, která probíhá v aktivační smyčce kinázové domény, je druhou podmínkou pro aktivaci PKD [22].

Mutace v PKD jsou spojeny s různými druhy karcinomu (např. karcinom prsu a kolorektální karcinom) a rakoviny (např. rakovina prostaty, rakovina slinivky břišní, rakovina žaludku [35]). Dysregulace PKD je spojena se srdeční hypertrofií a onkogenem indukovanou senescencí. Regulační mechanismy zatím nebyly kompletně popsány, hlavně z důvodu nedostatku strukturních informací pro tento enzym [22, 34].

### **Proteinkináza G (PKG)**

PKG hraje důležitou roli v regulaci kontraktility hladkých buněk cév. K aktivaci PKG dochází při zvýšené syntéze cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z důvodu aktivace rozpustné guanylyl cyklázy oxidem dusnatým. Aktivace PKG vede ke snížení hladin intracelulárního volného  $Ca^{2+}$  a snížení senzitivity kontraktálního aparátu na  $Ca^{2+}$ . Tyto mechanismy vedou k vasorelaxaci [36, 37].

Geny kódující PKG (Prkg) geny kódují dvě izoformy - PKG-I a PKG-II. Převládá forma PKG-I exprimovaná v kardiovaskulárním systému, s vyšším výskytem v buňkách hladkého svalstva a nižším výskytem v endoteliálních buňkách. Je složena ze tří funkčních domén: N-terminální domény, regulační domény a katalytické domény. Regulační doména obsahuje dvě vazebná místa pro cGMP s vysokou a nízkou afinitou. Katalytická doména obsahuje kapsy vázající Mg-ATP a peptid. Při navázání cGMP na regulační doménu dojde odblokování katalytického centra N-koncovým autoinhibičním/pseudosubstrátovým místem. Tím je umožněna fosforylace zbytků serinu/threoninu v cílových proteinech [36].

### **Kasein kináza II (CK2)**

CK2 je heterotetramerní enzym, který se skládá ze 2 podjednotek ( $\alpha$  a/nebo  $\alpha'$ ) a dimeru regulační podjednotky ( $\beta$ ). Hlavní funkcí regulačních podjednotek je stabilizace holoenzymu a

regulace selektivity k substrátu. I když chybí regulační podjednotky ( $\beta$ ), katalytické podjednotky ( $\alpha$ ) jsou aktivní [15, 17, 38].

Jedná se o všudypřítomnou, pleiotropní, vysoce konzervovanou a konstitutivně aktivní serin/threonin kinázu, která fosforyluje více než 300 substrátů. CK2 je zapojena téměř do všech buněčných dějů, jako je genová exprese, transkripce, syntéza a degradace proteinů, progresse buněčného cyklu, apoptóza, proces buněčné diferenciaci a účastní se i několika onkogenních signálních drah. Nadměrná exprese CK2 může souviset s řadou onkologických onemocnění (karcinom prsu, plic, prostaty, kolorektální, renální a hematologické malignity) [15, 17, 39, 40, 41, 42].

### **Pim-1 kináza**

Rodina Pim kináz obsahuje Pim-1 kinázu, Pim-2 kinázu a Pim-3 kinázu. Pim-1 kináza je kódovaná Pim-1 z rodiny protoonkogenů, která obsahuje alespoň 3 pim geny. Reguluje několik signálních cest, které mají přímou souvislost s vývojem mnoha malignit. Pim-1 má klíčovou roli v přežití, proliferaci a diferenciaci buněk. Pim-1 kináza se nachází hlavně v brzlíku, varlatech a v buňkách hematopoetického systému. Při terapii rakoviny se využívá farmakologické inhibice Pim-1 kinázy [17, 43].

### **Cyklin dependentní kinázy (CDK)**

K tvorbě heterodimerních komplexů s regulačními podjednotkami dochází aktivací neaktivních apoenzymů CDK. Heterodimerní komplexy jsou kromě toho aktivovány fosforylací zbytku serin/threonin v aktivační smyčce (T-smyčce). Naopak defosforylací threoninového a tyrosinového zbytku dochází k negativní regulaci aktivity CDK. Negativně je regulace ovlivňována také tvorbou komplexů s inhibitory CDK. K inhibitorům patří intracelulární inhibitory CDK (CDKI), inhibitory CDK4 (INK4), inhibitory CDK2 (Cip/Kip) a inhibitory CDK1 (Wee1/Myt1) [17, 44].

CDK mají zásadní roli v buněčném cyklu. Dělení buněk, které probíhá v M fázi, je přísně kontrolováno aktivitou CDK. Cyklin D je indukován na začátku G1 fáze a tvoří komplexy s CDK4/6. Prostřednictvím těchto komplexů dojde k indukci fosforylace proteinu tumor-supresorového retinoblastomu (RB). Fosforylovaný RB se naváže na E2F-DP (transkripční faktory) a vyvolá expresi genu pro cyklin E. Cyklin E tvoří komplex s CDK2 a tento aktivovaný komplex dále zajišťuje fosforylací RB. Důsledkem toho je úplné uvolnění komplexu E2F-DP k transkripci genů, které jsou třeba pro přechod z G1 fáze do fáze S. V S fázi je tvořen komplex CDK2 s cyklinem A a je dokončena replikace DNA. Mezi S a G2 fází je vytvořen CDK1

komplex s cyklinem A a později s cyklinem B, který zahájí přechod z G2 do M fáze a následně dochází k mitóze buněk [17].

Zesílená signalizace CDK se vyskytuje často u rakovinových buněk, kdy jsou narušeny regulátory buněčného cyklu (zejména CDKI). To vede ke zvýšení rychlosti buněčného cyklu, buněčné proliferaci a genomické a chromozomální nestabilitě [44].

Cyklin dependentní kináza 5 (CDK5) nevykazuje regulační aktivitu buněčného cyklu. Jeho hlavní role je ve vývoji embryonálního mozku, přežití neuronů, prodloužení neuritů a axonálním transportu, a to z důvodu exprese CDK5 a jeho aktivátorů p35/p25 v neuronálních buňkách. CDK5 hraje klíčovou roli v patogenezi neurodegenerativních poruch (Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza a Alzheimerova choroba [45]). Regulační účinky na glukokortikoidní receptor jsou součástí stresové reakce mozku a patofyziologií poruch nálady [21].

### **Mitogenem aktivované kinázy (MAPK)**

Jedná se o skupinu kináz, která spojuje extracelulární podněty s intracelulární odpovědí. MAPK se podílí na regulaci buněčné proliferace, migrace, apoptózy a imunitní aktivity. Zahrnují kinázy 1 a 2, které podléhají regulaci extracelulárním signálem (ERK1/2), c-Jun N-terminální kinázu (JNK) a rodinu p38. Aktivace probíhá prostřednictvím třívrstevných kinázových signálních kaskád [46, 47].

### **2.2.2 Tyrosin kinázy (TK)**

Jedná se o enzymy, jejichž úlohou je kovalentní modifikace hydroxylové skupiny tyrosinových zbytků prostřednictvím transportu  $\gamma$ -fosfátu z ATP na proteinové substráty. Tyrosinový fosfoproteom je tvořen všemi proteiny v živé buňce, které jsou stabilně nebo přechodně fosforylovány na tyrosinových zbytcích. Důležitou rolí je reverzibilní fosforylace tyrosinu působením specializovaných enzymů, kináz a fosfatáz v eukaryotické signalizaci, vývoji, proliferaci a kontrole růstu [48–50].

Abnormální aktivita TK, ke které dochází vlivem mutace, nadměrné exprese nebo autokrinní-parakrinní stimulace, byla prokázána jako hlavní příčina vzniku různých typů rakovin a dalších onemocnění. S onkologií souvisí zejména dysregulace TK, především u chronické myeloidní leukémie, gastrointestinálních stromálních nádorů, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu a karcinomu renálních buněk [51]. Z toho důvodu jsou tyto kinázy studovány v souvislosti s jejich potenciálním využitím jako terapeutika, kdy jsou hledány sloučeniny, které mohou způsobovat inhibici kinázové aktivity TK. Tyto sloučeniny jsou poté potenciálními terapeutiky pro léčbu nádorů [52].



Posttranslační modifikace v podobě fosforylace tyrosinu je, v porovnání s fosforylací serinu nebo threoninu, nejméně častou modifikací. Fosfotyrosin tvoří pouze 0,05 % z celého obsahu buněčných fosfoaminokyselin [48].

TK proteiny tvoří dvě hlavní kinázy-nereceptorové tyrosin kinázy (nRTK) a receptorové tyrosin kinázy (RTK) [52].

### **Nereceptorové tyrosin kinázy**

NRTK jsou cytoplazmatické enzymy, kterým chybí extracelulární doména a transmembránová doména. Jsou lokalizovány většinou v cytoplazmě buněk, včetně imunitních buněk. Katalytická doména má strukturu tyrosinového zbytku, který obsahuje specifická vazebná místa pro ATP, kde dochází k aktivaci pomocí fosforylace. Patří sem rodina Src kináz, rodina fokálních adhezních kináz (FAK), rodina Janus kináz (JAK) a další [50, 52].

Kromě své kinázové domény, všech devět rodin NRTK sdílí homologní domény vázající protein Src homologie 2 (SH2) a 3 (SH3). Domény SH2 jsou zodpovědné za vazbu fosfotyrosinů na proteiny, SH3 domény za vazbu na oblasti proteinu bohaté na prolin. Tyto domény hrají důležitou roli v signální transdukcii interakcí s cílovými proteiny a předpokládá se, že mají negativní efekt na aktivitu kináz [50].

NRTK jsou regulátory buněčné signalizace. Účastní se na regulaci vývoje a aktivaci efektorových funkcí B a T buněk. Z toho důvodu bylo mnoho NRTK identifikováno jako onkogeny. NRTK působí i jako regulátory vývoje autoimunitních onemocnění [50].

Proteinové tyrosin fosfatázy (PTP) regulují nRTK. PTP defosforylují proteinové cíle a vyrovnávají aktivitu proteinových kináz. PTP jsou děleny do dvou kategorií dle jejich subcelulární lokalizace - membránové (receptorové) PTP, jako je CD45, nebo cytoplazmatické (ne transmembránové) PTP, jako je lymfoidní tyrosin fosfatáza [50].

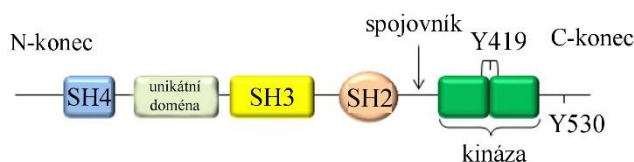
### **Kinázy rodiny Src (SFK)**

Rodinu nereceptorových Src tyrosin kináz tvoří c-Src, Lck, Hck, Bik, Lyn, Fgr, Fyn, Yes a Yrk a kinázy podobné Src, jako jsou Brk, Srm, Frk a Bsk. Fyn spolu s c-Src a Yes jsou exprimovány všemi typy buněk. Zbylé kinázy mají odlišnou expresi. Tyto kinázy se podílí na regulaci velkého množství buněčných procesů nezbytných pro správnou homeostatickou funkci buněk, tkání a orgánů [1, 49].

SFK se podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace, signálních drah zapojených do buněčné adheze, migrace a související remodelace cytoskeletu, oplodnění oocyty a apoptózy s autofagií, které patří k základním mechanismům nutným pro vývoj organismu. SFK mají schopnost přímo či nepřímo modulovat kanály a transportní systému  $Ca^{2+}$  [49, 53].

SFK jsou řízeny pomocí RTK, integrinových receptorů, receptorů spřažených s G-proteinem, receptorů spřažených s antigenem a ferrocenem (Fc), receptorů cytokinů a receptorů steroidních hormonů [1].

SFK mají z N- až C- konce myristoylovou skupinu, která je připojená k SH4 doméně, následuje unikátní doména odlišující jednotlivé SFK, doména SH3 rozpoznávající prolinové motivy, doména SH2 rozpoznávající fosfotyrosin, spojovník mezi SH2 a doménou kinázy, doménu TK a C-koncový regulační segment (viz. Obr. 2). Navázání SFK na membránu se účastní myristylace. Domény SH2 a SH3 pomáhají ve vazbě SFK s jejich substráty a adaptorovými proteiny. Katalytické místo je uloženo na kinázové doméně. Na regulaci aktivity SFK se podílí C-konec [1, 53].



Obr. 2 Doménová organizace Src kináz, upraveno dle [1]

### Receptorové tyrosin kinázy

RTK jsou druhou největší rodinou transmembránových receptorů a jsou děleny do 20 podrodin na základě podobnosti jejich N-koncových extracelulárních domén. Extracelulární domény se liší velikostí a složením jednotlivých subdomén. Tyto odlišnosti umožňují receptorům rozpoznávat strukturně rozdílné ligandy, které poté mají vliv na aktivaci kinázové domény. RTK jsou zapojeny do regulace růstu [54], diferenciaci [55], buněčné motility [56] a metabolismu transdukcí biochemických signálů indukovaných při jejich dimerizaci nebo oligomerizaci v plazmatické membráně [57]. RTK také zprostředkovávají komunikaci mezi buňkou a extracelulárním prostředím, což vede k tkáňovému modelování, organogenezi ve vývoji a k zachování homeostázy [58–61].

N-koncové extracelulární oblasti jsou složeny ze specifických částí strukturních domén a váží aktivační ligandy. Dále RTK obsahují jednu transmembránovou šroubovici a kinázovou doménu, která obsahuje intracelulární oblast. Ke stimulaci aktivity kinázy dochází po křížové fosforylaci, která je zprostředkována kinázovými doménami v ligandem vázaných dimerech a oligomerech RTK. Tyto procesy vedou k další autofosforylaci tyrosinů v intracelulární oblasti a k fosforylaci na cytoplazmatických substrátech, což vede k aktivaci signálních kaskád, které řídí chování buněk. Z toho důvodu se RTK podílejí na rozvoji řady vývojových poruch a rakovin [58, 61].

RTK tedy nejsou jen transmembránové receptory s extracelulárními doménami, ale i intracelulární enzymy, které mají aktivitu TK [52].

Do RTK patří receptory fibroblastových růstových faktorů (FGFR), receptory TRK, inzulinové receptory, receptory růstových faktorů odvozených z krevních destiček (PDGFR), receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), receptory RET a receptory EPH [52, 58, 61].

### **2.3 Možnosti stanovení enzymové aktivity proteinkináz**

Metody stanovení enzymové aktivity PK jsou založeny na monitorování reakce specifickým substrátem. Po skončení inkubace je monitorován úbytek substrátu či přírůstek produktu [62].

Dříve byla obecně využívána radiometrická metoda s radioaktivním ATP, pro detekci aktivity PK. Touto metodou bylo možno selektivně detegovat aktivitu PK, ale je škodlivá pro lidské zdraví z důvodu použití radioaktivního činidla. Z dalších metod jsou využívány metody fluorescenční [63], fotoluminiscenční [64], elektrochemiluminiscenční [65], Ramanova spektroskopie [66], hmotností spektrometrie [67] nebo rezonanční rozptyl světla [68]. Techniky mají ale hned několik nevýhod, ke kterým patří potřeba komplikovaných a drahých nástrojů, časově náročné a zdlouhavé zpracování vzorku a složité pracovní postupy [62, 69–71].

U metod chemiluminiscence, rezonančního rozptylu světla, fluorescence, hmotnostní spektrometrie a elektrochemie je obvykle nutné před vlastní analýzou zakoncentrování vzorku kvůli nízkému výskytu fosfopeptidů. Například extracelulární PKA je v lidském séru přítomna v rozmezí 0-10,6 mU/ml. Pro účinný způsob stanovení aktivity PK je třeba rozlišit fosforylovaný produkt od nefosforylovaného substrátu pomocí hmotností spektrometrie či kapilární elektroforézy. Kapilární elektroforéza a mikročipová elektroforéza se mohou využít i ke stanovení kinázové aktivity nebo inhibitorů [72, 73].

Metoda stanovení aktivity pomocí elektrochemické detekce je jednoduchá, citlivá a cenově přijatelná technika pro stanovení aktivity PK ve srovnání s dříve uvedenými metodami [62, 69–71, 74, 75].

Pro detekci aktivity PK je potřeba specifický rozpoznávací prvek pro fosfátovou skupinu generovaný z fosforylační reakce katalyzované PK. Pro tyto účely je využívána fosfo-specifická protilátka, použití specifické interakce mezi fosfátovými skupinami a  $Zr^{4+}$  nebo  $TiO_2$ , deriváty ATP (například  $\gamma$ -biotin-ATP), tyrosin či adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio] trifosfát tetralithná sůl (ATP-S). Studie z roku 2015 využila komplex dvoujaderného kovu, který působí jako molekula vázající fosfát (Phos-tag) [69, 70, 74].

Fosfátová skupina může být výše uvedenými způsoby účinně rozpoznána a zachycena, přesto je třeba řešit nějaké negativní faktory. Protilátka, jako biologické činidlo, je drahá. Vazba  $Zr^{4+}$  a  $TiO_2$  je na fosfátovou skupinu, ale může se navázat i na karboxylovou skupinu, která může interferovat. Příprava derivátů ATP je obtížná, méně nákladná a časově náročná [74].

### 2.3.1 Radiometrické stanovení

Za zlatý standard metod pro stanovení aktivity PK jsou stále považovány radiometrická stanovení. To je díky jejich přímé detekci, vysoké citlivosti ve srovnání s neradiometrickými stanoveními, reprodukovatelnosti, spolehlivosti a velmi nízkým signálům pozadí. Po fosforylaci peptidového substrátu je u neradiometrických metod nízká změna signálu. Pro radiometrické stanovení mohou být použity dlouhé peptidové substráty i celé proteiny. Donedávna byly k detekci fosforylace proteinu PK používány radioaktivní sloučeniny [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP a [ $^{32}P$ ] anorganický fosfát. Množství fosfoproteinu bylo kvantifikováno scintilačním počítáním [76–78].

Radiometrická metoda přímo měří množství radioaktivního fosfátu přeneseného z radioaktivně značeného ATP na molekulu substrátu PK. Appelmans a kol. (2021) vyvinuli biosenzor pro měření aktivity PK. PK byla inkubována se substrátem, nejčastěji peptidem, s preferovanou substrátovou sekvencí pro PK, a radioaktivním ATP, v přítomnosti či nepřítomnosti inhibitoru. Radioaktivní signál na papíře byl přímým odrazem množství fosfátu přeneseného na substrátový peptid [76, 77].

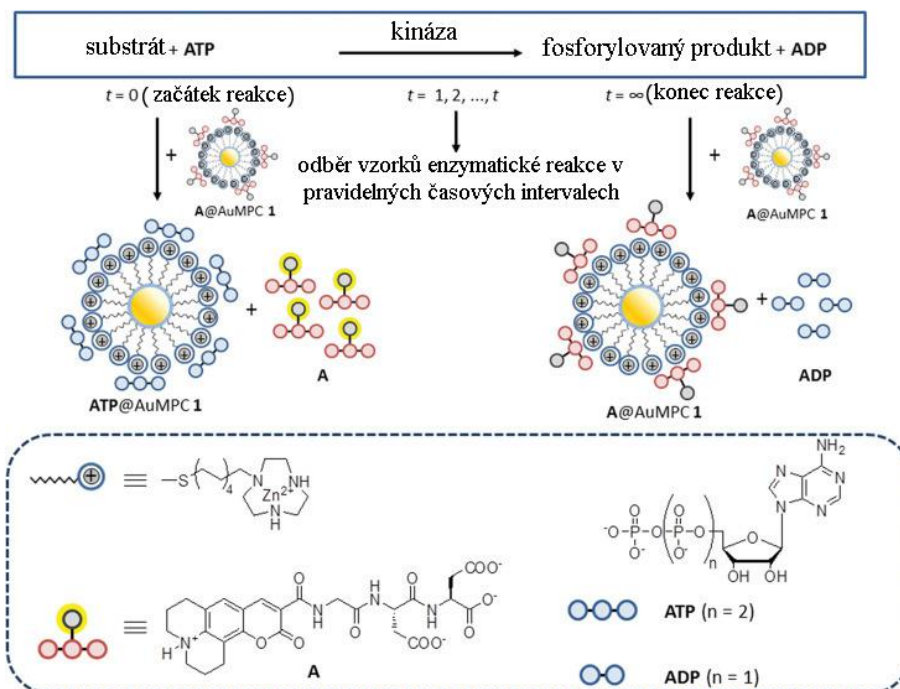
### 2.3.2 Fluorescenční stanovení

Fluorescenční metody stanovení aktivity PK využívají fluorescenčně značený substrát, tedy peptid (S-peptid), který je specifický pro cílovou kinázu. Je pak monitorována změna fluorescence po fosforylaci. Přímé fluorescenční postupy měření intenzity fluorescence vyžadují oddělení fluorescenčně značených fosfopeptidů od nefosforylovaných, což lze provést elektroforeticky či pevnými mikročipy. Proces rozdělení je pracný a časově náročný. Fluorescenční metody detekce aktivity PK mají výhody v homogenním uspořádání, potřebě malého množství vzorku a v jednoduchém ovládní [63, 79].

Metody fluorescenční polarizace překonávají omezení přímé fluorescence. Jsou založeny na specifickém páru fluorescenčního fosfopeptidu s fosfo-specifickou protilátkou či nanočásticemi vázající fosfopeptidy. Metody jsou jednoduché, avšak velmi citlivé na interference a jsou náchylné k tvorbě falešně pozitivních výsledků, neboť mnoho buněčných složek se může navázat na fluorescenční peptidy [63, 79, 80].

Lu a kol. (2014) vyvinuli biosenzor pro stanovení aktivity a inhibice PK. Byly k tomu použity kladně nabitě nanočástice zlata (+AuNPs). Vzorky byly ozářeny při excitační vlnové délce 480 nm a fluorescentní emisní spektra byla detekována od 500 do 700 nm. Fosforylované substráty PK byly detekovány +AuNPs. Fosforylace byla rozpoznána +AuNPs bez použití drahých protilátek nebo vazebných proteinů. Detekční limit pro PKA byl 0.5 mU/μl [79].

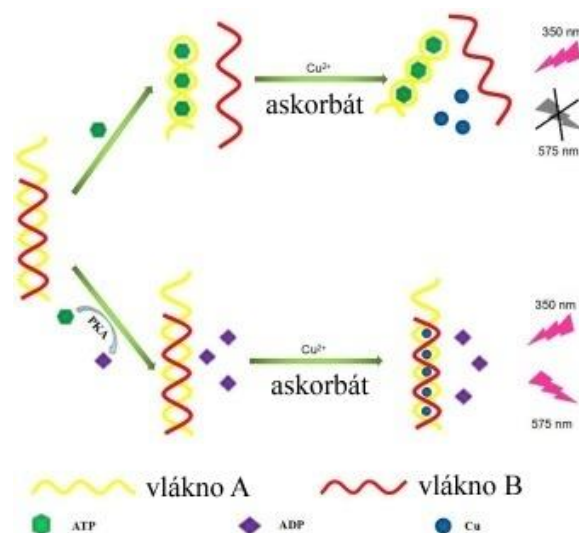
Pezzato a kol. (2015) sestavili biosenzor pro detekci aktivity PK. Biosenzor nevyužíval protilátky, ale snadno dostupné syntetické složky (Obr. 3). Ve vzorcích byl hodnocen poměr ATP:ADP pomocí fluorescenčního vytěšňování, kdy mezi sebou soutěžily záporně nabitě ATP/ADP a sonda A pro vazbu na Au MPC 1·Zn<sup>2+</sup>. Díky detekci reakce ATP → ADP byl vhodný pro detekci aktivity jakékoliv kinázy. Stanovení bylo možno provádět v mikrotitračních destičkách, například pro detekci inhibitorů kináz ve farmaceutických studiích [80].



Obr. 3 Fosforylační detekce s využitím fluorescenčního vytěšňování, upraveno dle [80]

Wang a kol. (2018) sestavili biosenzor pro detekci PKA, který byl založen na fluorescenčním efektu vnitřního filtru (IFE) mezi nanočásticemi zlata funkcionalizovanými peptidem (p-AuNP) a nanoklastry mědi chráněnými polyethyleniminem (PEI-CuNCs). Fluorescenční spektra byla zaznamenává při emisních vlnových délkách 400-700 nm s excitační vlnovou délkou 374 nm. Detekční limit metody byl 0.038 U/ml PKA [81].

Wang a kol. (2017) vyvinuli biosenzor pro detekci aktivity PKA, který využíval Cu nanoklastry (Cu NC) jako jednoduchou, labilní a citlivou fluorescenční sondu. Schéma biosenzoru je na Obr. 4. Bylo dosaženo detekčního limitu 0.041 mU/μl [82].



Obr. 4 Fluorescenční detekce s využitím Cu NC jako fluorescenční sondy, upraveno dle [82]

Huang a kol. (2017) vytvořili novou snímací platformu pro multiplexní detekci PK v roztoku, která byla založena na tvorbě vícebarevných peptidových sond na oxidu grafenu (GO). V metodě byla spojena specifita enzymatické fosforylační reakce se schopností GO zhasět fluorescenci. Peptidové substráty, nesoucí biotinové místo a barvivo, byly fosforylovány v přítomnosti PKA. Barvivo mohlo být použito FITC, Cy3 nebo Cy5. Na peptidy byl navázán GO, modifikovaný streptavidinem, díky vazbě biotin-streptavidin. Fluorescence barviv byla zhasána GO. Detekční limity byly 0.005 U/ml pro PKA, 0.02 U/ml pro Abl a 0.05 U/ml pro Src kinázu [83].

### 2.3.3 Elektrochemiluminiscenční stanovení

Elektrochemiluminiscence spojuje výhody elektrochemických a chemiluminiscenčních metod, kterými jsou vysoká citlivost, vysoká selektivita a všestrannost [65, 84].

K detekci elektrochemiluminiscenčního signálu generovaného elektrochemiluminiscenčním emitorem jsou používány fosfo-specifické protilátky, modifikované zlaté nanočástice (AuNPs) nebo elektrochemiluminiscenční zářič spojený s kovovým iontem [85].

Liang a kol. (2016) vyvinuli biosenzor s využitím grafenových kvantových teček (GQD) a GO pro monitorování aktivity PK a screening inhibitorů PK. Elektroda ze skelného uhlíku byla modifikována peptidem a GQD. Elektrochemiluminiscenční signál byl vytvořen z utlumení GQD úzkým kontaktem s GO. Stupeň zhasení elektrochemiluminiscence koreloval s aktivitou CK2, kdy se zvyšující koncentrací CK2 byl odpovídajícím způsobem snížen katodický elektrochemiluminiscenční signál z GQD. Bylo dosaženo detekčního limitu 0.023 U/ml a s lineárním rozsahem 0.05 až 5 U/ml. [86]

Luo a kol. (2020) sestavili citlivý elektrochemiluminiscenční biosenzor pro monitorování aktivity kináz. Elektroda ze skelného uhlíku byla modifikována silným katodickým emitorem g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a peptidy, které byly navázány prostřednictvím amidové reakce s chitosanem. BSA-zlaté nanoklastry (AuNC) byly použity jako katalyzátory katodové elektrochemiluminiscenční reakce g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a 4,5x zvyšovaly intenzitu elektrochemiluminiscence. Intenzita byla měřena v rozsahu potenciálu -1.5 - 0 V. Intenzita elektrochemiluminiscence byla zvyšována se zvyšující se koncentrací PKA. Detekční limit byl 0.005 U/ml. Citlivé stanovení kinázové aktivity bylo možno měřit v rozsahu od 0.02 do 20 U/ml [87].

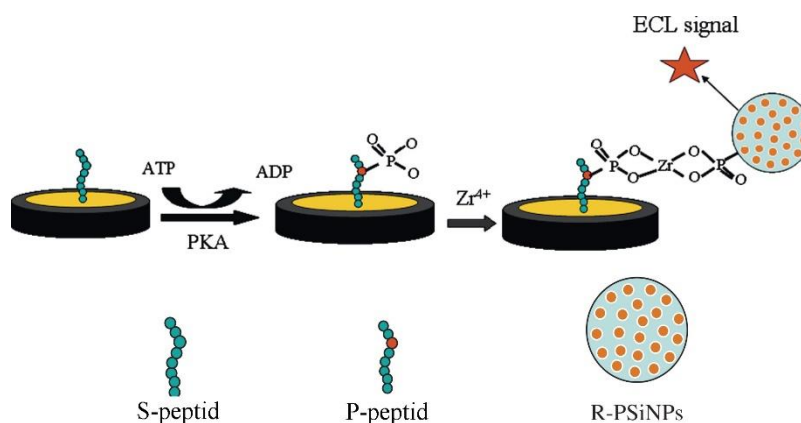
Zhao a kol. (2012) sestavili nový biosenzor pro stanovení aktivity PK a monitorování inhibice, který byl založen na technologii magnetických částic a zesílení signálu AuNPs. Fosforylovaný kemptid byl zachycen magnetickými kuličkami, potaženými streptavidinem. K magnetickým kuličkám byly přidány elektrochemiluminiscenční sondy a roztok iontů Zr<sup>4+</sup>, které dokázaly rychle rozpoznat fosfátové skupiny a propojit dvě biomolekuly obsahující fosfátové skupiny. Prostřednictvím magnetické separace byly odstraněny nenavázané elektrochemiluminiscenční sondy a magnetické kuličky byly resuspendovány v testovacím pufru. Testovací pufr byl vstříknut do elektrochemiluminiscenční reakční cely, kde byly zachyceny komplexy magnetických částic, Zr<sup>4+</sup> a elektrochemiluminiscenční sondy, které byly dočasně imobilizovány na pracovní elektrodě. Na elektrodu bylo aplikováno napětí 1.5 V a byl měřen fotonový signál. Bylo dosaženo detekčního limitu 0.005 U/ml. Vyvinutý biosenzor byl velmi citlivý, jednoduchý, dlouhodobě stabilní, opakovaně použitelný a vhodný pro široký rozsah stanovení. K výhodám patřil i zjednodušený postup, kdy biologická separace magnetických částic je snadná a vazba s ionty Zr<sup>4+</sup> nepotřebuje chemické aktivační kroky [84].

Wang a kol. (2020) sestavili biosenzor pro monitorování CK2 na subcelulární úrovni pomocí bio-bar-code. Nosičem pro elektrochemiluminiscenční signál byla sonda bio-čárového kódu (h-DNA/AuNPs/p-DNA), kdy na AuNPs byla konjugována fosforylovaná DNA (p-DNA) a vlásenková DNA (h-DNA). Rozpoznávací látkou byl specifický peptid. Zlatá ultramikroelektroda byla modifikována specifickým peptidem, který byl fosforylován CK2 v přítomnosti ATP a byla měřena elektrochemiluminiscence. Aktivita CK2 byla detekována v rozsahu 0.005-0.2 U/ml s detekčním limitem 0.001 U/ml. Metoda byla citlivá a selektivní díky dobré senzitivě metody elektrochemiluminiscence, nízkému pozadí zlaté ultramikroelektrody modifikované peptidem, amplifikaci bio-čárového kódu a interkalaci elektrochemiluminiscenčních reagensů do struktury h-DNA [85].

Chen a kol. (2013) vyvinuli velmi citlivý a jednoduchý bezznačkový elektrochemiluminiscenční biosenzor pro stanovení aktivity a inhibice PKA. Biosenzor byl

založen na převodu signálu pomocí  $Zr^{4+}$  a zesílení signálu nanočásticemi oxidu křemičitého (R-PSiNP) zakončených fosforylátem a zapouzdřených Ru(II) [65].

Zlatá elektroda byla modifikována substrátovým peptidem. R-PSiNP byly navázány na povrch zlaté elektrody a generovaly vysoký elektrochemiluminiscenční signál. Jako pracovní elektroda byla použita upravená zlatá elektroda, jako referentní byla použita Ag/AgCl s nasyceným roztokem KCl a platinový drát byl použit jako protielektroda. Intenzita signálu byla úměrná aktivitě PKA. Schéma tohoto elektrochemiluminiscenčního stanovení je zobrazeno na Obr. 5 [65].



Obr. 5 Elektrochemiluminiscenční detekce aktivity PKA s využitím amplifikace signálu R-PSiNP [65]

Detekční limit metody byl 0.005 U/ml a lineární rozsah stanovení pro PKA byl 0.01 U/ml až 1 U/ml. Byla provedena optimalizace podmínek, kdy jako optimální koncentrace R-PSiNP byla zvolena koncentrace 5 mg/ml, 80  $\mu$ M ATP, 0.5 mM  $Zr^{4+}$  a maximální fosforylace bylo dosaženo za 1 hodinu. Vyvinuté stanovení bylo možno brát i jako obecnou platformu pro monitorování aktivit a inhibice jiných PK [65].

### 2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotností spektrometrie je jednou z nejcitlivějších technik, jak detekovat fosfoproteiny nebo fosfopeptidy bez radioizotopového značení. Pro zvýšení citlivosti mohou být fosfoproteiny obohaceny a odděleny od nefosforylovaných proteinů například dvourozměrnou elektroforézou [77, 88].

U všech metod stanovení aktivity PK je nutné zvolení správných podmínek enzymatické reakce pro kompletní fosforylaci kinázou. Po každé kinázové reakci dojde k očekávané změně hmotnosti + 80, čímž se potvrzuje přidání fosfátových skupin ke každému z peptidových substrátů [88].

Hmotnostní spektrometrie je založena na ionizaci molekul vzorku v plynné fázi s následnou separací a detekcí výsledných iontů podle poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Dle způsobu



ionizace a předpokládaného využití mohou být molekuly ionizovaného vzorku účinně fragmentovány za vzniku iontů produktu. Výsledkem je hmotnostní spektrum, ve kterém je graficky znázorněná závislost množství iontů na hodnotě  $m/z$  [89].

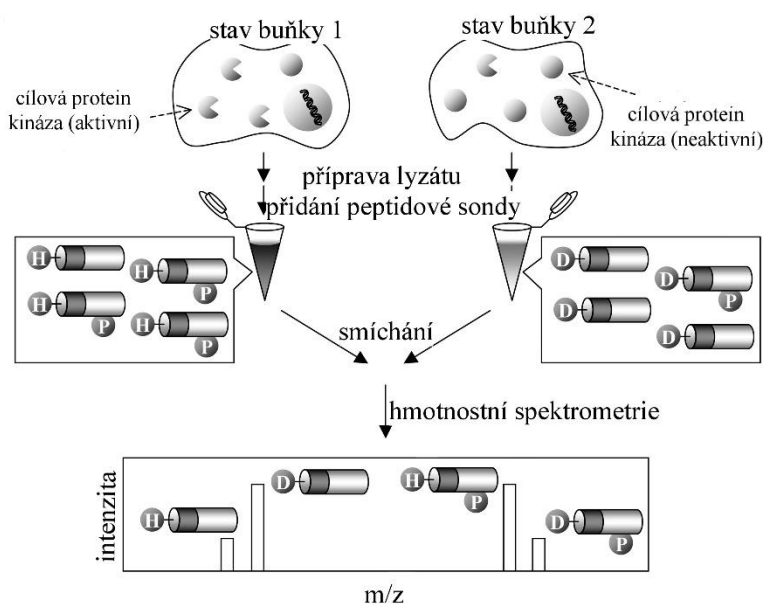
Hmotnostní spektrometr má tři důležité části - ionizátor, analyzátor a detektor. Funkce ionizátoru je produkce iontů v plynném vzorku neidentifikovaného vzorku, funkce analyzátoru je rozlišení charakteristických hmotností složky podle poměru  $m/z$  a funkcí detektoru je identifikace iontů v poměru k jejich relativnímu množství [90].

Z hmotnostního spektra je možno získat informaci o molekulové hmotnosti vzorku a hmotnosti jejich fragmentů, které lze využít pro stanovení struktury molekuly. Na základě výsledku hmotnostního spektra je možná definitivní identifikace vzorku, neboť molekuly za specifických podmínek fragmentují jedinečným způsobem [89].

Charakterizování celé intaktní biomolekuly pomocí hmotnostní spektrometrie bylo velmi přínosné pro pozorování proteinů, peptidů a dalších velkých biomolekul. Je to umožněno díky nástupu ionizačních technik, které mají schopnost přenést velké, polární a termolabilní molekuly z roztoku nebo pevné fáze do plynné jako neporušené molekulární ionty. K těmto ionizačním technikám patří ionizace elektrospřem (ESI) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) [91].

Hmotnostní spektrometrie je extrémně citlivá a specifická analytická technika, která je schopna poskytovat kvalitativní a kvantitativní analytická data o nanomolárních množstvích analytu [92].

Sonoda a kol. (2004) vyvinuli testovací systém pro PK aktivitu pomocí hmotností spektrometrie, jehož schéma je vidět na Obr. 6 [93].



Obr. 6 Detekce aktivity PK pomocí hmotností spektrometrie, upraveno dle [93]

Byly použity peptidové sondy PKA-H6 a PKA-D6, které obsahovaly specifickou sekvenci pro PKA. Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s MALDI a analyzátořem doby letu (TOF MS), kde bylo prokázáno, že u vzorku s vyšší aktivitou PKA byla PKA-D6 více fosforylována než PKA-H6. Testovací systém mohl detekovat desítky peptidových sond současně, pokud každá sonda má rozdílné hmotnostní číslo [93].

Min a kol. (2004) popsali strategii pro rychlé a semikvantitativní vyhodnocení kinázových aktivit. Peptidové čipy byly spojeny s MALDI-TOF MS. Jako substrát byly využity monovrstvy alkanthiolátů na zlatě, které lze použít k měření enzymových aktivit a provádění vysoce výkonných screeningů. Nebyly použity žádné značky pro samostatně sestavené monovrstvy pro MALDI (SAMDI) hmotnostní analýzu, což vedlo ke zjednodušení stanovení aktivity. Peptidový substrát pro c-Src kinázu byl imobilizován na cysteinový konec s maleimidovými skupinami představující samostatně sestavené monovrstvy. Monovrstva byla analyzována pomocí MALDI-TOF MS a hmotnostní spektra byla porovnána před a po fosforylaci [88].

Kinumi a kol. (2005) vyvinuli test pro aktivitu kinázy založený na MALDI-TOF MS s využitím S-peptidu značeného biotinylovou skupinou. S-peptid byl navržen pro kalcium/kalmodulin-dependentní PK II. Kvantitativní vztah mezi fosforylovaným a nefosforylovaným substrátem byl stanoven z poměru ploch píky mezi dvěma píky. Úpravou substrátového peptidu mohlo být stanovení použito pro jakýkoli typ PK. Technika dostala název „Affinity-Tagged Phosphorylation Assay by MALDI-TOF MS“ [94].

### **2.3.5 Imunochemické stanovení**

Enzymovou imunoanalýzu na pevné fázi (ELISA) je možné použít pro měření enzymové aktivity PK. Pro detekci fosforylovaného peptidového substrátu je využíváno fosfo-specifických protilátek [95, 96].

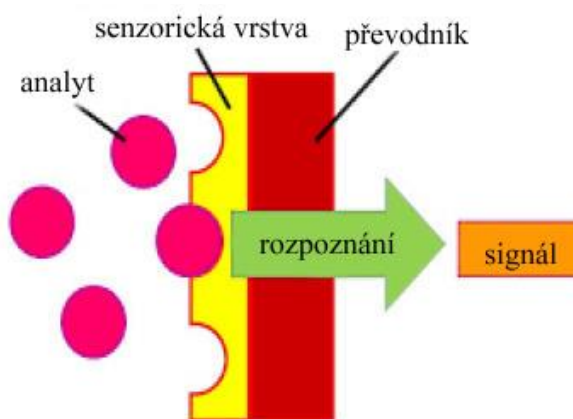
Ferrer a kol. (1998) sestavili ELISA test pro měření enzymové aktivity MAP. Nejdříve byl substrát imobilizován na povrchu mikrotitračních destiček. Následně byla přidána MAP kináza a ATP. Po inkubaci byla přidána fosfo-specifická protilátka k zachycení fosforylovaného peptidového substrátu. K zachycení komplexu protilátky a fosforylovaného peptidového substrátu byla použita kozí anti-rabbit IgG protilátka značená alkalickou fosfatázou se specifitou proti fosfo-specifické protilátce. Byl přidán substrátový roztok pro alkalickou fosfatázu, který obsahoval 4-nitrofenylfosfát, jehož intenzita byla měřena spektrofotometrem pro mikrotitrační destičky. Tento postup byl oproti radioaktivním metodám lepší v ohledu kvantifikace, přesnosti, časové náročnosti a možnosti automatizace [96].

Rijksen a kol. (1996) zavedli ELISU pro stanovení aktivity TK v biologických vzorcích. Jamky mikrotitrační destičky byly aktivovány maleinanhydridem a modifikovány specifickým peptidovým substrátem pro TK patřící do rodiny Src kináz. Do jamek byl přidán vzorek obsahující TK a ATP a směs byla inkubována. Po inkubaci bylo stanoveno množství fosforylovaných tyrosylových zbytků pomocí protilátek specifických pro fosfotyrosin, na které byla navázána sekundární protilátka značená peroxidázou. Test byl snadný, rychlý a reprodukovatelný vzhledem k obvyklým radioaktivním metodám [97].

### 2.3.6 Elektrochemické stanovení

V elektrochemickém biosenzoru je kombinována schopnost elektrochemických technik se specifickou funkcí biologického prvku, kterým může být enzym, protilátka, nukleová kyselina, mikroorganismus nebo buňka. Jde o integrované zařízení, které poskytuje vysoce specifickou odpověď na cíl prostřednictvím molekulárního rozpoznávání a konformačních změn. Bioreceptor je imobilizován na elektrodě a jeho reakce s analytem vede k produkci elektrického signálu, který poskytuje kvalitativní či kvantitativní signál [98, 99].

Biologická vrstva zajišťuje specifické rozpoznání analytu. Převodník převádí informaci z této interakce na měřitelný signál. Elektrochemické převodníky převádí interakci na změnu proudu, potenciálu či vodivosti. Na konci je detekční systém, který měří tyto změny. Uspořádání biosenzoru je schematicky zobrazeno na Obr. 7 [99].



Obr. 7 Schéma měření biosenzoru, upraveno dle [99]

Typický biokatalytický rozpoznávací prvek, který je využívám při výrobě biosenzorů, je enzym. Enzym katalyzuje přeměnu specifického substrátu na nový produkt. Enzym je zcela specifický pro svůj substrát pro komplementární vazebné místo. [100].

Nejvhodnější je použití enzymů v roztocích, protože je v každém stanovení čerstvá dávka katalyzátoru. Avšak u některých aplikací to představuje omezení pro vývoj analytických postupů kvůli vysoké spotřebě enzymů. Navíc enzymy v roztoku nelze znovu použít, mohou

být nestabilní a velmi rychle ztrácet svou aktivitu, pokud není kontrola nad podmínkami prostředí. Řešením je imobilizace enzymů pro rutinní používání. Imobilizace zaručuje dobrou katalytickou aktivitu a znovupoužití enzymu, díky čemuž se výrazně sníží náklady na analýzu [101].

Imobilizace enzymu na pevný nosič nebo začleněním do látky na povrchu elektrod, je jedním z nejdůležitějších kroků ke získání informací o biologické specifické reakci. Vzniknou vysoce selektivní a citlivé biosenzory. Aby byly přirozené biologické aktivity biosenzoru po imobilizaci zachovány, bylo vyvinuto několik imobilizačních technik s vysokou biokompatibilitou, stabilitou a vodivostí [100, 101].

Elektrochemické biosenzory vykazují vysokou senzitivitu a specifitu pro detekci kináz díky zesílení signálu enzymů nebo nanomateriálů. Díky vysoké senzitivě je při minimálních změnách koncentrace analytu pozorována významná změna signálu. Specifita zajistí odlišení analytu od jiných materiálů ve vzorku. Čím je specifita vyšší, tím efektivněji je měřen a identifikován analyt bez interferencí z jiných materiálů. Při imobilizované sondě na povrchu elektrody může dojít ke stérické zábraně, čímž se omezí interakce mezi reakčním místem a aktivním centrem enzymu pro enzymatickou reakci. Tím dojde ke snížení účinnosti fosforylace. Biosenzor je užíván pro analýzu léčiv, diagnostiku onemocnění a kvantifikaci biomolekul [72, 99, 100, 102].

Základem elektrochemických analytických metod je přeměna chemické a elektrické energie. Mezi elektrochemické metody řadíme potenciometrii, amperometrii, konduktometrii a coulometrii. K výhodám elektrochemie patří zejména jednoduchost, citlivost a přesnost [98, 103].

Základem potenciometrie je měření rozdílu potenciálu mezi indikační a referenční elektrodou, které jsou spojeny se dvěma koncovými vývody voltmetru a ponořeny do měřeného roztoku vzorku. Potenciál poskytuje informace o koncentraci iontů ve vzorku. [99, 104, 105].

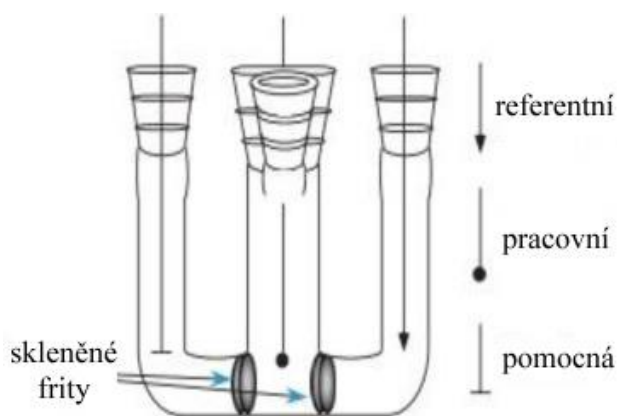
Amperometrie je založena na měření elektrického proudu v závislosti na čase při udržování konstantního elektrického potenciálu. Biosenzor na bázi amperometrie obvykle využívá imobilizaci enzymu na povrchu elektrody, kde vzniká elektrický proud, který je podmíněn oxidační nebo redukční reakcí přímo související s enzymatickou reakcí. Detekovaný signál koreluje s koncentrací analytu [106, 107].

Konduktometrie sleduje vodivost roztoku vzorku, kdy se během chemické reakce mění jeho složení. Konduktometrické biosenzory obsahují enzym, jehož nabitý produkt mění iontovou sílu, čímž dojde ke zvýšení vodivosti [98].

Při coulometrických měřeních je měřen celkový náboj, který je spotřebován při redoxní konverzi analytu na elektrodě. Coulometrie je absolutní metoda, protože elektrický náboj lze měřit s vysokou přesností [108].

Pro elektrochemickou metodu bez rozpoznávacího prvku je velmi důležitým faktorem účinná imobilizace receptoru či substrátu na elektrodě a vytváření zesílených signálů. Vyvinutí takových biosenzorů je díky možnosti použití nanomateriálů [75].

Při elektrochemickém měření ve vodných roztocích se měří v systému tří elektrod - dvou kontrolních elektrod (referentní a pomocná elektroda) a pracovní elektrody. Referentní elektrodou může být nasycená kalomelová elektroda, reverzibilní vodíková elektroda nebo chloridostříbrná elektroda. Pracovní elektroda je vyrobena z ušlechtilého kovu (platinová elektroda, zlatá elektroda a stříbrná elektroda) nebo na bázi uhlíku (elektroda ze skelného uhlíku, elektroda z pyrolytického grafitu a elektroda z uhlíkové pasty). Schéma tříelektrodevého systému je uvedeno na Obr. 8 [99, 100, 109].



Obr. 8 Tříelektrodevý systém, upraveno dle [99]

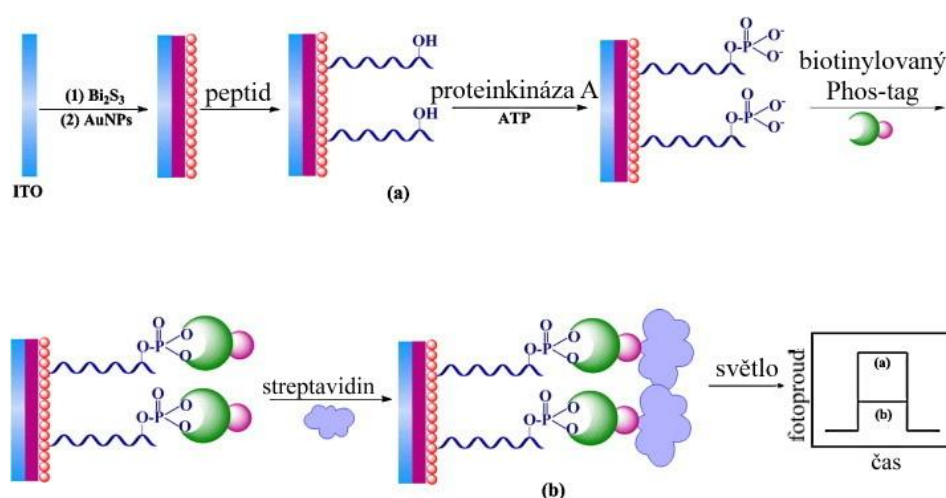
Existuje několik přístupů elektrochemického stanovení, jakými lze pomocí biosenzorů studovat fosforylací proteinů a tím monitorovat aktivitu kináz.  $\text{TiO}_2$

### **Detekce pomocí fotoelektrochemie**

Fotoelektrochemické (PEC) metody mají vysokou citlivost, s čímž se pojí lepší analytické provedení. Oproti jiným technikám mají výhody ve snadném odečítání, levných zařízeních a jednoduché obsluze. PEC metody využívají světlo k excitaci PEC aktivních druhů a měří se generovaný foton proud. K používaným fotoaktivním druhům patří kvantové tečky (QD) či nanočástice ušlechtilých kovů [110, 111].

PEC biosenzor byl popsán pro detekci aktivity PKA na principu specifického rozpoznání biotinylovaného Phos-tagu pro fosfopeptidy, indukované kinázou, ve spojení s inhibicí elektronového přenosu streptavidinového tagu nebo pro zlepšení signálu ALP [110].

Zhou a kol. (2015) sestavili biosenzor pro detekci aktivity PK a screening inhibitorů. Pro sestavení biosenzoru byla využita elektroda z oxidu india a cínu (ITO). AuNPs byly imobilizované na povrchu elektrody. Povrch byl dále upraven nanorody  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  (fotoaktivní materiál). S-peptid s cysteinem na C-konci byl fixován na povrch elektrody prostřednictvím vazby mezi AuNPs a thiolovou skupinou cysteinu. Takto připravený peptid na ITO elektrodě byl fosforylován PKA. Následně byl biotinylovaný phos-tag specificky zachycen fosfátovou skupinou a na biotin byl navázán streptavidin (viz Obr. 9). Výsledné stanovení bylo fotoelektrochemickou detekcí. Detekce aktivity PKA byla založena na změnách fotoproudu, kdy jeho pokles koreloval s úrovní fosforylace [69].

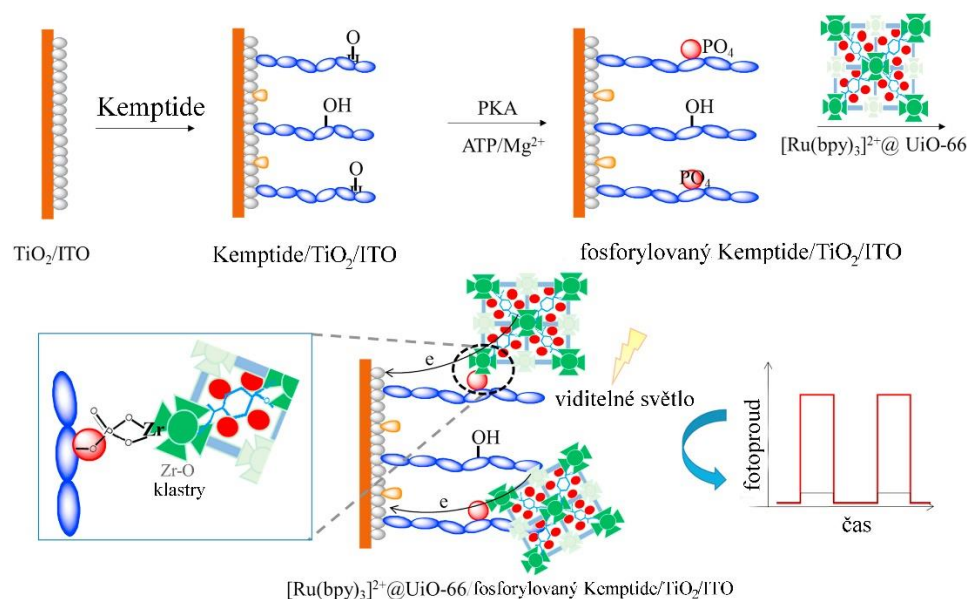


Obr. 9 Detekce PKA s využitím Phos-tag, upraveno dle [69]

Na interakci avidin-biotin navrhli také Chang a kol. (2021) heterogenní elektrochemickou metodu pro detekci aktivity kináz. Fosforylační reakce byla prováděna v roztoku. Biotinylovaný fosopeptid byl zachycen na neutravidinem modifikované elektrodě prostřednictvím interakce avidin-biotin. Následně byla přidána signální směs, která obsahoval AuNPs modifikované neutravidinem, dipeptid značený ferrocenem, biotinylovaný Phos-tag a kovový chelátor  $\text{Zn}^{2+}$ . Biotinylovaný fosopeptid byl rozpoznán signální směsí a výsledná detekce byla diferenčně pulzní voltametrií [102].

Wang a kol. (2017) sestavili biosenzor pro detekci aktivity a hodnocení inhibitorů PKA. V PEC biosenzoru byly využity kovové organické kostry (MOFs), založené na klastru Zr, které sloužily jako úchyty pro fosfátové skupiny a nosiče pro fotoaktivní barviva. MOFs byly řazeny do třídy anorganicko-organických hybridů. Měli velký povrch, flexibilní pórovitost, snadno přizpůsobitelnou kompozici a aktivní místa. UiO série ze Zr klastrů, založených na MOFs, byly integrovány s výhodami stability ve vodných podmínkách a menší toxicitě. Účinnost odběru světla byla zlepšena díky pórovitosti, kdy bylo možné pojmout velké množství fotoaktivních barviv. Kovová centra v UiO sériích z MOFs mohly být využity jako QD [110].

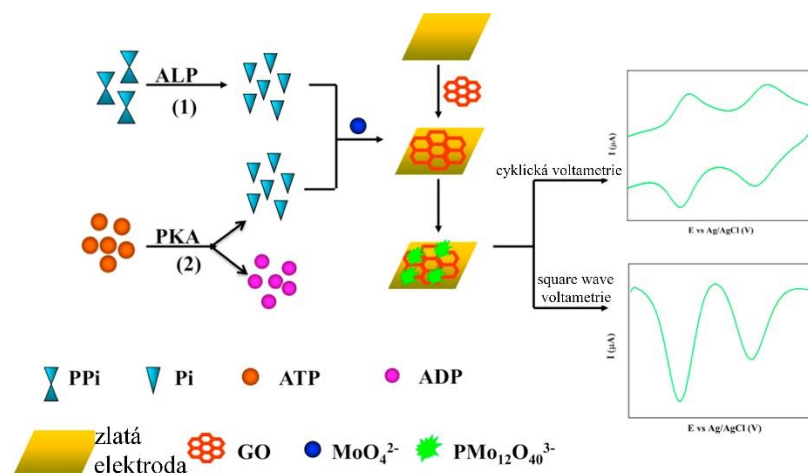
Pro jeho sestavení byla použita substrátem Kemptide modifikovaná  $\text{TiO}_2/\text{ITO}$  elektroda, který byl fosforylován PKA. Byly přidány  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{UiO}-66$  sondy, které byly specificky chelátovány na fosforylovaný substrát Kemptide prostřednictvím vysoké afinity mezi povrchovými defekty  $\text{Zr}^{4+}$  na  $\text{Zr}-\text{O}$  klastrech a fosfátovými skupinami ve fosforylovaném substrátu Kemptide. Fotoelektrochemicky byl detegován fotoproud, generovaný ozáření viditelného světla, odpovídající aktivitě PKA. Uspořádání takového biosenzoru je uvedeno na Obr. 10 [110].



Obr. 10 Detekce pomocí fotoelektrochemie, upraveno dle [110]

### Detekce pomocí tvorby fosfátových iontů

Shen a kol. (2016) sestavili biosenzor pro monitorování aktivity a inhibice PKA a ALP. Biosenzor byl založen na principu hydrolyzy ATP na adenosindifosfát (ADP) pomocí PKA, zatímco pyrofosfát byl hydrolyzován ALP. Fosfátové ionty byly vedlejším produktem těchto dvou dějů a reagovaly s kyselým molybdenanem na elektrodě ze skelného uhlíku za vzniku sraženiny molybdfosfátu, generující elektrochemický proud, který úměrně odpovídá aktivitě PKA nebo ALP (viz. Obr. 11). Pro jeho sestavení byla použita zlatá elektroda, která byla modifikována GO. Následně byl přidán roztok  $\text{Na}_2\text{HOP}_4$ , roztok  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , ATP a PKA. Sraženina molybdfosfátu byla indukována redoxním proudem na povrchu elektrody. Výsledná detekce byla cyklickou voltametrií. Výhody vyvinuté metody byly v jednoduché obsluze, nízkých nákladech, širokém lineárním rozsahu, dobré citlivosti (při zvýšení koncentrace ATP na  $250 \mu\text{M}$  se zvýšila citlivost senzoru směrem k  $50 \text{ U/ml}$  PKA) a nízkém limitu detekce. Biosenzor bylo možné aplikovat v klinickém použití a pro biomedicínský výzkum, díky regulaci buněčných procesů, iniciaci a progresi nádorů, na kterých se PKA podílí [62, 112, 113].



Obr. 11 Detekce pomocí depozice redoxních sraženin, upraveno dle [62]

Lee a kol. (2020) vyvinuli citlivou metodu pro monitorování aktivity PKA. Byla použita elektroda ze skelného uhlíku, která byla modifikována AuNPs/rGO-GCE. Na elektrodu byl adsorpcí fixován C-Kemptide prostřednictvím vazby zlata a thiolových skupin. Pro měření aktivity PKA byla AuNPs/rGO-GCE elektroda modifikovaná C-Kemptide ponořena do roztoku sulfidu olovnatého o specifické koncentraci PKA, ATP a ferokyanidu draselného. Fosforylace substrátu C-Kemptide byla regulována PKA a ATP. Detekce bez značení byla umožněna záněním přenosu náboje z redoxního indikátoru, kterým byl ferokyanid draselný, kvůli tvorbě negativně nabitých fosfátových iontů na AuNPs/rGO-GCE modifikované C-Kemptide [75].

Aktivitu PKA bylo možné citlivě monitorovat s limitem detekce až 53 mU/ml. Metodou bylo umožněno selektivní odlišení cílů od interferujících druhů, což mělo uplatnění v komplexních buněčných lyzátech [75].

### Detekce s využitím mikročipů naplněných $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PNE-Ti}^{4+}$

Xu a kol. (2020) vyvinuli biosenzor pro stanovení aktivity kinázy s využitím mikročipů, naplněných  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PNE-Ti}^{4+}$ . Pro separaci peptidového substrátu a fosforylovaného produktu byla použita metoda fosfátové afinitní elektroforézy založené na mikročipech. K separaci fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů byla využita kapilára, která uvnitř obsahovala magnetické nanočástice s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  [73, 114].

Pokud došlo k fosforylaci peptidů pomocí PKA, bylo možné pozorovat účinnou separaci fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů na mikročipu s náplní  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PNE-Ti}^{4+}$ . Tato separace byla zprostředkována díky specifické interakci mezi fosfátovými skupinami a  $\text{Ti}^{4+}$ . Čím vyšší byla aktivita PK, tím více vzniklo fosforylovaného peptidu a byla detekována větší plocha píku fosforylovaného peptidu pomocí mikročipové elektroforézy. Detekční potenciál byl + 0.6 V a separační napětí + 1100 V. Výťažky se pohybovaly v rozmezí 97-102 %. Lineární



rozsah byl 0.05-4 U/ml a mez detekce 0.015 U/ml. Stanovení aktivity PKA s využitím izolace fosforylovaného substrátu na mikročipu na bázi  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PNE-Ti}^{4+}$  bylo kvantitativní, rychlé a citlivé [73].

### **Detekce se zesílením signálu pomocí polymerace**

Hu a kol. (2018) popsali elektrochemickou platformu pro detekci aktivity PK, kdy jako modelová PK byla použita PKA, která využívala elektrochemicky zprostředkovanou polymeraci jako zesílení signálu [72].

S-peptidy byly imobilizovány na povrch zlaté elektrody pomocí Au-S, prostřednictvím vazeb Au na thiolové skupiny. S-peptidy byly fosforylovány PKA v přítomnosti ATP jako kosubstrátu. Alkylbromid a kyselina  $\alpha$ -bromfenyloctová byly připojeny na fosforylovaná místa prostřednictvím karboxylát- $\text{Zr}^{4+}$ -fosfátu. Za přítomnosti povrchově připojené kyseliny  $\alpha$ -brombenyloctové jako iniciátoru a akrylátem značeného ferrocenem (Fc) jako monomeru, došlo k *in situ* roubování elektroaktivních polymerů z fosforylovaných míst. Fc byl použit jako redox aktivní značka [72].

Velké množství Fc tagů bylo navázáno na fosforylovaná místa z důvodu polymerace zprostředkované elektrochemicky. Tím byla výrazně zlepšena citlivost detekce. Metoda byla vysoce selektivní, provozně jednoduchá (bez potřeby nanomateriálů či enzymů), velmi účinná, finančně efektivní a využitelná pro screening inhibitorů a PK [72, 115].

### **Detekce s využitím adenosin 5'-[ $\gamma$ -ferrocen] trifosfátu (Fc-ATP)**

Kerman a kol. (2008) sestavili biosenzor pro monitorování aktivity a inhibice serin/threonin kináz, CK2 a proteinových TK. Aktivita kináz byla detegována pomocí redox aktivního kosubstrátu Fc-ATP, který umožňoval přenos redox aktivního  $\gamma$ -fosfátu-Fc, katalyzovaný kinázou, na hydroxyaminokyselinu [116, 117].

Základem bylo značení specifického produktu fosforylační reakce Fc, po kterém následovala elektrochemická detekce square-wave votametrií. Monitorování aktivit kináz a jejich substrátů a inhibice malých molekul inhibitorů proteinové fosforylace bylo umožněno ferrocenylovaným peptidem [117].

S-peptid byl imobilizován na povrchu Au elektrody prostřednictvím sulfidických vazeb kyseliny lipové. Přenos  $\gamma$ -fosfát-Fc skupiny na serin/threoninové či tyrosinové zbytky byl katalyzován kinázou. Skupina Fc, která byla připojena k peptidu, byla detekována elektrochemicky pomocí cyklické voltametrie [117].

### **Detekce pomocí stříbrných nanočástic (AgNPs)**

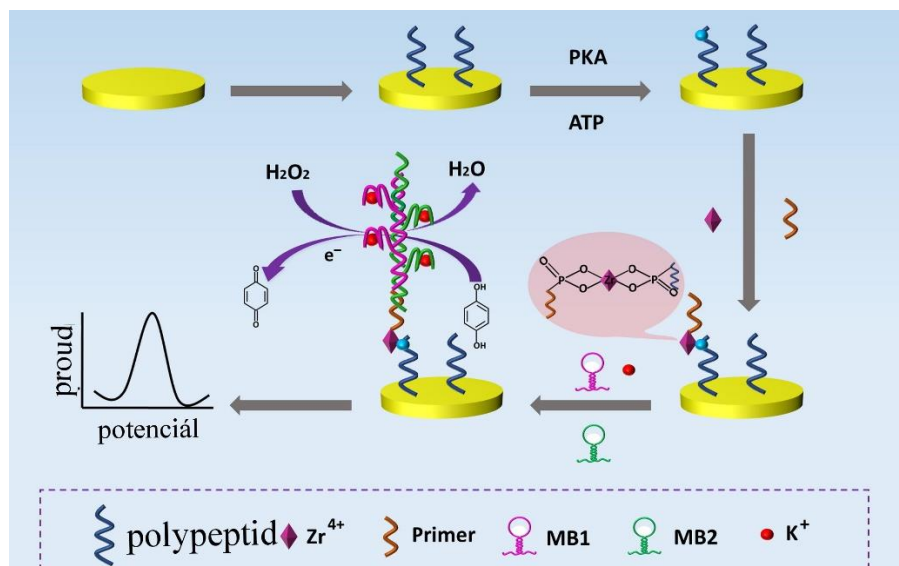
Liu a kol. (2017) sestavili biosenzor pro detekci aktivity PK. Pro jeho sestavení byla využita zlatá elektroda, modifikovaná peptidem obsahující citrát. Po proběhnutí fosforylace, AgNPs byly zachyceny thiofosforylovaným peptidem a 4-merkaptofenylboronová kyselina (MPSA) byla připojena k povrchově ukotveným AgNPs. AgNPs s citrátovou čepičkou byly zachyceny molekulami MPBA, prostřednictvím tvorby boronátových esterových vazeb. Tím byla vytvořena síť AgNPs-MPBA-AgNPs, která vedla k zesílení elektrochemického signálu. Výsledná detekce byla pomocí voltametrie s lineárním rozmítáním [116].

Výhoda oproti dříve popsaným strategiím zesilování signálu na bázi nanočástic byla v absenci modifikace nanočástic, dobrém elektrochemickém signálu a vysoké citlivosti. Princip detekce byl velmi jednoduchý a nabízel snadný postup provedení [116].

### **Detekce s využitím $Zr^{4+}$ a hybridizační řetězové reakce (HCR) pro amplifikaci signálu**

Cheng a kol. (2021) sestavili biosenzor pro detekci aktivity PKA, který byl založen na kombinaci přechodného signálu zprostředkovaného  $Zr^{4+}$  a HCR, zajišťující amplifikaci signálu. Jednalo se o úspornou metodu bez potřeby protilátky, proteázy a značení. [118].

Byla použita zlatá elektroda, modifikována peptidem. Elektroda byla vložena do roztoku PKA a následně byl přidán  $Zr^{4+}$  roztok.  $Zr^{4+}$  ionty byly navázány na fosforylované místo peptidu pomocí chelatace  $Zr^{4+}$  a fosfátových skupin. Podobně byl k  $Zr^{4+}$  vázán 5' fosforylovaný konec deoxyribonukleové kyseliny 1 (DNA1). Pro iniciaci HCR byla směs inkubována se směsí molecular beacons (MB). Pro tvorbu G-quadruplex-hemin byl přidán hemin, který katalyzoval peroxidační reakci se záměrem zesílení elektrochemické signalizace. Výsledná detekce byla měřena pomocí diferenciální pulzní voltametrie a elektrochemickou impedanční spektroskopií. Odezva signálu byla úměrná PKA. Uspořádání takového senzoru je zobrazeno na Obr. 12 [118, 119].



Obr. 12 Detekce s využitím  $Zr^{4+}$  a hybridizační řetězové reakce pro amplifikaci signálu, upraveno dle [118]

### Detekce s využitím zlatých nanočástic

Pro elektrochemické stanovení PK jsou využívány nanomateriály. Jedná se o nanočástice  $TiO_2$  či nanokompozity na bázi  $TiO_2$  a AuNPs [71].

Nanočástice  $TiO_2$  či nanokompozity na bázi  $TiO_2$  jsou snadno konjugovatelné s elektrodami, které jsou modifikované fosforylovanými peptidy, z důvodu vlastnosti selektivně vázat fosfátové funkční skupiny. To je použito k jednoduché detekci PK s vysokou citlivostí [71].

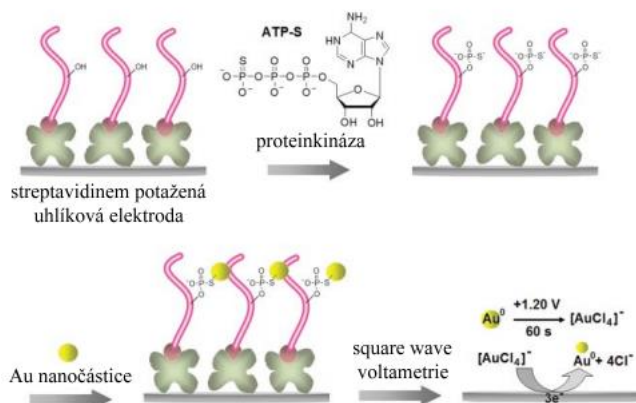
AuNPs byly využity pro elektrochemické biosenzory pro detekci aktivity PK. Mají unikátní optické a elektronické vlastnosti závislé na velikosti a tvaru, vysoký poměr povrchové plochy k objemu a lze je snadno modifikovat ligandy, které ovlivňují jejich povrchové vlastnosti. Povrchové vlastnosti mohou ovlivnit absorpci  $H_2O_2$  a procesy přenosu elektronů prostřednictvím částic a následně ovlivnit katalytickou schopnost  $+AuNPs$ . Aktivita  $+AuNPs$ , zakončených cysteaminem, je podobná peroxidáze [71, 120, 121].

Voltametrická detekce nanočástic Au na povrchu je jednoduchá a vysoce citlivá. Byly využity i další techniky voltametrické detekce nanočástic Au, které jsou však časově náročné se složitými pracovními postupy [122, 123].

Perspektivní materiál představují uhlíkové nanotrubicce (CNT), které jsou složeny z dutých grafitických válců. Díky jejich vlastnostem, ke kterým patří vysoká elektronická vodivost, jedinečná elektronická struktura a velký specifický povrch, jsou CNT slibné jako imobilizační látka pro vývoj elektrochemických biosenzorů [71, 124].

Kerman a kol. (2007) vyvinuli elektrochemický biosenzor pro detekci aktivity PK. Byla využita specifická fosforylační reakce v přítomnosti ATP-S a využitím AuNPs, následována elektrochemickou detekcí. Podmínky experimentu, zejména koncentrace ATP-S  $75 \mu M$  a PKC

100 U m/l, reakční doba 1 hodina a teplota na 30 °C, byly nastaveny pro thiofosforylační reakce. Biotinylovaný peptidový substrát PKC $\zeta$  byl imobilizován na uhlíkové elektrodě, potažené streptavidinem. Fosforylace byla spojena s thiolací substrátového peptidu za použití ATP-S jako kosubstrátu. Thiofosforylovaný a biotinylovaný peptidový substrát afinitně reagoval se streptavidinem na AuNPs a došlo k vazbě AuNPs na peptidový substrát. Kyselina chlorovodíková byla přidána ke směsi. Byly detegovány Au(III) ionty uvolněné z AuNPs oxidací, které byly detegovány square-wave voltametrií (viz. Obr. 13) [116, 122, 123].



Obr. 13 Detekce s využitím Au nanočástic, upraveno dle [122]

Liu a kol. (2014) vyvinuli jednoduchou a citlivou metodu pro stanovení aktivity a inhibice PKA s využitím AuNPs/vícevrstevných uhlíkových nanotrubic (MWNTs) nanohybridů. Využívají se výhody +AuNPs podobné peroxidáze a přenos signálu a amplifikace MWNTs. Na elektrodě imobilizovaný peptidový substrát byl fosforylován PKA za použití ATP-S jako kosubstrátu. Nanohybridy AuNPs/MWNTs byly konjugovány na fosforylovaný peptidový substrát pomocí vazby Au-S. Oxidace 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) byla katalyzována konjugovanými nanohybridy AuNPs/MWNTs za pomoci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Následně došlo k jeho redukci na elektrodě, vlivem které byl generován proud. Vzniklý proud byl úměrný aktivitě PKA. Vyvinutá metoda sloužila jako snímací platforma pro monitoraci aktivity a inhibice PKA [71, 125].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

#### Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- pH metr Orion 420A+ (Orion, USA)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Magnetický separátor (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Potenciostat Palm Sens elektrochemický biosenzor Interface (Palm Instruments BU, Nizozemsko)
- Uhlíkové elektrody OrionHT (Orion, High Technologies S. L., Španělsko)
- Uhlíkové elektrody DropSens Metrohm DRP-C110 (Metrohm DropSens, Švýcarsko)
- Dropsens Metrohm DRP-110STR s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem, (Metrohm DropSens, Švýcarsko)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Termostat Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- Zařízení pro výrobu ultračisté vody TKA Smart2Pure (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Německo)
- Nosič OLIGO™ R3 Reversed-Phase Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- MALDI destička Opti-TOFTM 384 Well Insert (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, USA)
- MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Zlaté nanočástice o velikosti 5, 10, 20, 30 a 50 nm, stabilizované v citrátovém pufru (Sigma-Aldrich, Kalifornie, USA)
- Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

#### Použité magnetické částice

- Sera-Mag Speed Beads o průměru 0,816  $\mu\text{m}$  s karboxylátovou funkční skupinou (Metachem Diagnostics Ltd, Piddington Northampton, UK)
- Dynabeads© MyOne™ modifikované karboxylovou kyselinou, o průměru 1  $\mu\text{m}$  (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva)

- Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 o průměru 1 μm (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva)

#### Speciální biochemikálie

- Proteinkináza A (PKA), podjednotka Cα 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), teoretická molekulová hmotnost 168 kDa, aktivita 15 000 000 U/mg (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo), dále používán název PKA
- Adenosin 5'-Trifosfát (New England, BioLabs® Inc.)
- Adenosin 5'-[γ-thio]trifosfát tetralitná sůl, čistota ≥75 %, prášek (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Kemptide o sekvenci LRRASLG (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA)
- Biotin-Kemptide o sekvenci biotin-LRRASLG, čistota ≥95 % (Abbexa Ltd, Cambridge, UK)

### 3.2 Imobilizace proteinkinázy A na magnetický nosič

#### Použité chemikálie:

- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (TRIS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES, Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Dithiotreitol (DTT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>)

#### Použité roztoky:

- 50 mM MES pufr, pH 6.0
- 100 mM TRIS-HCl pufr, pH 7.2
- Reakční pufr, pH 7.2: 40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Postup:

Postup je uveden pro vazbu 6 µg PKA na 1.2 mg magnetického nosiče. Bylo odebráno 1.2 mg magnetických částic, které byly pomocí magnetického separátoru promyty 5x 1.2 ml 50 mM MES pufru, pH 6.0. K magnetickým částicím bylo přidáno 9 mg EDAC v 600 µl MES pufru, pH 6.0 a 1,5 mg sulfo-NHS ve 600 µl MES pufru, pH 6.0. Takto připravená reakční směs byla inkubována 30 min na rotátoru při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a k magnetickým částicím bylo přidáno 6 µg PKA s MES pufr, pH 6.0. Takto připravená směs byla inkubována 18 h při 4 °C na rotátoru. Následující den byl supernatant odstraněn a bylo přidáno 1.2 ml 100 mM TRIS-HCl pufru, pH 7.2. Připravená směs byla inkubována 40 min na rotátoru při laboratorní teplotě. Následně byly částice promyty 5x 1.2 ml 50 mM MES pufr, pH 6.0 a 5x 1.2 ml 40 mM HEPES pufr, pH 7.2. Pro pozdější použití jsou magnetické částice s imobilizovanou PKA skladovány v 50 mM MES pufru, 6,0 při teplotě 4 °C.

### 3.3 Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A

#### Použité chemikálie:

- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES, Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Dithiotreitol (DTT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>)
- 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.2
- 50 mM MES pufr, pH 6.0

#### 3.3.1 Fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A v čase

##### Postup:

Byly připraveny čtyři různé reakční směsi. Na první reakční směs byl smíchán reakční pufr, 5 µl ATP (0.5 mM), 1 µl biotin-Kemptide (10 µg) a 0.68 µg PKA v celkovém objemu 100 µl. Na druhou reakční směs byl smíchán reakční pufr, 5 µl ATP-S (0.5 mM), 1 µl biotin-Kemptide (10 µg) a 0.68 µg PKA. Na třetí reakční směs byl smíchán reakční pufr, 5 µl ATP (0.5 mM), 10 µl Kemptide (10 µg) a 0.68 µg PKA. Na čtvrtou reakční směs byl smíchán reakční pufr, 5 µl ATP-S (0.5 mM), 10 µl Kemptide (10 µg) a 0.68 µg PKA. Připravené reakční směsi, obsahující solubilní PKA, reakční pufr, ATP či ATP-S a Kemptide či biotin-Kemptide, byly inkubovány při 30 °C na rotátoru. Inkubace probíhala 1, 3 a 20 hodin. Pokud neproběhlo měření po skončení fosforylační reakce, vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly uskladněny při teplotě -20 °C.

#### 3.3.2 Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetický nosič

##### Postup:

Magnetické částice byly 2x 1.2 ml promyty HEPES pufr, pH 7.2. Bylo odebráno takové množství magnetických částic s imobilizovaným enzymem, které odpovídalo 1.5 µg imobilizované kinázy. K prvnímu alikvotu magnetických částic bylo přidáno 94 µl reakčního pufru, 1 µl biotin-Kemptide (10 µg) a 5 µl ATP (0.5 mM). Ke druhému alikvotu magnetických



částic bylo přidáno 94  $\mu$ l reakčního pufru, 1  $\mu$ l biotin-Kemptide (10  $\mu$ g) a 5  $\mu$ l ATP-S (0.5 mM). Ke třetímu alikvotu magnetických částic bylo přidáno 85  $\mu$ l reakčního pufru, 10  $\mu$ l Kemptide (10  $\mu$ g) a 5  $\mu$ l ATP (0.5 mM). Ke čtvrtému alikvotu magnetických částic bylo přidáno 85  $\mu$ l reakčního pufru, 10  $\mu$ l Kemptide (10  $\mu$ g) a 5  $\mu$ l ATP-S (0.5 mM). Reakční směs byla inkubována 3 nebo 5 h při 30 °C na rotátoru. Pokud neproběhlo měření po skončení fosforylační reakce, vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly uskladněny při teplotě -20 °C. Po odebrání supernatantu byly magnetické částice 5x 300  $\mu$ l promyty 50 mM MES pufrem, pH 6.0 a uchovány v něm.

### 3.3.3 Kalibrační závislost solubilní proteinkinázy A

Bylo zvoleno šest koncentrací PKA - 0.5, 1, 1.5, 2, 3 a 5  $\mu$ g PKA. Reakční směs byla vytvořena dle Tabulky 1 v celkovém reakčním objemu 100  $\mu$ l. Reakční směs byla inkubována 3 hodiny při 30 °C na rotátoru. Pokud vzorky nebyly měřeny ihned po skončení fosforylační reakce, byly uskladněny při teplotě -20 °C.

*Tabulka 1 Složení reakční směsi pro měření kalibrační závislosti solubilní PKA*

c PKA [ $\mu$ g]	V PKA [ $\mu$ l]	V HEPES pufr [ $\mu$ l]	V BK [ $\mu$ l]	V ATP-S [ $\mu$ l]
0.5	0.73	93.27	1	5
1	1.47	92.53	1	5
1.5	2.2	91.8	1	5
2	2.94	91.06	1	5
3	4.41	89.59	1	5
5	7.35	86.65	1	5

## 3.4 Detekce fosforylovaného substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie

### 3.4.1 Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných POROS OLIGO™ R3 reverzní fázi

#### Použité chemikálie:

- Acetonitril 99.8% (ACN, Sigma-Aldrich CHEMIE, GmbH, Steinheim, Německo)
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB, LaserBio Labs SARL, Valbonne, Francie)
- Kyselina fosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Fluka, New Jersey, USA)

#### Použité roztoky:

- 80% ACN/0.1% TFA
- 0.1% TFA
- 5% TFA

- Matrice pro fosforylované substráty DHB 10 mg/ml v 50% ACN/0.1% TFA s 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Suspenze fáze OLIGO™ R3 Reversed-Phase Resin v 80% ACN/0.1% TFA

#### Postup:

Poslední 2-3 mm GELoaderu byly stlačeny fixem takovým způsobem, aby byl plochý a nedocházelo k uvolňování fáze. Do takto připraveného GELoaderu bylo napipetováno 10 µl homogenizované suspenze fáze. Pomocí insulin stříkačky byla fáze opatrně tlačena. Pipetovaná hustota homogenizované suspenze fáze byla optimalizována tak, aby délka kolonky byla ideálně 1 cm. Do takto připravené kolonky bylo napipetováno 10 µl 80% ACN/0.1% TFA a protlačeno. Následně bylo napipetováno 15 µl 0.1% TFA k promytí kolonky a protlačeno tak, aby nad fází zůstalo 5 µl. Vzorky byly okyseleny 5% TFA (10:1) a nanášeny do kolonky po 10 µl bez ředění. Fáze s navázaným vzorkem byla promyta 1x 15 µl 0.1% TFA a zbytkový vzduch byl protlačen skrz fází, aby došlo k vysušení fáze a nedošlo k ředění elučního roztoku. Do špičky byly přidány 4 µl matrice a následná eluce probíhala přímo na MALDI destičku. Vzorek byl nanášen tak, aby byla spota z 1/2 až 3/4 zakryta roztokem. Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL, který analyzuje v pozitivním módu s rozlišovací schopností 60000 (FWHM u m/z = 400).

### **3.4.2 Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií**

Z hmotnostního spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL byla získána hmotnostní spektra. Poměr hmotnosti a náboje (m/z) nefosforylovaného substrátu Kemptide PKA odpovídá hodnotě 772, fosforylované formě v přítomnosti ATP odpovídá hodnota 852. V přítomnosti ATP-S je hodnota m/z fosforylovaného substrátu Kemptide PKA 868, kde se sčítá relativní intenzita píků fosforylace v přítomnosti ATP a ATP-S. U nefosforylovaného substrátu biotin-Kemptide odpovídá hodnota m/z 998. Fosforylovaný substrát biotin-Kemptide v přítomnosti ATP odpovídá hodnotě m/z 1078, v přítomnosti ATP-S je hodnota m/z 1094. Z hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity píků, které odpovídali nefosforylované a fosforylované formě substrátu Kemptide či biotin-Kemptide. Z odečtených intenzit byla vypočtena procentuální míra fosforylace substrátu Kemptide či biotin-Kemptide podle Rovnice 1 v přítomnosti ATP.

$$\text{Míra fosforylace [\%]} = \frac{\text{fosforylovaný substrát}}{\text{fosforylovaný substrát} + \text{nefosforylovaný substrát}}$$

*Rovnice 1 Výpočet míry fosforylace substrátu v [%] v přítomnosti ATP*

Výpočet procentuální míry fosforylace v přítomnosti ATP-S zobrazuje Rovnice 2.

Míra fosforylace[%]

$$= \frac{\text{fosforylovaný substrát v přítomnosti ATP} + \text{ATP} - S}{\text{fosforylovaný substrát v přítomnosti ATP} + \text{ATP} - S + \text{nefosforylovaný substrát}}$$

Rovnice 2 Výpočet míry fosforylace substrátu v [%] v přítomnosti ATP-S

### 3.5 Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu

#### 3.5.1 Podmínky elektrochemické detekce

Tabulka 2 Podmínky pretreatmentu square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV)

kondiční E	- 0.15 V
kondiční t	0 s
depoziční E	- 1 V
depoziční t	0 s
t ekvilibrace	2 s
E začátek	- 1.0 V
E konec	0.0 V
E krok	0.003 V
amplituda	0.02805 V
frekvence	25.0 Hz

Tabulka 3 Podmínky měření SWCSV

kondiční E	0.15 V
kondiční t	120 s
depoziční E	1.2 V
depoziční t	180 s
t ekvilibrace	2 s
E začátek	1.2 V
E konec	0.0 V
E krok	0.003 V
amplituda	0.02805 V
frekvence	25.0 Hz

Podmínky, za jakých probíhal pretreatment u SWCSV jsou zobrazeny v Tabulce 2. Podmínky měření SWCSV jsou vypsány v Tabulce 3.

#### 3.5.2 Výběr elektrod a detekčních zlatých nanočástic

Použité chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

- Chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl, Penta, Chrudim, ČR)
- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES, Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Dithiotreitol (DTT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>)

#### Použité roztoky:

- PBS pufr, pH 7.4
- 40 mM HEPES pufr, pH 7.2
- 0.1 M HCl

#### Postup:

Na uhlíkovou elektrodu OrionHT bylo napipetováno 100  $\mu$ l PBS pufru, pH 7.4, a byl 10x spuštěn pretreatment, během kterého dochází k elektrochemické předúpravě elektrody. Elektrochemické čišění bylo puštěno za podmínek uvedených v kapitole 3.5.1.

Mezitím bylo smícháno 100  $\mu$ l 0.1 M HCl spolu s 10  $\mu$ l AuNPs v citrátovém pufru. Byly použity AuNPs o velikostech 5, 10, 20, 30 a 50 nm. Připravená směs byla zvortexována na Bio Vortex V1 a 3 minuty inkubována na rotátoru. PBS pufr byl opatrně odstraněn z elektrody a bylo napipetováno 100  $\mu$ l směsi 0.1 M HCl a AuNPs. Bylo puštěno měření, jehož podmínky jsou zobrazeny v kapitole 3.5.1. U DropSens Metrohm DRP-c110 elektrod není třeba elektrochemické čišění. Další postup je totožný jako u elektrod OrionHT.

Na DropSens DRP-110STR elektrodu bylo naneseo 100  $\mu$ l PBS pufru, pH 7.4 nebo 100  $\mu$ l HEPES pufru, pH 7.2 a bylo puštěno 1x měření podle podmínek zobrazených v kapitole 3.5.1. Mezitím bylo smícháno 10  $\mu$ l nebo 20  $\mu$ l AuNPs v citrátovém pufru společně s 0.1 M HCl a doplněno na objem 100  $\mu$ l. Byly použity AuNPs o velikostech 5, 10, 20, 30 a 50 nm. Připravená směs byla zvortexována na Bio Vortexu V1 a 3 minuty inkubována na rotátoru. PBS pufr, pH 7.4 či HEPES pufr, pH 7.2 byl opatrně odstraněn z elektrody a bylo napipetováno 100  $\mu$ l směsi 0.1 M HCl a AuNPs, které se před aplikací zvortexovaly na Bio Vortex V1. Měření proběhlo dle podmínek zobrazených v kapitole 3.5.1.

### **3.5.3 Izolace fosforylovaného substrátu na streptavidinem modifikovaných elektrodách**

#### Použité chemikálie:

- Citronan trisodný dihydrát (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citrónová monohydrát (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)

#### Použité roztoky:

- 0.1 M HCl
- 10 mM citranový pufr, pH 3.0

#### Postup:

Po proběhnutí fosforylační reakce dle kapitoly 3.3.2 pro imobilizovanou PKA, s využitím substrátu biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S s dobou fosforylace minimálně 3 hodiny, byly u imobilizované PKA magnetické částice odseparovány od supernatantu na magnetickém separátoru. Supernatant byl nanesen na DropSens elektrodu DRP-110STR a směs byla inkubována 20 minut při laboratorní teplotě v zakrytých Petriho miskách. Vzorek byl odstraněn a na elektrodu byla nanesená předem smíchaná směs 10 či 20  $\mu\text{l}$  10 nm AuNPs a citranového pufru, pH 3.0 v celkovém objemu 100  $\mu\text{l}$ . Následovala inkubace 20 minut při laboratorní teplotě. Směs byla odtáhena a elektroda byla promyta 1x 100  $\mu\text{l}$  citranového pufru, pH 3.0. Následně bylo na elektrodu napipetováno 100  $\mu\text{l}$  0.1 M HCl a proběhla 3 minutová inkubace. Následovalo měření za podmínek v kapitole 3.5.1.

### **3.5.4 Izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem**

#### Použité chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl, Penta, Chrudim, ČR)
- Citronan trisodný dihydrát (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citrónová monohydrát (Lachema, Brno, ČR)

#### Použité roztoky:

- 0.1 M HCl
- PBS pufr, pH 7.4
- 10 mM citranový pufr, pH 3.0

#### Postup:

Fosforylační reakce proběhla podle kapitoly 3.3.1 pro solubilní PKA a podle kapitoly 3.3.2 pro imobilizovanou PKA. Jako substrát byl využit biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S s dobou fosforylace minimálně 3 hodiny. Magnetické částice byly odseparovány od supernatantu na magnetickém separátoru. K prvnímu supernatantu byla přidána předem smíchaná směs 20  $\mu$ l 10 nm AuNPs a 80  $\mu$ l citranového pufru, pH 3.0. Směs byla inkubována 20 min. Poté byla směs přidána ke 0.3 mg magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, které byly 5x 300  $\mu$ l promyty v PBS pufru, pH 7.4, a následovala 20 min inkubace na rotátoru. Po skončení inkubace byl supernatant odstraněn a magnetické částice byly promyty 1x 100  $\mu$ l citranovým pufrem, pH 3.0. K magnetickým částicím bylo přidáno 100  $\mu$ l 0.1 M HCl a následovala inkubace 3 minuty na rotátoru. Magnetické částice byly odstraněny a supernatant byl připraven pro měření na uhlíkových OrionHT elektrodách. Na uhlíkových OrionHT elektrodách bylo provedeno elektrochemické přečištění 100  $\mu$ l PBS pufru, pH 7.4 podle podmínek v kapitole 3.5.1. Elektrochemické přečištění bylo spuštěno 10x. Měření vzorku bylo spuštěno podle podmínek v kapitole 3.5.1.

Druhý supernatant byl přidán ke 0.3 mg magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, které byly 5x 300  $\mu$ l promyty v PBS pufru, pH 7.4, a následovala 20 min inkubace na rotátoru. Supernatant byl odstraněn a k magnetickým částicím bylo přidáno 20  $\mu$ l 10 nm AuNPs a 80  $\mu$ l citranového pufru, pH 3.0. Směs byla inkubována 20 min. Supernatant byl odebrán a magnetické částice byly promyty 1x 100  $\mu$ l citranovým pufrem, pH 3.0. K magnetickým částicím bylo přidáno 100  $\mu$ l 0.1 M HCl a následovala inkubace 3 minuty na rotátoru. Magnetické částice byly odstraněny a supernatant byl připraven pro měření na uhlíkových OrionHT elektrodách. Měření probíhalo stejně jako u prvního supernatantu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavést metodu elektrochemické detekce pro stanovení aktivity enzymu proteinkinázy A (PKA). Stanovení bylo založeno na dvoukrokovém postupu. V prvním kroku byl fosforylován substrát proteinkinázou A v přítomnosti adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio] trifosfát tetralithné soli (ATP-S), kdy při fosforylaci vzniknou thiolové skupiny z přenesené síry, na které se mohou ve druhém kroku vázat zlaté nanočástice (AuNPs), které lze následně elektrochemicky detegovat pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV). Z dílčích kroků vedoucích k zavedení metody, bylo nutné zvolit vhodnou elektrodu, vhodné detekční zlaté nanočástice a optimalizovat reakční podmínky enzymatické reakce a také elektrochemické detekce. Pro fosforylaci byla použita solubilní PKA a PKA imobilizovaná na magnetické částice. Pro ověření účinnosti fosforylace byla použita jako standardní metoda hmotnostní spektrometrie (MALDI-Orbitrap MS).

Jako substrát byl zvolen nízkomolekulární peptidový substrát Kemptide s molekulovou hmotností 771.9 Da a o aminokyselinové sekvenci L-R-R-A-S-L-G a biotin-Kemptide s molekulovou hmotností 998.19 Da a aminokyselinovou sekvencí biotin-L-R-R-A-S-L-G. Biotinylovaný Kemptide byl použit pro elektrochemickou detekci z důvodu nutnosti zachycení substrátu na elektrodu před vlastní detekcí, a to pomocí interakce streptavidin-biotin. Fosforylace v přítomnosti ATP simuluje fosforylační reakci probíhající v lidském organismu a její účinnost byla ověřena pomocí MALDI-Orbitrap MS analýzy. Fosforylace peptidového substrátu PKA byla provedena v přítomnosti ATP nebo ATP-S a  $Mg^{2+}$ , při pH 7.2. Produkty této reakce jsou fosforylovaný peptidový substrát a ADP.

### 4.1 Ověření fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A pomocí hmotnostní spektrometrie

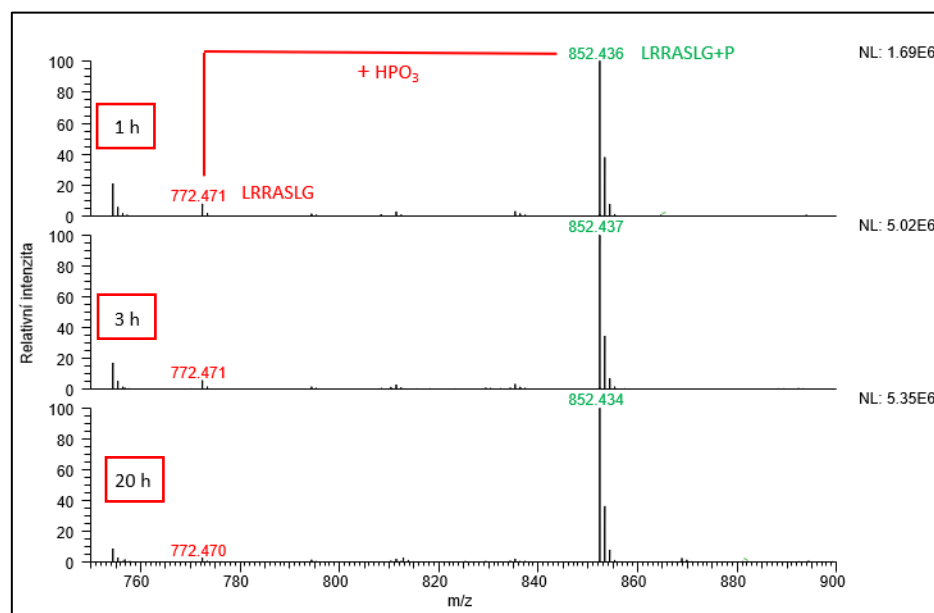
V prvním kroku bylo nutné ověřit, zda vybraný komerční enzym proteinkináza A (aktivita 15 000 000 U/mg, BIAFFIN GmbH & Co KG, Kassel, Německo), který byl používán v rámci experimentální části diplomové práce, fosforyluje nízkomolekulární substrát Kemptide (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) a biotin-Kemptide (Abbexa Ltd, Cambridge, UK). Stanovení fosforylovaného nízkomolekulárního substrátu bylo pomocí stanovení míry fosforylace. Fosforylace solubilní PKA o koncentraci 1.5  $\mu$ g byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1 s využitím substrátu Kemptide či biotin-Kemptide v přítomnosti ATP nebo ATP-S. Účinnost fosforylace byla sledována v časech 1, 3 a 20 hodin. Množství substrátu a koncentrace ATP a ATP-S bylo použito vždy stejné množství. Hodnoty vycházely z předešlých diplomových prací, v rámci kterých byly reakční podmínky optimalizovány. Před

vlastní analýzou pomocí MALDI-Orbitrap MS byly frakce fosforylovaných substrátů odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.4.1. Jako matrice pro fosforylovaný substrát byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB). Analýza vzorků byla provedena Mgr. Rudolfem Kupčíkem, Ph.D. na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL, který měří v pozitivním módu s rozlišovací schopností 60000.

Stupeň fosforylace byl hodnocen z poměru relativních intenzit píků fosforylované formy a součtu fosforylované a nefosforylované formy pomocí MALDI-Orbitrap MS.

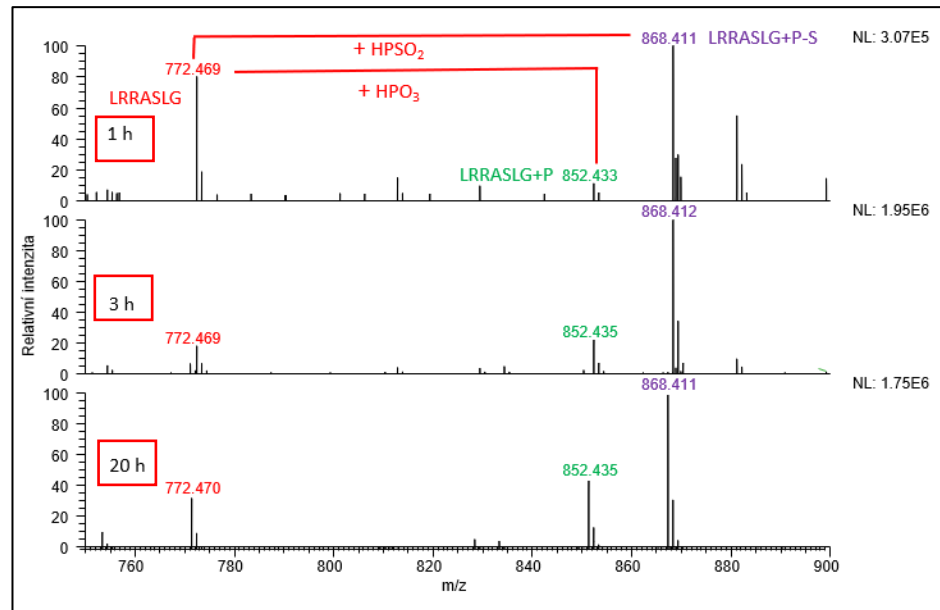
V MALDI-Orbitrap hmotnostních spektrech je sledován posun v  $m/z$  vlivem proběhlé fosforylace. U fosforylované formy v přítomnosti ATP dojde k hmotnostnímu přírůstku + 80 (hmota odpovídá fosfátové skupině  $HPO_3$ ). V přítomnosti ATP-S dochází k posunu o + 96, vlivem síry přítomné v molekule ATP-S (hmota odpovídá  $HPSO_2$ ). Je tedy pozorován posun z  $m/z$  772,47 na  $m/z$  852,43 (Kemptide +  $HPO_3$ ) v přítomnosti ATP či  $m/z$  868,41 (Kemptide +  $HPSO_2$ ) v přítomnosti ATP-S. V případě použití biotin-Kemptide je pozorován posun z  $m/z$  998,54 na  $m/z$  1078,51 (biotin-Kemptide +  $H_3PO_4$ ) v přítomnosti ATP či  $m/z$  1094,48 (biotin-kemptide +  $HPSO_2$ ) v přítomnosti ATP-S.

Výsledky MS analýzy jsou uvedeny na Obr. 14-17.

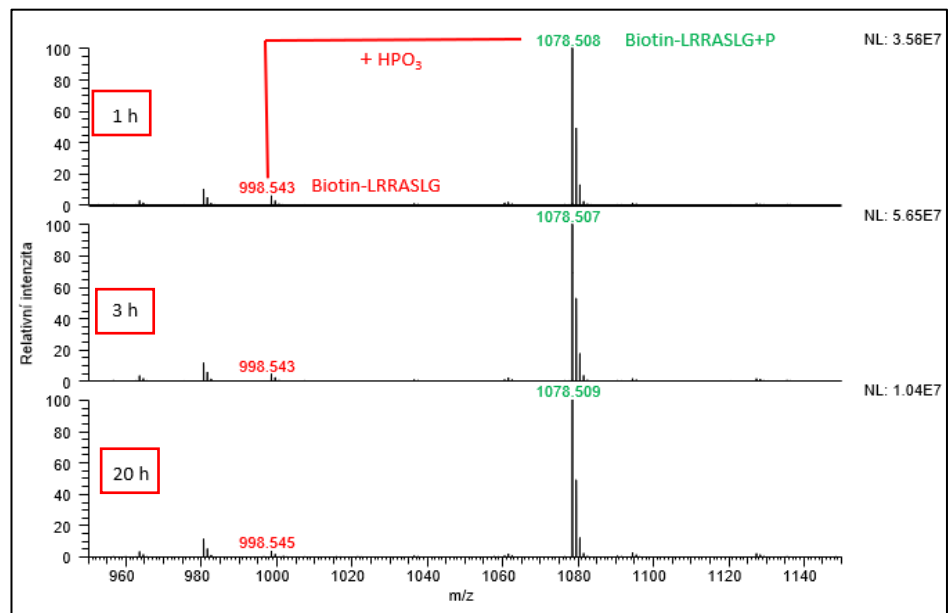


Obr. 14 Hmotnostní spektra substrátu Kemptide (K) fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP. E/S = 0.68/10  $\mu$ g, koncentrace ATP 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

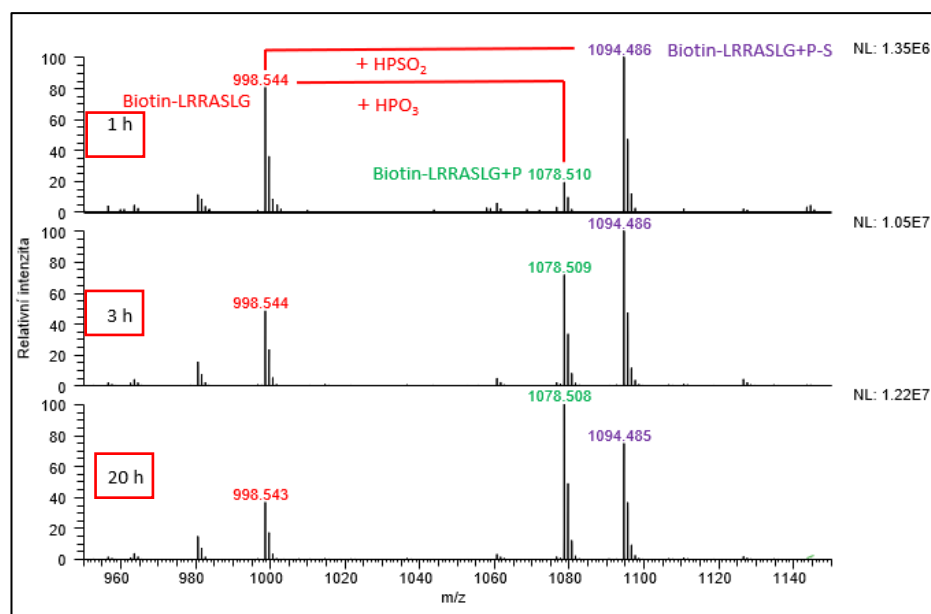




Obr. 15 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP-S. E/S = 0.68/10  $\mu$ g, koncentrace ATP-S 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS



Obr. 16 Hmotnostní spektra substrátu biotin-Kemptide (BK) fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP. E/S = 0.68/10  $\mu$ g, koncentrace ATP 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS



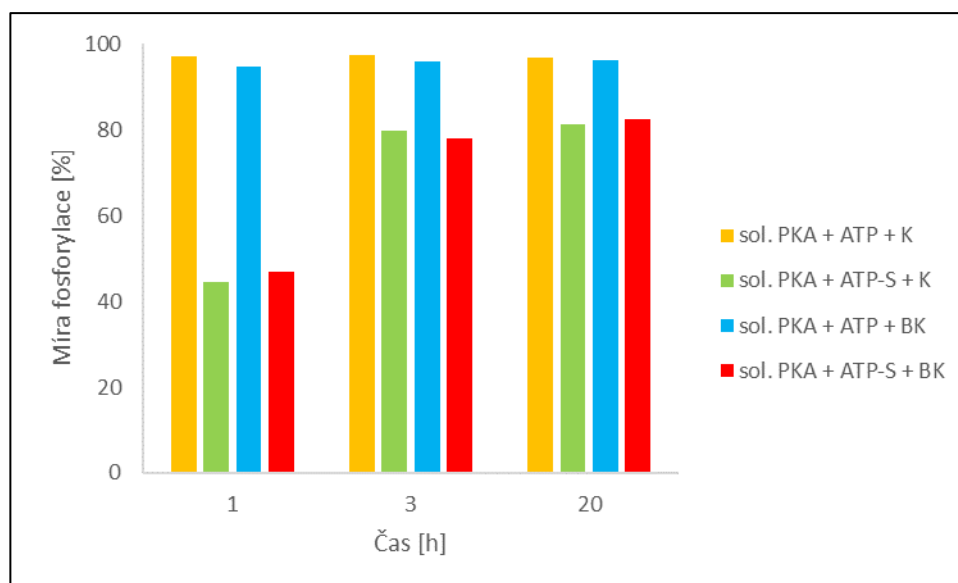
Obr. 17 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného solubilní PKA v přítomnosti ATP-S. E/S = 0.68/10  $\mu$ g, koncentrace ATP-S 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

Z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter (Obr. 14) je vidět, že došlo k téměř úplné fosforylaci substrátu Kemptide a to již po 1 hodině. Po 3 a 20 hodinách se míra fosforylace téměř neliší. Míra fosforylace substrátu Kemptide byla vyhodnocena dle kapitoly 3.4.2. a stejně byly vyhodnoceny i další reakční směsi.

V MALDI-Orbitrap hmotnostních spektrech (Obr. 15) lze vidět, že po 1 hodině proběhla fosforylace z necelých 50 %. Jsou zde vidět 2 píky, kdy první pík odpovídá fosforylaci v přítomnosti ATP a druhý v přítomnosti ATP-S. Intenzita fosforylovaného Kemptide se po 3 hodinách zdvojnásobila a dále už nedošlo k výraznému navýšení fosforylovaného Kemptide.

Na Obr. 16 v MALDI-Orbitrap hmotnostních spektrech je vidět téměř nulovou intenzitu biotin-Kemptide, neboť došlo k fosforylaci z téměř 100 % už po 1 hodině reakce.

Z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter (Obr. 17) lze vyčíst, že po 1 hodině proběhla fosforylace z celé poloviny. Byly pozorovány dva píky, kdy první pík patří fosforylaci v přítomnosti ATP a druhý v přítomnosti ATP-S. Intenzita fosforylovaného biotin-Kemptide se zdvojnásobila po 3 hodinách a dále už nedošlo k výraznému nárůstu.



Graf 1 Porovnání míry fosforylace K/BK solubilní PKA v prostředí ATP/ATP-S

Z grafu 1 je patrné, že v případě fosforylace Kemptide (97.1%) či biotin-Kemptide (94.8%) s ATP je míra fosforylace téměř 100 % po 1 hodině reakce a dále už nedochází k významnému zvyšování (u fosforylace Kemptide 97.3% a 96.9%, biotin-Kemptide 95.8% a 96.3%). Při fosforylaci Kemptide (44.5%) a biotin-Kemptide (46.9%) v přítomnosti ATP-S je vidět dvojnásobný nárůst míry fosforylace po 3 hodinách (pro fosforylaci Kemptide 79.9%, biotin-Kemptide 78.1%) oproti 1 hodině. Po 20 h inkubace už nedochází k žádnému výraznému zvýšení míry fosforylace (u fosforylace Kemptide 81.3%, biotin-Kemptide 82.6%).

Byla potvrzena schopnost solubilní PKA fosforylovat vybrané substráty. Pro další experimenty byla doba fosforylace minimálně 3 hodiny. Pro elektrochemickou detekci byla použita reakční směs biotin-Kemptide a ATP-S, kde nejvyšší míra fosforylace dosáhla po 3 hodinách 78.1 %.

## 4.2 Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice

Jedním z dalších cílů bylo porovnat aktivitu solubilní a imobilizované PKA. Imobilizace enzymu na pevnou fázi zaručuje dobrou katalytickou aktivitu a umožňuje opakované použití enzymu. Tím se výrazně sníží náklady na analýzu oproti použití solubilního enzymu v roztoku.

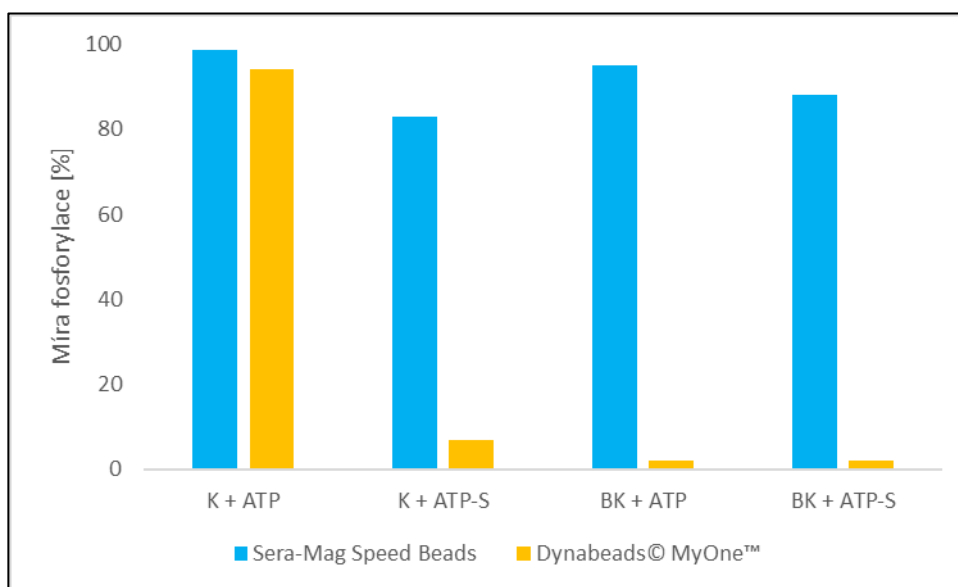
PKA kináza byla imobilizována na magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami kovalentní vazbou. Byla použita dvoukroková karbodiimidová metoda, kdy jsou karboxylové skupiny aktivovány pomocí N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDAC) a sulfo-hydroxysulfosukcinimidu (sulfo-NHS) a následně dochází k reakci s aminoskupinami enzymu. S použitím sulfo-NHS je průběh reakce mírnější, nevznikají nežádoucí meziproducty a vzniklý produkt je stabilní [126].

Aktivita enzymu po imobilizaci byla ověřena pomocí MS analýzy.

#### 4.2.1 Vytipování vhodných magnetických částic pro imobilizaci proteinkinázy A

Pro imobilizaci PKA byly použity dva typy magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou. Byly použity magnetické částice Sera-Mag Speed Beads o průměru 0.816  $\mu\text{m}$  a magnetické částice Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup> o průměru 1  $\mu\text{m}$ . Pro imobilizaci bylo použito 3 a 6  $\mu\text{g}$  PKA na 1.2 mg magnetických částic. Použití 6  $\mu\text{g}$  PKA pro imobilizaci bylo vhodnější a dál bylo používáno toto množství.

Pro ověření aktivity enzymu po imobilizaci bylo použito 0.3 mg magnetických částic, což odpovídalo 1.5  $\mu\text{g}$  PKA. Imobilizace byla provedena podle kapitoly 3.2 a fosforylační reakce podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Úspěšnost imobilizace a aktivita imobilizované PKA byla ověřena MALDI-Orbitrap MS stanovením míry fosforylace substrátů Kemptide a biotin-Kemptide v přítomnosti ATP a ATP-S podle kapitoly 3.4.2.



Graf 2 Porovnání míry fosforylace K a BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP nebo ATP-S. Magnetické částice Sera-Mag Speed Beads a Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup>, E/S = 1.5/10  $\mu\text{g}$ , koncentrace ATP a ATP-S 0.5 mM, 5 hodinová inkubace, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

Z grafu 2 je vidět, že fosforylace v přítomnosti ATP imobilizovanou PKA na Sera-Mag Speed Beads částicích neklesá pod 90 %. Pro substrát Kemptide byla míra fosforylace 98 % a pro biotin-Kemptide 95 %. Fosforylace substrátu Kemptide s použitím PKA imobilizované na Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup> částicích dosáhla podobné hodnoty jako s použitím Sera-Mag Speed Beads (94 %), ale u biotin-Kemptide došlo k výraznému snížení míry fosforylace (2 %). Fosforylace v přítomnosti ATP-S s použitím Sera-Mag Speed Beads neklesla pod 80 % (83% míra fosforylace pro Kemptide, 88% pro biotin-Kemptide), zatímco u použití Dynabeads<sup>®</sup>

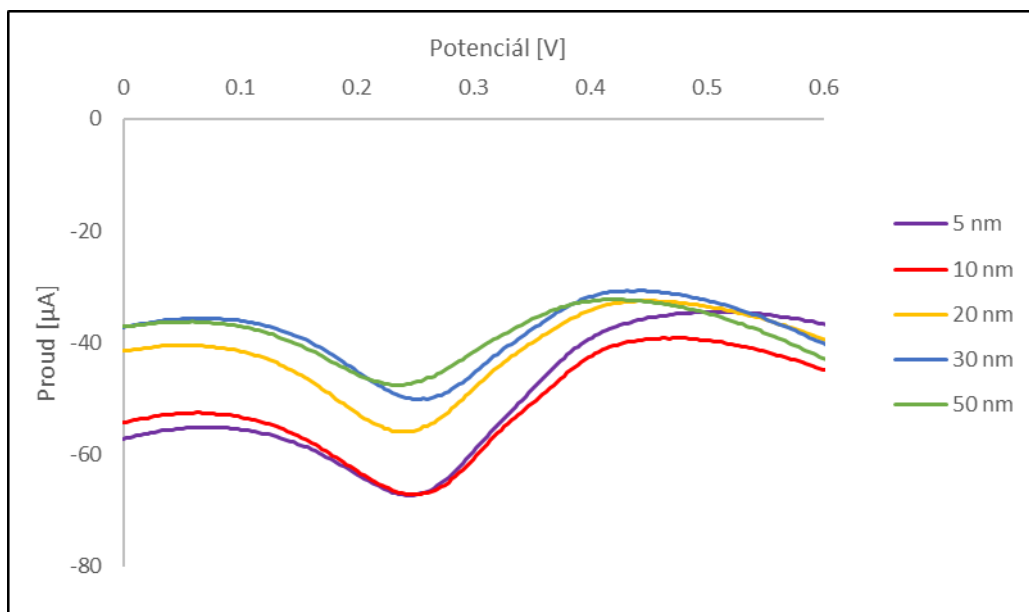
MyOne™ byla míra fosforylace téměř nulová (7% míra fosforylace pro Kemptide a 2% pro biotin-Kemptide). Zajímala nás především míra fosforylace biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S. Pro imobilizaci enzymu byly zvoleny magnetické částice Sera-Mag Speed Beads s velmi vysokým procentem fosforylovaného biotinylovaného substrátu.

### **4.3 Stanovení aktivity proteinkinázy A elektrochemicky square-wave voltmetrií**

#### **4.3.1 Výběr vhodných elektroaktivních nanočástic**

Pro elektrochemickou detekci byly použity nanočástice koloidního zlata (AuNPs), které mají schopnost spontánní vazby na -SH skupiny, které byly přítomné na molekule substrátu po fosforylaci PKA v přítomnosti ATP-S. Nejprve byly testovány AuNPs různých velikostí, konkrétně 5, 10, 20, 30 a 50 nm. Jako detekční metoda byla použita square-wave katodická rozpouštěcí voltmetrie, pomocí které je monitorována proudová odezva při oxidačním potenciálu Au(III) po reakci AuNPs v kyselém prostředí 0.1 M HCl. Pro měření byly využity tištěné tříelektrodové senzory. Byly testovány tři typy elektrod: OrionHT (Orion, High Technologies S. L., Španělsko) s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou, DRP-C110 (DropSens Metrohm, Švýcarsko) s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou, a DRP-110STR (DropSens Metrohm, Švýcarsko) s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou. Elektrody s pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem byly použity z důvodu nezbytné izolace fosforylovaného biotinylovaného substrátu pomocí vazby streptavidin-biotin.

Vlastní měření bylo provedeno dle kapitoly 3.5.2. Proudová odezva byla vždy odečítána v maximu píku a to bylo při hodnotách potenciálu okolo + 0.24 V, který odpovídá proudové odezvě Au(III). Nejvyšší proudová odezva na OrionHT elektrodách byla zaznamenána pro AuNPs o velikosti 5 nm a 10 nm. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 18. Jednotlivé proudové odezvy AuNPs různých velikostí jsou zobrazeny v Tabulce 4.

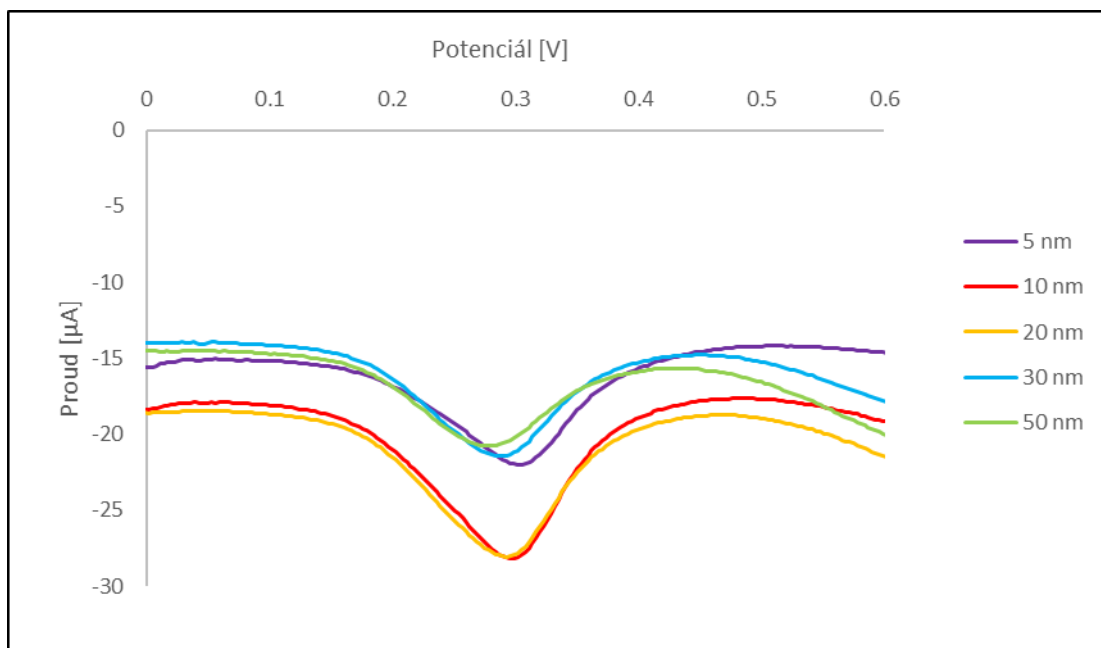


Obr. 18 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na OrionHT elektrodách

Tabulka 4 Proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na OrionHT elektrodách

Velikost AuNPs [nm]	Proud [µA]
5	-21.27
10	-21.14
20	-19.19
30	-17.02
50	-13.21

Nejvyšší proudovou odezvu na DropSens Metrohm DRP-c110 elektrodách měly AuNPs o velikosti 10 nm a 20 nm. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 19. Jednotlivé proudové odezvy AuNPs různých velikostí jsou zobrazeny v Tabulce 5.

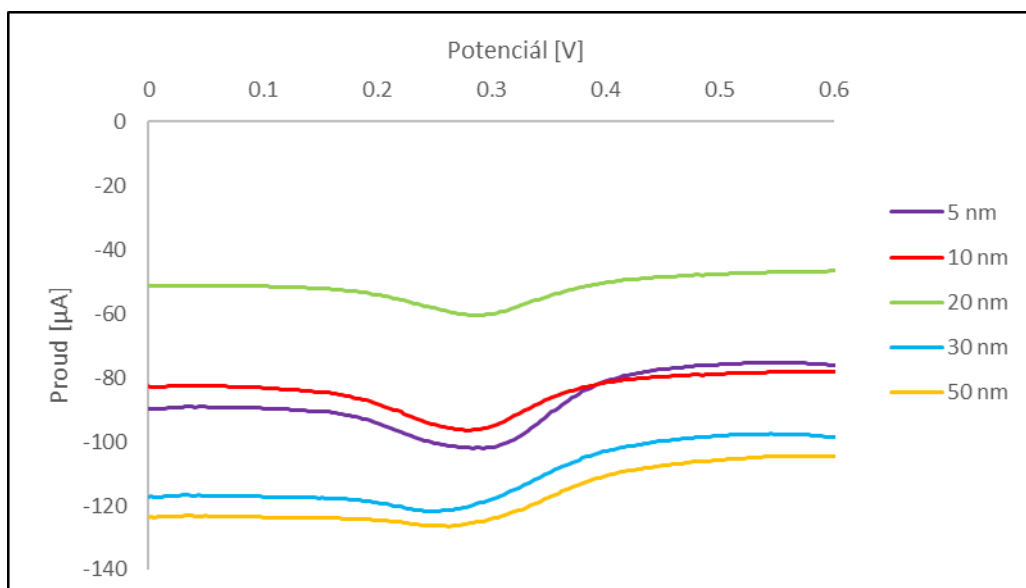


Obr. 19 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-c110 elektrodách

Tabulka 5 Proudová odezva AuNPs různých velikostí měřených na DropSens Metrohm DRP-c110 elektrodách

Velikost AuNPs [nm]	Proud [µA]
5	-7.42
10	-10.43
20	-9.42
30	-6.94
50	-5.56

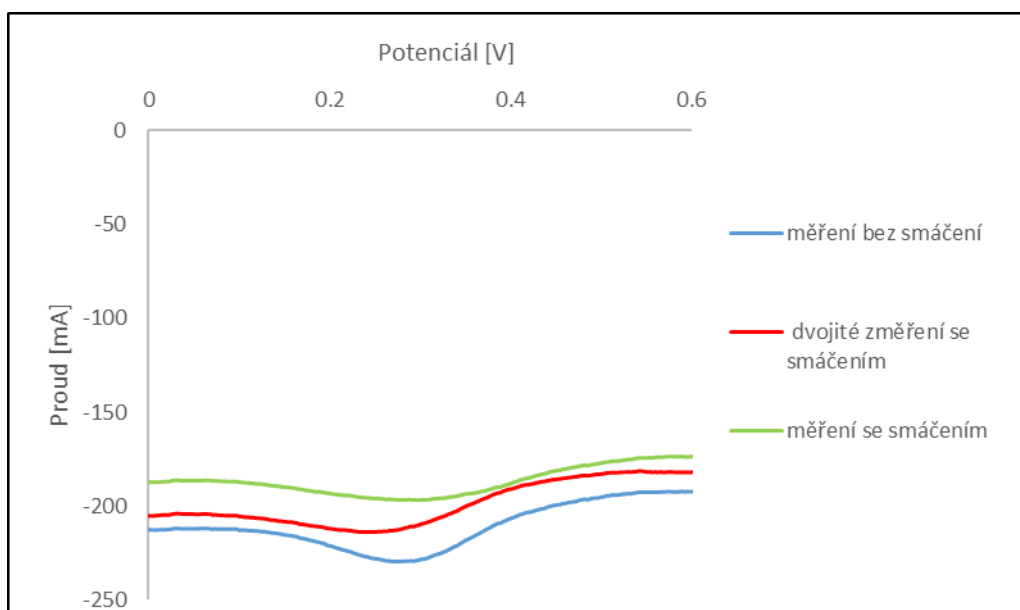
Nejvyšší proudové odezvy na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách měli AuNPs o velikosti 5 nm. Výsledky SWCSV voltamogramů jsou zobrazeny na Obr. 20. Jednotlivé proudové odezvy AuNPs různých velikostí jsou zobrazeny v Tabulce 6.



Obr. 20 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách

Tabulka 6 Proudová odezva AuNPs různých velikostí měřených na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách

Velikost AuNPs [nm]	Proud [ $\mu$ A]
5	-0.02
10	-0.02
20	-0.01
30	-0.01
50	-0.01



Obr. 21 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs různých velikostí na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách s různými způsoby měření

Tabulka 7 Proudové odezvy AuNPs o velikosti 10 nm, měřených na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách, s různými postupy měření

Typ měření na elektrodách	Proud [ $\mu$ A]
Měření bez smáčení	-0.03
Měření se smáčením	-0.02
Dvojité změření se smáčením	-0.02

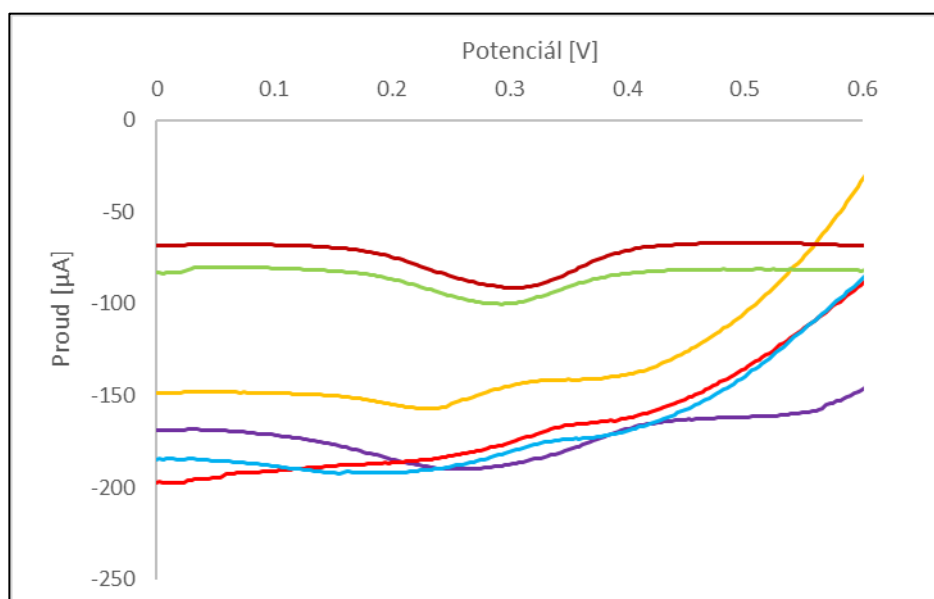
Měření na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách bylo provedeno různými způsoby, aby se zjistilo, jaký způsob poskytuje nejvyšší proudovou odezvu. Bylo vyzkoušeno měření fosforylovaného substrátu bez smáčení elektrod, se smáčením elektrody PBS pufrem, pH 7.4 a se smáčením elektrody PBS pufrem, pH 7.4, kdy se analýza pustila 2x za sebou (Obr. 21). Jednotlivé proudové odezvy jsou zaznamenány v Tabulce 7. V dalších experimentech bylo použito měření bez smáčení na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách, kde bylo dosaženo nejvyšší proudové odezvy.

Přestože mají DropSens Metrohm DRP-110STR elektrody velmi nízkou proudovou odezvu, byly použity v dalších experimentech z důvodu vycytání biotinylovaného substrátu po



fosforylaci, protože bylo nezbytné oddělit nenavázané AuNPs, které by interferovaly při měření. Pro měření, kde nebylo nutné oddělení nezreagovaných složek, byly vhodné OrionHT uhlíkové elektrody, neboť u jejich měření byly zaznamenány vyšší hodnoty proudové odezvy. Pro další experimenty pak byly jako nejvhodnější zvoleny AuNPs o velikosti 10 nm.

Byla ověřena reprodukovatelnost měření na streptavidinem modifikovaných elektrodách. AuNPs, o velikosti 10 nm, byly proměřeny na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách různých šarží podle kapitoly 3.5.2.



Obr. 22 SWCSV voltamogram analýzy AuNPs o velikosti 10 nm na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách různých šarží

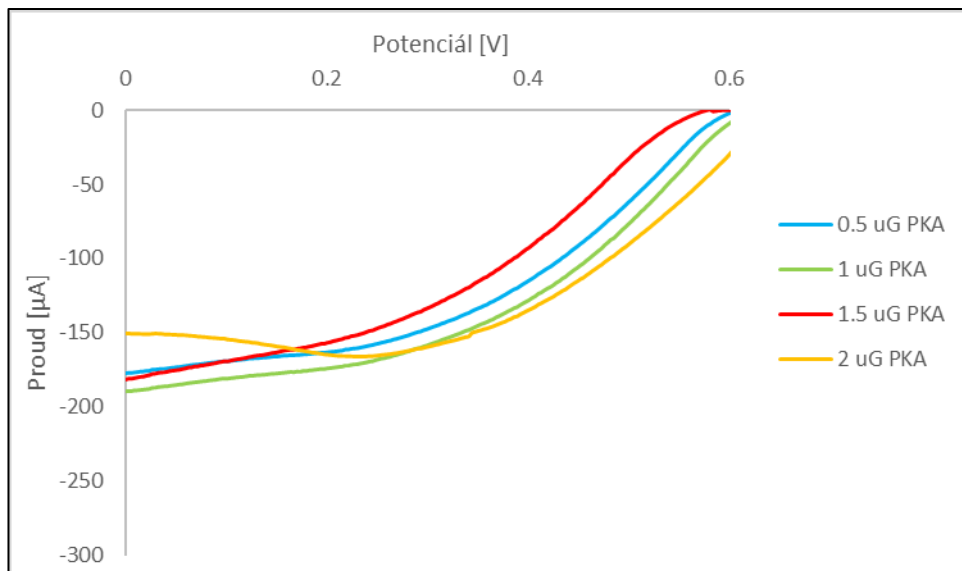
Voltamogramy AuNPs jsou zobrazeny na Obr. 22. Jednotlivé křivky se liší mezi šaržemi i mezi sebou. Použití tištěných elektrod s pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem není reprodukovatelné pro elektrochemickou detekci PKA. I tak byly elektrody DropSens Metrohm DRP-110STR použity pro měření aktivity PKA a bylo hledáno další možné řešení pro oddělení nezreagovaných AuNPs.

#### **4.4 Detekce aktivity imobilizované proteinkinázy A pomocí fosforylovaného peptidového substrátu**

##### **4.4.1 Detekce aktivity proteinkinázy A na tištěných elektrodách s pracovní uhlíkovou elektrodou modifikovanou streptavidinem**

Bylo potřeba zjistit, zda streptavidinem modifikovaná pracovní elektroda vycytává biotinylovaný substrát interakcí biotin-streptavidin. K fosforylaci substrátu biotin-Kemptide byly použity různé koncentrace imobilizované PKA, aby bylo potvrzeno, zda se zvyšující se koncentrací enzymu, dochází ke zvýšení signálu. Množství substrátu biotin-Kemptide (10 µg)

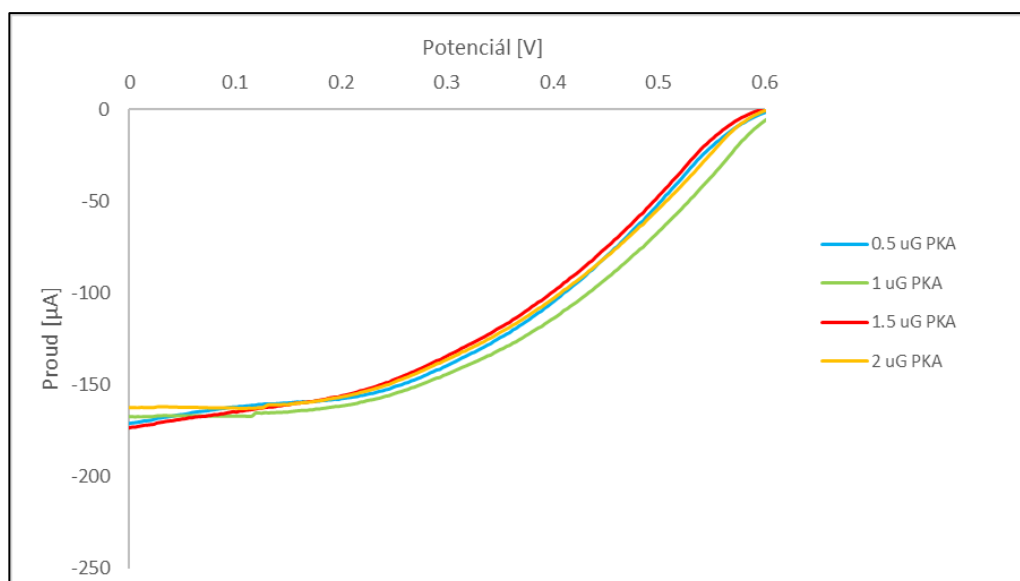
bylo neměnné. Do reakce bylo bráno různé množství magnetických částic, a to takové, aby odpovídalo 0.5, 1, 1.5 a 2  $\mu\text{g}$  imobilizované PKA. Fosforylace byla provedena podle kapitoly 3.3.2 s použitím substrátu biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S s inkubační dobou 5 hodin. Měření proběhlo podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.3.



Obr. 23 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S. Měřeno na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách bez smáčení,  $E/S = 0.5-2/10 \mu\text{g}$ , koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (10  $\mu\text{l}$ ), doba fosforylace 5 hodin

Z Obr. 23 je patrné, že u žádné koncentrace PKA nebylo možné odečíst výšku píku AuNPs. Důvodem by mohlo být, že nedošlo k zachycení nafosforylovaného substrátu interakcí biotin-streptavidin nebo nedošlo k vazbě dostatečného množství AuNPs.

Proto byl proveden experiment s dvojnásobným množstvím AuNPs. Ostatní podmínky fosforylační reakce zůstaly zachovány.

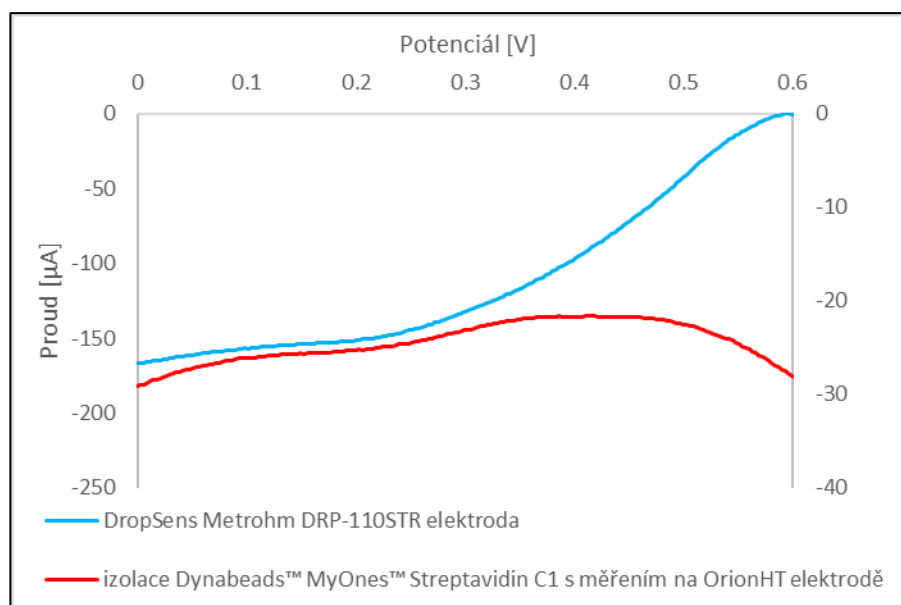


Obr. 24 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S se zvýšeným množstvím AuNPs. Měřeno na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách bez smáčení, E/S = 0.5-2/10 µg, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20 µl), doba fosforylace 5 hodin

Ani v tomto experimentu však nebyl detegován pík odpovídající Au(III) (Obr. 24).

Vzhledem k první možnosti, tedy že nedošlo k vyvázání nafosforylovaného biotinylovaného substrátu na elektrodu modifikovanou streptavidinem, byl proveden experiment, kdy byl po neúspěšném měření z elektrody odebrán roztok a byl přidán ke komerčním magnetickým částicím modifikovaným streptavidinem (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1).

Bylo odebráno množství magnetických částic, které odpovídalo 2 µg imobilizované PKA a fosforylace dále probíhala podle kapitoly 3.3.2 s použitím substrátu biotin-Kemptide a ATP-S a inkubační dobou 3 h. Měření na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách bylo provedeno dle postupu v kapitole 3.5.3. Měření s použitím izolace fosforylovaného substrátu magnetickými částicemi Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 bylo provedeno podle postupu v kapitole 3.5.4.

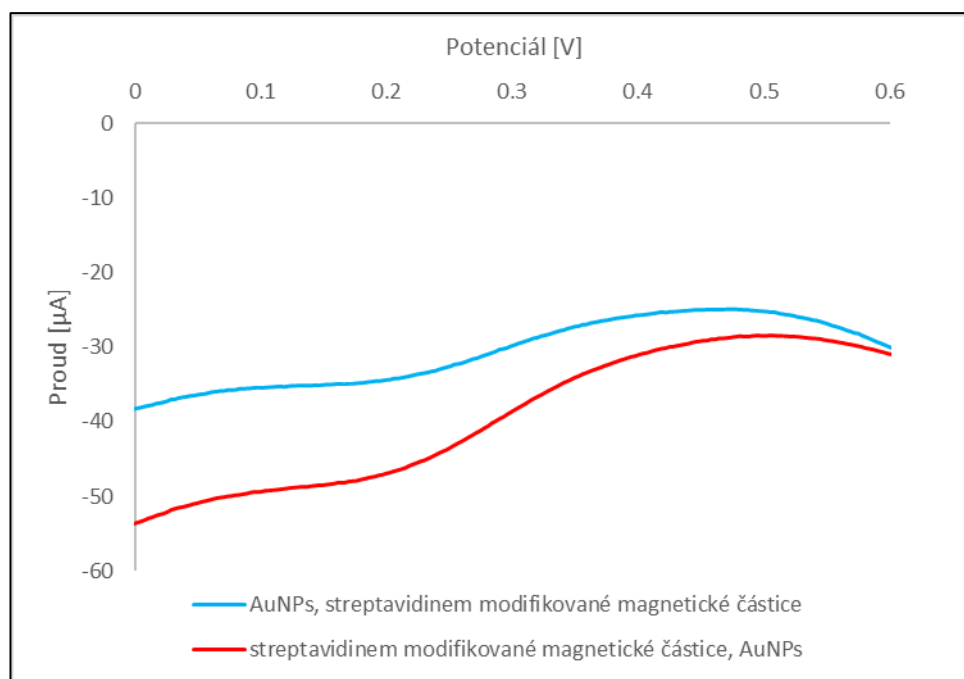


Obr. 25 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S s izolací pomocí streptavidinové modifikované elektrody nebo magnetických částic modifikovaných streptavidinem. Měřeno na DropSens Metrohm DRP-110STR elektrodách bez smáčení (hlavní osa) a na OrionHT elektrodách po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částic (vedlejší osa),  $E/S = 0.5-2/10 \mu\text{g}$ , koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20  $\mu\text{l}$ ), doba fosforylace 3 hodin

Z Obr. 25 je vidět, že u měření fosforylovaného biotinylovaného substrátu na streptavidinovaných elektrodách nebyl získán žádný signál Au(III). Po změření podílu izolovaného na magnetických částicích potažených streptavidinem, byl získán obtížně viditelný pík, který bylo možné odečíst. Proudová odezva byla  $-0.992 \mu\text{A}$ . Díky tomuto bylo ověřeno, že substrát biotin-Kemptide se na elektrody potažené streptavidinem neváže, neboť po inkubaci s magnetickými částicemi potaženými streptavidinem byla proudová odezva naměřena. Použití DropSens Metrohm DRP-110STR pro měření biotinylovaného na fosforylovaného substrátu není vhodné. V dalších experimentech byly používány k vychytání biotinylovaného na fosforylovaného substrátu magnetické částice Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1.

#### 4.4.2 Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu s izolací pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem

Byly zkoušeny dva postupy izolace fosforylovaného biotinylovaného substrátu pomocí streptavidinovaných magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Fosforylační reakce byla provedena dle postupu v kapitole 3.3.2 s použitím substrátu biotin-Kemptide a ATP-S s dobou fosforylace 3 hodiny. Bylo použito takové množství magnetických částic, které odpovídalo 2  $\mu\text{g}$  imobilizované PKA. Pro měření na fosforylovaného peptidového substrátu byly použity OrionHT uhlíkové elektrody, měření probíhalo podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.4.



Obr. 26 SWCSV voltamogram analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S s izolací na magnetických částicích modifikovaných streptavidinem dvěma způsoby. Měřeno na OrionHT elektrodách, E/S = 2/10 µg po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částicích provedenou dvěma způsoby, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20 µl), doba fosforylace 3 hodin

Pro vychytání fosforylovaného substrátu biotin-Kemptide bylo použito 0.3 mg magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Kapacita 1 mg magnetických částic je vazba 400 pmol peptidu. Byl předpoklad, že při 100% fosforylaci by vzniklo 100 pmol fosforylovaného substrátu biotin-Kemptide. Stačilo by tedy 0.25 mg magnetických částic, ale bylo počítáno s rezervou.

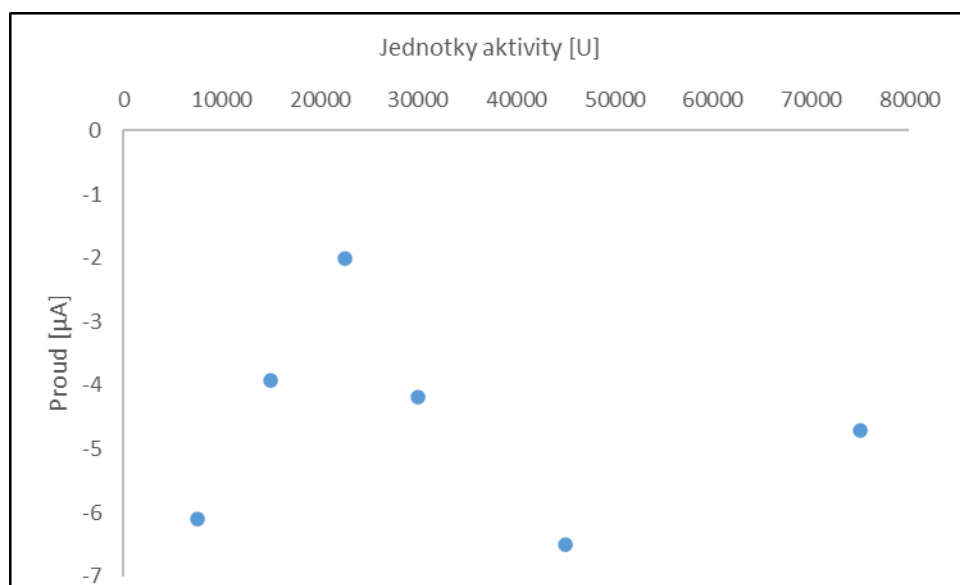
V prvním postupu došlo nejdříve k vazbě AuNPs na nafosforylovaný biotinylovaný substrát a následně k izolaci pomocí magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1.

Ve druhém postupu se nejdříve prostřednictvím vazby biotin-streptavidin navázal fosforylovaný biotinylovaný substrát na magnetické částice Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Pomocí 0.1 M HCl byla vazba biotin-streptavidin rozrušena a následovala detekce obsažených AuNPs.

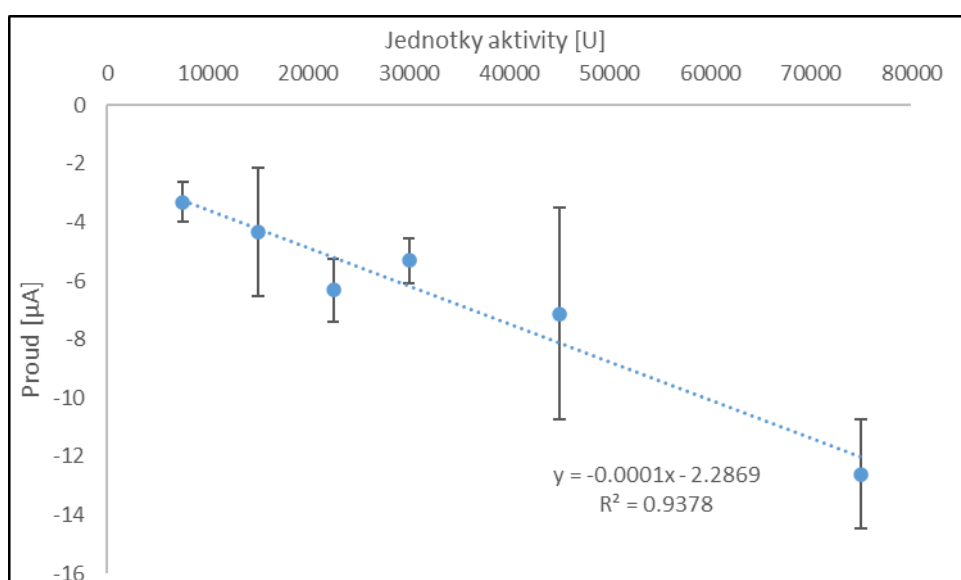
Na Obr. 26 jsou vidět proudové odezvy obou postupů izolace. U prvního postupu byla detekována proudová odezva s hodnotou -2.250 µA. U druhého postupu byla detekována vyšší hodnota proudové odezvy a to -3.252 µA. V dalších experimentech byl používán druhý postup izolace fosforylovaného substrátu biotin-Kemptide pomocí magnetických částic potažených streptavidinem.

### 4.4.3 Kalibrační závislost solubilní proteinkinázy A pomocí elektrochemické detekce

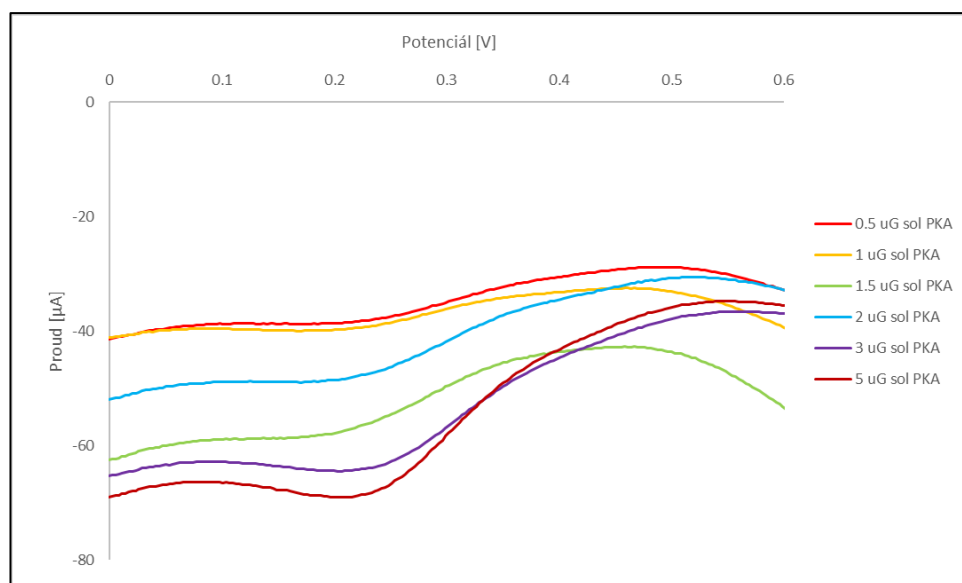
Pro přesné stanovení aktivity PKA po imobilizaci na magnetické částice, byla změřena kalibrační řada solubilní PKA a sestavena kalibrační závislost proudové odezvy na jednotkách aktivity PKA. Fosforylační reakce byla provedena dle postupu v kapitole 3.3.3 s použitím substrátu biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S s dobou fosforylace 3 hodiny a její následné měření proběhlo dle kapitoly 3.5.4.



Graf 3 Kalibrační závislost solubilní PKA v rozmezí 7 500 - 75 000 U, měření fosforylovaného substrátu BK (10 µg) po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částicích na OrionHT elektrodách, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20 µl), doba fosforylace 3 hodin



Graf 4 Kalibrační závislost solubilní PKA v rozmezí 7 500 - 75 000 U, měření fosforylovaného substrátu BK (10 µg) po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částicích na OrionHT elektrodách, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20 µl), doba fosforylace 3 hodin, měření provedeno 3x



Obr. 27 Vybrané SWCSV voltamogramy analýzy fosforylovaného substrátu BK imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S z kalibrační závislosti. Měřeno na OrionHT elektrodách po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částicích, E/S = 0.5-5/10 µg, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20 µl), doba fosforylace 3 hodin

V grafu 3 je zaznamenáno první měření kalibrační závislosti proudové odezvy na aktivitě solubilní PKA. Hodnota spolehlivosti  $R^2$  byla velmi nízká (0.0218). Z toho důvodu byl zařazen výběr elektrod, který spočíval ve výběru elektrod na základě elektrochemického přečištění. Sledovala se shodnost základních linií. Při dalších experimentech bylo vždy využito výběru elektrod při elektrochemickém přečištění. Graf 4 zobrazuje kalibrační závislost proudové odezvy na aktivitě solubilní PKA s výběrem elektrod při pretreatmentu. Vybrané SWCSV voltamogramy jsou zobrazené na Obr. 27. Hodnota spolehlivosti  $R^2$  byla 0.9378. Tato hodnota spolehlivosti  $R^2$  už byla vhodná pro výpočet přesného aktivity imobilizované PKA.

#### 4.4.4 Stanovení přesné aktivity imobilizované proteinkinázy A elektrochemicky

Bylo potřeba zjistit, zda naměřená aktivita imobilizované PKA vykazuje stejnou aktivitu jako solubilní PKA. Stanovení přesné aktivity PKA po imobilizaci na magnetické částice bylo pomocí rovnice přímky kalibrační závislosti proudové odezvy na aktivitě solubilní PKA (Graf 4).

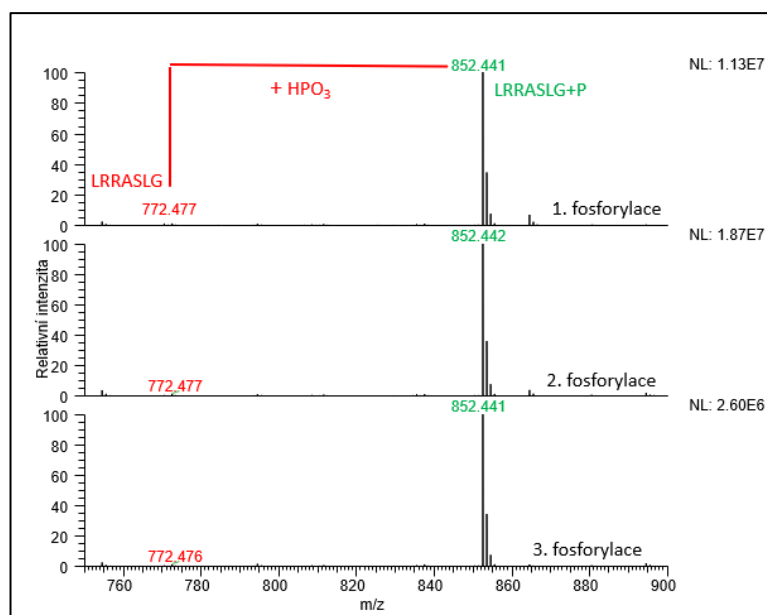
Reakční směs byla vytvořena dle kapitoly 3.3.2 s použitím podílu magnetických částic odpovídajících 1.5 µg imobilizované PKA, substrátu biotin-Kemptide a ATP-S se 3 hodinovou inkubační dobou. Výsledný fosforylovaný supernatant byl měřen dle kapitoly 3.5.4. Průměrná proudová odezva fosforylovaného vzorku ze 2 měření byla naměřena -5.0965 µA.

Po dosažení hodnoty proudové odezvy do rovnice přímky kalibrace, byla vypočtena přesná aktivita navázané PKA. Přesná koncentrace navázané PKA na podílu magnetických částic byla

stanovena na 1.44  $\mu\text{g}$ , což odpovídá 21 600 U. Teoretická hodnota imobilizované PKA na podílu magnetického nosiče byla 1.5  $\mu\text{g}$  PKA, odpovídající aktivitě 22 500 U. Rozdíl mezi jednotkami aktivity solubilní a imobilizované PKA jsou 4 %. Naměřená koncentrace souhlasí s teoretickou hodnotou a elektrochemická detekce poskytuje přesné stanovení aktivity PKA.

#### 4.4.5 Měření operační stability imobilizované proteinkinázy A

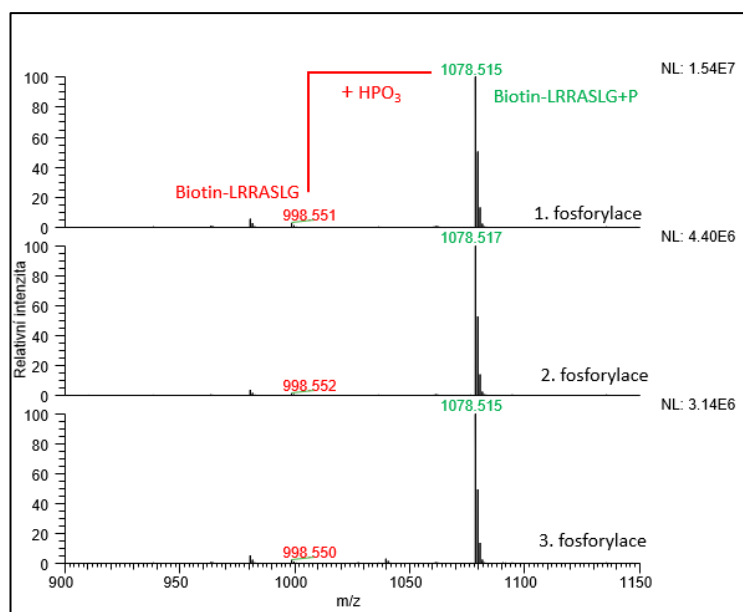
Operační stabilita je zjišťována u imobilizovaných enzymů pro prozkoumání možnosti jejich opakovaného použití. Operační stabilita byla ověřena pomocí stanovení míry fosforylace substrátu Kemptide či biotin-Kemptide s použitím dvou metod ověření - MALDI-Orbitrap MS a SWCSV. Reakce probíhala podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 s použitím magnetických částic obsahujících 1.5  $\mu\text{g}$  imobilizované PKA, substrátu Kemptide nebo biotin-Kemptide v přítomnosti ATP či ATP-S s dobou fosforylace 5 hodin. Byl použit opakovaně jeden podíl magnetických částic s imobilizovanou PKA. Mezi jednotlivými fosforylacemi byly magnetické částice promyty 5x MES pufrem, pH 6.0 a 2x HEPES pufrem, pH 7.2. Vzorky byly před analýzou odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.4.1 a analyzovány MALDI-Orbitrap MS.



Obr. 28 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP ve třech po sobě jdoucích fosforylacích. E/S = 1.5/10  $\mu\text{g}$ , koncentrace ATP 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

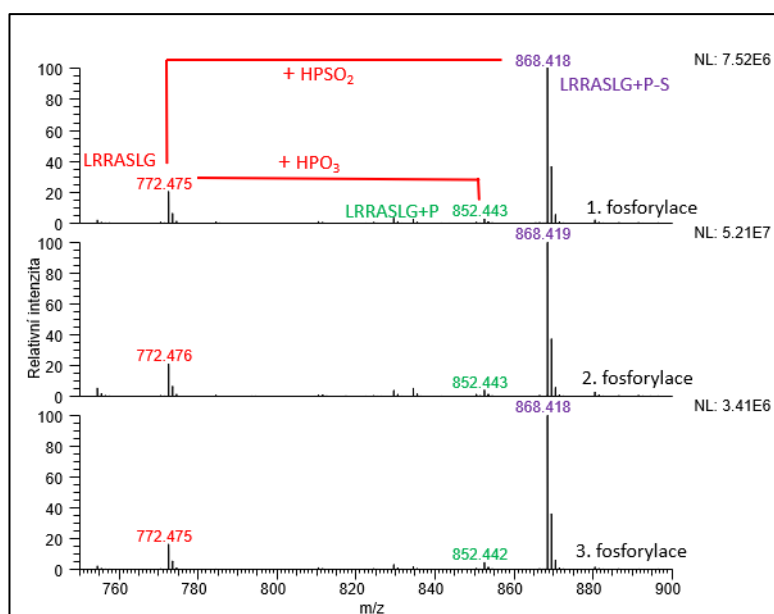
Z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter je vidět, že po první fosforylaci substrátu Kemptide s ATP (Obr. 28) bylo dosaženo 98.82% míry fosforylace a ani po třetí fosforylaci nedošlo k poklesu míry fosforylace pod 90 %.





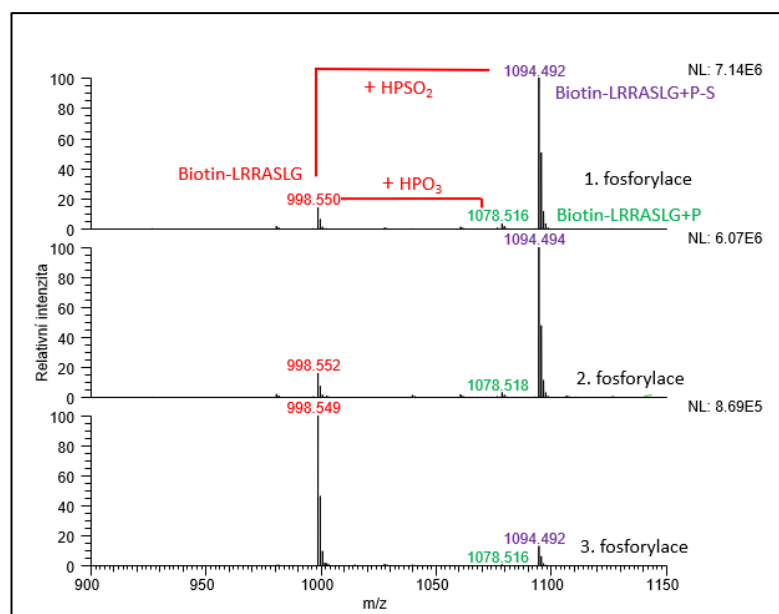
Obr. 29 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP ve třech po sobě jdoucích fosforylacích. E/S = 1.5/10  $\mu$ g, koncentrace ATP 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

Po první fosforylační reakci substrátu biotin-Kemptide s ATP bylo dosaženo 95% míry fosforylace (Obr. 29) a ani po třetí fosforylaci nedošlo k poklesu míry fosforylace pod 90 %.



Obr. 30 Hmotnostní spektra substrátu K fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S ve třech po sobě jdoucích fosforylacích. E/S = 1.5/10  $\mu$ g, koncentrace ATP-S 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

V reakční směsi, kde bylo použito ATP-S, byla míra fosforylace nižší. Po první fosforylaci substrátu Kemptide s ATP-S bylo dosaženo 83 % míry fosforylace (Obr. 30) a ani po třetí fosforylaci nedošlo k poklesu míry fosforylace pod 80 %.



Obr. 31 Hmotnostní spektra substrátu BK fosforylovaného imobilizovanou PKA v přítomnosti ATP-S ve třech po sobě jdoucích fosforylacích. E/S = 1.5/10  $\mu$ g, koncentrace ATP-S 0.5 mM, matrice DHB, MALDI-Orbitrap MS

U fosforylace substrátu biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S bylo dosaženo 88% míry fosforylace po první fosforylační reakci (Obr. 31) a ani po druhé fosforylaci se míra fosforylace výrazně nesnížila. Po třetí fosforylační reakci ale byla zaznamenána pouze 12% účinnost fosforylace.

Elektrochemická detekce proběhla dle postupu v kapitole 3.5.4. pomocí izolace Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částic s následným měření na OrionHT elektrodách..



Graf 5 Závislost proudové odezvy fosforylovaného substrátu BK v přítomnosti ATP-S na aktivitě imobilizované PKA. PKA použita z jednoho podílu částic, měření provedeno na OrionHT elektrodách po předchozí izolaci na Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 částicích, E/S = 1.5/10  $\mu$ g, koncentrace ATP-S 0.5 mM, AuNPs 10 nm (20  $\mu$ l), doba fosforylace 3 hodin, dublet

Z grafu 5 je patrné, že se stoupajícím počtem fosforylačních reakcí klesala aktivita PKA a tím i množství fosforylového biotin-Kemptide. Avšak do 3. fosforylace si PKA zachovává více než 50% aktivitu. Imobilizovanou PKA lze pro fosforylační reakce použít opakovaně, nejlépe do 3. opakování. Výsledky poskytnuté elektrochemickým stanovením korespondují s výsledky dosaženými pomocí MS.

## 5 ZÁVĚR

Byla ověřena schopnost komerčního enzymu proteinkinázy A fosforylovat vybraný peptidový substrát. Pro ověření byla využita metoda MALDI-Orbitrap MS.

Proteinkináza A byla imobilizována na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads a Dynabeads<sup>©</sup> MyOne<sup>™</sup> pomocí dvoukrokové karbodiimidové metody s využitím EDAC a sulfo-NHS. Jako vhodné byly pro další experimenty zvoleny magnetické částice Sera-Mag Speed Beads z důvodu vyšší aktivity imobilizované PKA potvrzené pomocí MALDI-Orbitrap MS.

Pro zavedení metody elektrochemické detekce byly vybrány zlaté nanočástice jako elektroaktivní částice poskytující výsledný signál pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie. Byly testovány částice různých velikostí. Pro měření byly testovány tři typy tištěných tříelektrodových senzorů, konkrétně uhlíkové OrionHT a DropSens Metrohm DRP-c110 elektrody a DropSens Metrohm DRP-110STR elektrody s pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem. Streptavidinem modifikované elektrody byly použity z důvodu vychytání fosforylovaného biotinylovaného substrátu interakcí biotin-streptavidin. Vzhledem k nízké reprodukovatelnosti streptavidinem modifikovaných elektrod a neúčinnosti zachytu biotinylovaného substrátu, byla hledána alternativa, kterou byly streptavidinem modifikované magnetické částice Dynabeads<sup>™</sup> MyOne<sup>™</sup> Streptavidin C1.

Po zavedení metody elektrochemické detekce byla změřena kalibrační řada solubilní PKA, pomocí které bylo kvantifikováno množství imobilizované PKA. Byla ověřena operační stabilita imobilizované PKA a to jak pomocí MALDI-Orbitrap MS, tak i nově zavedené metody elektrochemické detekce. Obě metody potvrdily použití imobilizované PKA opakovaně, nejlépe do 3. fosforylace, kde si zachovává více než 50% aktivitu.

Podářilo se zavést metodu pro elektrochemické stanovení aktivity PKA, která umožní ověření aktivity imobilizované PKA. V dalších experimentech budou ověřeny kinetické parametry imobilizované PKA, což umožní charakterizaci enzymu a pomocí MS to nebylo možné.

## 6 ZDROJE

- [1] HEBERT-CHATELAIN, E. Src kinases are important regulators of mitochondrial functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013, **45**(1), Directed Issue: Bioenergetic Dysfunction, Adaptation and Therapy, 90–98. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2012.08.014
- [2] SUGIYAMA, Y. a UEZATO, Y. Analysis of protein kinases by Phos-tag SDS-PAGE. *Journal of Proteomics*. 2022, **255**, 104485. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2022.104485
- [3] NIINAE, T., IMAMI, K., SUGIYAMA, N. a ISHIHAMA Y. Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2021, **20**, 100119. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcpro.2021.100119
- [4] SLOVAKOVA, M. a BILKOVA, Z. Contemporary Enzyme-Based Methods for Recombinant Proteins In Vitro Phosphorylation. *Catalysts*. 2021, **11**(8), 1007. Dostupné z: doi:10.3390/catal11081007
- [5] VARJOSALO, M., KESKITALO, S., VAN DROGEN, A., NURKKALA, H., VICHALKOVSKI, A., AEBERSOLD, R. a GSTAIGER, M. The Protein Interaction Landscape of the Human CMGC Kinase Group. *Cell Reports*. 2013, **3**(4), 1306–1320. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2013.03.027
- [6] STACHYRA, A., GRZELAK, S., BASAŁAJ, K., ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A. a BIEŃ-KALINOWSKA, J. Immunization with a Recombinant Protein of *Trichinella britovi* 14-3-3 Triggers an Immune Response but No Protection in Mice. *Vaccines*. 2020, **8**(3), 515. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines8030515
- [7] NORAIS, N., HALL, J., GROSS, L., TANG, D., KAUR, S., CHAMBERLAIN, H., BURKE, R. a MARCUS, F. Evidence for a phosphorylation site in cytomegalovirus glycoprotein gB. *Journal of Virology*. 1996, **70**(8), 5716–5719. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.70.8.5716-5719.1996
- [8] FAUVEL, B. a YASRI A. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: Current and future strategies to fight cancer. *mAbs*. 2014, **6**(4), 838–851. Dostupné z: doi:10.4161/mabs.29089
- [9] HU, N., LI, S. a LIU, Y. Recent Advances in Biocatalysis and Metabolic Engineering. *Catalysts*. 2021, **11**(9), 1052. Dostupné z: doi:10.3390/catal11091052
- [10] VLAHOVIC, G. a CRAWFORD, J. Activation of Tyrosine Kinases in Cancer. *The Oncologist*. 2003, **8**(6), 531–538. Dostupné z: doi:10.1634/theoncologist.8-6-531
- [11] LU, Z. a HUNTER, T. Metabolic Kinases Moonlighting as Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 2018, **43**(4), 301–310. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.01.006
- [12] LAWSON, M., RODRIGO, J., BARATTE, B., ROBERT, T., DELEHOUZÉ, C., LOZACH, O., RUCHAUD, S., BACH, S., BRION, J., ALAMI, M. a HAMZE, A. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of imidazo[1,2-a]pyridines derivatives as protein kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **123**, 105–114. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2016.07.040

- [13] QHOBOSHEANE, A., BETECK, R., BARATTE, B., ROBERT, T., RUCHAUD, S., BACH, S. a LEGOABE, L. Exploration of 7-azaindole-coumaranone hybrids and their analogues as protein kinase inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*. 2021, **343**, 109478. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2021.109478
- [14] ROSKOSKI, R. Hydrophobic and polar interactions of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors with their target enzymes. *Pharmacological Research*. 2021, **169**, 105660. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2021.105660
- [15] Chemical probes targeting the kinase CK2: a journey outside the catalytic box. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2021, **19**(20), 4380–4396. Dostupné z: doi:10.1039/d1ob00257k
- [16] AJADI, A., CISSE, A., AHMAD, S., YIFENG, W., YAZHOU, S., SHUFAN, L., XIXI, L., BELLO, B., TAJO, S., XIAOHONG, T. a JIAN, Z. Protein Phosphorylation and Phosphoproteome: An Overview of Rice. *Rice Science*. 2020, **27**(3), 184–200. Dostupné z: doi:10.1016/j.rsci.2020.04.003
- [17] ZHAO, L., YUAN, X., WANG, J., FENG, Y., JI, F., LI, Z. a BIAN, J. A review on flavones targeting serine/threonine protein kinases for potential anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019, **27**(5), 677–685. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2019.01.027
- [18] ADAMS, J. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chemical Reviews*. 2001, **101**(8), 2271–2290. Dostupné z: doi:10.1021/cr000230w
- [19] ALGANEM, K., HAMOUD, A., CREEDEN, J., HENKEL, N., IMAMI, A., JOYCE, A., RYAN V, W., RETHMAN, J., SHUKLA, R., O'DONOVAN, S., MELLER, J. a MCCULLUMSMITH, R. The active kinome: The modern view of how active protein kinase networks fit in biological research. *Current Opinion in Pharmacology*. 2022, **62**, 117–129. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2021.11.007
- [20] JOHNSON, S. a HUNTER, T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods*. 2005, **2**(1), 17–25. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth731
- [21] KINO, T. GR-regulating Serine/Threonine Kinases: New Physiologic and Pathologic Implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2018, **29**(4), 260–270. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2018.01.010
- [22] ELSNER, D., SIESS, K., GOSSENREITER, T., HARTL, M. a LEONARD, T. A ubiquitin-like domain controls protein kinase D dimerization and activation by trans-autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2019, **294**(39), 14422–14441. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA119.008713
- [23] TYAGI, K. a ROY, A. Evaluating the current status of protein kinase C (PKC)-protein kinase D (PKD) signalling axis as a novel therapeutic target in ovarian cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2021, **1875**(1), 188496. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2020.188496
- [24] MIYAZONO, K., DIJKE, P., YAMASHITA, H. a HELDIN, C. Signal transduction via serine/threonine kinase receptors. *Cell Biology*. **1994**(5), 389–398.

- [25] QIAO, K., JIANG, Y., HU, T., LI, S. a GUI, W. Prokaryotic expression of human-sourced and zebrafish-sourced protein kinase A alpha catalytic subunits combined with in vitro and in silico assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021, **228**, 113023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113023
- [26] SHAH, R. a PATEL, K. Rivanol-lactate in the treatment of non-specific diarrhoeas with less than grade II dehydration. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 1976, **24**(2), 95–98. ISSN 0004-5772.
- [27] HALLBERG, D. A survey of possible surgical methods of treating obesity. *Acta Chirurgica Scandinavica. Supplementum*. 1978, **482**, 31–32. ISSN 0301-1860.
- [28] AZULAY, H., STRIEM, E. a AMEDI, A. Negative BOLD in sensory cortices during verbal memory: a component in generating internal representations? *Brain Topography*. 2009, **21**(3–4), 221–231. Dostupné z: doi:10.1007/s10548-009-0089-2
- [29] WALKER, C., WANG, Y., OLIVIERI, C., MANU, V., GAO, J., BERNLOHR, D., CALEBIRO, D., TAYLOR, S. a VEGLIA, G. Is Disrupted Nucleotide-Substrate Cooperativity a Common Trait for Cushing’s Syndrome Driving Mutations of Protein Kinase A? *Journal of Molecular Biology*. 2021, **433**(18), 167123. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2021.167123
- [30] SAITO, D., IMAI, M., HASEGAWA, S., YAMASAKI, M. a TAKAHASHI, N. A splicing factor phosphorylated by protein kinase A is increased in HL60 cells treated with retinoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2022, **1869**(1), 119142. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119142
- [31] ARAUJO, N., BRUIX, M. a LAURENTS, D. Disorder and partial folding in the regulatory subunit hinge region of Trypanosoma brucei protein kinase A: The C-linker portion inhibits the parasite’s protein kinase A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021, **698**, 108731. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2020.108731
- [32] GARCIA-CONCEJO, A. a LARHAMMAR, D. Protein kinase C family evolution in jawed vertebrates. *Developmental Biology*. 2021, **479**, 77–90. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2021.07.013
- [33] KOSTYAK, J., MAURI, B., PATEL, A., DANGELMAIER, C., REDDY, H. a KUNAPULI, S. Phosphorylation of protein kinase Cδ Tyr311 positively regulates thromboxane generation in platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 2021, **296**, 100720. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2021.100720
- [34] GILLES, P., KASHYAP, R., FREITAS, M., CEUSTERS, S., VAN ASCH, K., JANSSENS, A., DE JONGHE, S., PERSOONS, L., COBBAUT, M., DAELEMANS, D., VAN LINT, J., VOET, A. a DE BORGGRAEVE, W. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-based protein kinase D inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, **205**, 112638. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2020.112638
- [35] LAVALLE, C., GEORGE, K., SHARLOW, E., LAZO, J., WIPF, P. a WANG, J. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2010, **1806**(2), 183–192. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2010.05.003

- [36] ZHAO, Y., CAI, L., MIRZA, M., HUANG, X., GEENEN, D., HOFMANN, F., YUAN, J. a ZHAO, Y. Protein Kinase G-I Deficiency Induces Pulmonary Hypertension through Rho A/Rho Kinase Activation. *The American Journal of Pathology*. 2012, **180**(6), 2268–2275. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.016
- [37] VANSCHOUWEN, B., BOULTON, S. a MELACINI, G. Mutual Protein-Ligand Conformational Selection Drives cGMP vs. cAMP Selectivity in Protein Kinase G. *Journal of Molecular Biology*. 2021, **433**(21), 167202. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2021.167202
- [38] HSIEH, L., SU, W., HAN, G. a CARMAN, G. Phosphorylation of Yeast Pahl1 Phosphatidate Phosphatase by Casein Kinase II Regulates Its Function in Lipid Metabolism\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, **291**(19), 9974–9990. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M116.726588
- [39] KORSENSKY, L., CHOREV, D., SALEEM, H., HELLER-JAPHETH, R., RABINOVITZ, S., HAIF, S., DAHAN, N., ZIV, T. a RON, D. Regulation of stability and inhibitory activity of the tumor suppressor SEF through casein-kinase II-mediated phosphorylation. *Cellular Signalling*. 2021, **86**, 110085. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2021.110085
- [40] BARBARA, G. a OLAF-GEORG, I. Protein Kinase CK2 in Human Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2008, **15**(19), 1870–1886.
- [41] SEOK KIM, J., IN EOM, J., CHEONG, J., JIN CHOI, A., KOO LEE, J., ICK YANG, W. a HONG MIN, Y. *Protein Kinase CK2 $\alpha$  as an Unfavorable Prognostic Marker and Novel Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia*. 2007. Dostupné z: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/3/1019>
- [42] O-CHAROENRAT, P., RUSCH, V., TALBOT, S., SARKARIA, I., VIALE, A., SOCCI, N., NGAI, I., RAO, P. a SINGH, B. Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clinical Cancer Research*. 2004, **10**(17), 5792–5803. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0317
- [43] SWCSVELLMEEN, L., SHAHIN, R., AL-HIARI, Y., ALAMIRI, A., HASAN, A. a SHAHEEN, O. Structure based drug design of Pim-1 kinase followed by pharmacophore guided synthesis of quinolone-based inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017, **25**(17), 4855–4875. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2017.07.036
- [44] AMANI, J., GORJIZADEH, N., YOUNESI, S., NAJAFI, M., ASHRAFI, A., IRIAN, S., GORJIZADEH, N. a AZIZIAN, K. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) and the DNA damage response: The link between signaling pathways and cancer. *DNA Repair*. 2021, **102**, 103103. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2021.103103
- [45] SU, S. a TSAI, L. Cyclin-Dependent Kinases in Brain Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011, **27**(1), 465–491. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154023
- [46] DARLING, N. a COOK, S. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell*



- Research*. 2014, **1843**(10), Calcium Signaling in Health and Disease, 2150–2163. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.009
- [47] SINGH, V., SHARMA, B. a CHAWLA, P. Recent developments in mitogen activated protein kinase inhibitors as potential anticancer agents. *Bioorganic Chemistry*. 2021, **114**, 105161. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2021.105161
- [48] GEMBITSKY, D., LAWLOR, K., JACOVINA, A., YANEVA, M. a TEMPST, P. A Prototype Antibody Microarray Platform to Monitor Changes in Protein Tyrosine Phosphorylation\*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004, **3**(11), 1102–1118. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M400075-MCP200
- [49] ANGUITA, E. a VILLALOBO, A. Ca<sup>2+</sup> signaling and Src-kinases-controlled cellular functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2018, **650**, 59–74. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2018.05.005
- [50] SOLOUKI, S., AUGUST, A. a HUANG, W. Non-receptor tyrosine kinase signaling in autoimmunity and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019, **201**, 39–50. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2019.05.008
- [51] LEVITZKI, A. Tyrosine Kinase Inhibitors: Views of Selectivity, Sensitivity, and Clinical Performance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013, **53**(1), 161–185. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140341
- [52] YIN, Y., YUAN, X., GAO, H. a YANG, Q. Nanoformulations of small molecule protein tyrosine kinases inhibitors potentiate targeted cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, **573**, 118785. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118785
- [53] LI, Y., BAO, Y., ZHENG, H., QIN, Y. a HUA, B. The nonreceptor protein tyrosine kinase Src participates in every step of cancer-induced bone pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, **141**, 111822. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111822
- [54] SCHLESSINGER, J. Autoinhibition Control. *Science*. 2003, **300**(5620), 750–752. Dostupné z: doi:10.1126/science.1082024
- [55] ARTEAGA, C. a ENGELMAN, J. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*. 2014, **25**(3), 282–303. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2014.02.025
- [56] LEMMON, M., SCHLESSINGER J a FERGUSON, K.. The EGFR Family: Not So Prototypical Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, **6**(4), a020768–a020768. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a020768
- [57] PAUL, M. a HRISTOVA, K. The RTK Interactome: Overview and Perspective on RTK Heterointeractions. *Chemical Reviews*. 2019, **119**(9), 5881–5921. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00467
- [58] KARL, K., PAUL, M., PASQUALE, E. a HRISTOVA, K. Ligand bias in receptor tyrosine kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, **295**(52), 18494–18507. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.REV120.015190

- [59] PAUL, M., GRUBB, H. a HRISTOVA, K. Quantifying the strength of heterointeractions among receptor tyrosine kinases from different subfamilies: Implications for cell signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, **295**(29), 9917–9933. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA120.013639
- [60] TRENKER, R. a JURA, N. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Current Opinion in Cell Biology*. 2020, **63**, Cell Signalling (2020), 174–185. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2020.01.016
- [61] KARL, K. a HRISTOVA, K. Pondering the mechanism of receptor tyrosine kinase activation: The case for ligand-specific dimer microstate ensembles. *Current Opinion in Structural Biology*. 2021, **71**, Catalysis and Regulation Protein Nucleic Acid Interactions, 193–199. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2021.07.003
- [62] SHEN, C., LI, X., RASOOLY, A., GUO, L., ZHANG, K. a YANG, M. A single electrochemical biosensor for detecting the activity and inhibition of both protein kinase and alkaline phosphatase based on phosphate ions induced deposition of redox precipitates. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, **85**, 220–225. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.05.025
- [63] BAI, J., ZHAO, Y., WANG, Z., LIU, Ch., WANG, Y. a LI, Z. Dual-Readout Fluorescent Assay of Protein Kinase Activity by Use of TiO<sub>2</sub>-Coated Magnetic Microspheres. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(9), 4813–4821. Dostupné z: doi:10.1021/ac400799w
- [64] WANG, Y., ZHANG, L., LIANG, R., BAI, J. a QIU, J. Using Graphene Quantum Dots as Photoluminescent Probes for Protein Kinase Sensing. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(19), 9148–9155. Dostupné z: doi:10.1021/ac401807b
- [65] CHEN, Z., HE, Y., WANG, Y., WANG, K., DU, Y. a YAN, G. Ru(II) encapsulated phosphorylate-terminated silica nanoparticles-based electrochemiluminescent strategy for label-free assay of protein kinase activity and inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, **41**, 519–525. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2012.09.018
- [66] LI, T., LIU, D. a WANG, Z. Microarray-based Raman spectroscopic assay for kinase inhibition by gold nanoparticle probes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, **24**(11), 3335–3339. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2009.04.033
- [67] JI, L., WU, J., LUO, Q., LI, X., ZHENG, W., ZHAI, G., WANG, F., LÜ, S., FENG, Y., LIU, J. a XIONG, S. Quantitative Mass Spectrometry Combined with Separation and Enrichment of Phosphopeptides by Titania Coated Magnetic Mesoporous Silica Microspheres for Screening of Protein Kinase Inhibitors. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**(5), 2284–2291. Dostupné z: doi:10.1021/ac202897u
- [68] LI, T., LIU, X., LIU, D. a WANG, Z. Sensitive Detection of Protein Kinase A Activity in Cell Lysates by Peptide Microarray-Based Assay. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(15), 7033–7037. Dostupné z: doi:10.1021/ac4010502
- [69] ZHOU, Y., WANG, M., YANG, Z., YIN, H. a AI, S. A Phos-tag-based photoelectrochemical biosensor for assay of protein kinase activity and inhibitors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, **206**, 728–734. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2014.09.017

- [70] YIN, H., WANG, M., LI, B., YANG, Z., ZHOU, Y. a AI, S. A sensitive electrochemical biosensor for detection of protein kinase A activity and inhibitors based on Phos-tag and enzymatic signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, **63**, 26–32. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.07.016
- [71] LIU, J., HE, X., WANG, K., WANG, Y., YAN, G. a MAO, Y. Amplified electrochemical detection of protein kinase activity based on gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes nanohybrids. *Talanta*. 2014, **129**, 328–335. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.05.043
- [72] HU, Q., WANG, Q., JIANG, C., ZHANG, J., KONG, J. a ZHANG, X. Electrochemically mediated polymerization for highly sensitive detection of protein kinase activity. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, **110**, 52–57. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.03.030
- [73] XU, R., CHEN, X., CHEN, J., LIANG, R. a QIU, J. Electrochemical assay of protein kinase activity based on the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PNE-Ti<sup>4+</sup> functionalized PDMS microchip. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020, **877**, 114645. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2020.114645
- [74] ZHOU, Y., YIN, H., LI, X., LI, Z., AI, S. a LIN, H. Electrochemical biosensor for protein kinase A activity assay based on gold nanoparticles-carbon nanospheres, phos-tag-biotin and  $\beta$ -galactosidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, **86**, 508–515. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.07.004
- [75] LEE, C., OH, D. a KIM, T. Label-free assay of protein kinase A activity and inhibition in cancer cell using electrochemically-prepared AuNP/rGO nanohybrid electrode modified with C-Kemptide. *Talanta*. 2020, **215**, 120899. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2020.120899
- [76] APPELMANS, O., KASHYAP, R., GILLES, P., DE BORGGRAEVE, W., VOET, A. a VAN LINT, J. LSA-50 paper: An alternative to P81 phosphocellulose paper for radiometric protein kinase assays. *Analytical Biochemistry*. 2021, **630**, 114313. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2021.114313
- [77] ISHIDA, A., KAMESHITA, I., SUEYOSHI, N., TANIGUCHI, T. a SHIGERI, Y. Recent Advances in Technologies for Analyzing Protein Kinases. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007, **103**(1), 5–11. Dostupné z: doi:10.1254/jphs.CP0060026
- [78] GLICKMAN, J. Assay Development for Protein Kinase Enzymes. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91991/>
- [79] LU, G., TAN, P., LEI, Ch., NIE, Z., HUANG, Y. a YAO, S. Fluorescent detection of protein kinase based on positively charged gold nanoparticles. *Talanta*. 2014, **128**, 360–365. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.04.061
- [80] Label-free fluorescence detection of kinase activity using a gold nanoparticle based indicator displacement assay. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015, **13**(4), 1198–1203. Dostupné z: doi:10.1039/c4ob02052a

- [81] WANG, M., WANG, L., LIU, Q. a SU, X. A fluorescence sensor for protein kinase activity detection based on gold nanoparticles/copper nanoclusters system. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, **256**, 691–698. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.09.213
- [82] WANG, L., WANG, M., SHI, F., LIU, Z. a SU, X. Aptamer based fluorescence biosensor for protein kinase activity detection and inhibitor screening. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017, **252**, 209–214. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.06.009
- [83] HUANG, Y., HUANG, H., QIN, J., LIU, X., ZHAO, S., CHEN, Z. a LIANG, H. A graphene oxide-based multiplexed fluorescence assay for the detection of protein kinase activity in cell lysates and the evaluation of protein kinase inhibition. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017, **238**, 908–916. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2016.07.140
- [84] ZHAO, Z., ZHOU, X. a XING, D. Highly sensitive protein kinase activity assay based on electrochemiluminescence nanoprobe. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012, **31**(1), 299–304. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2011.10.035
- [85] WANG, L., SONG, J., WANG, X., QI, H., GAO, Q. a ZHANG, Ch. Monitoring casein kinase II at subcellular level via bio-bar-code-based electrochemiluminescence biosensing method. *Chinese Chemical Letters*. 2020, **31**(9), 2520–2524. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccllet.2020.06.032
- [86] LIANG, R., QIU, W., ZHAO, H., XIANG, C. a QIU, J. Electrochemiluminescence resonance energy transfer between graphene quantum dots and graphene oxide for sensitive protein kinase activity and inhibitor sensing. *Analytica Chimica Acta*. 2016, **904**, 58–64. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.11.034
- [87] LUO, Q., LI, Y., LIANG, R., CAO, S., JIN, H. a QIU, J. Gold nanoclusters enhanced electrochemiluminescence of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> for protein kinase activity analysis and inhibition. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020, **856**, 113706. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2019.113706
- [88] MIN, H., SU, J. a MRKSICH, M. Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2004, **43**(44), 5973–5977. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200461061
- [89] SMITH, W. Mass Spectrometry. In: Jay A. SIEGEL, Pekka J. SAUKKO a Max M. HOUCK, ed. *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*. Waltham: Academic Press, 2013, s. 603–608. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6
- [90] SENGUPTA, P., KHANRA, K., CHOWDHURY, A. a DATTA, P. 4-Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications. In: Kunal PAL, Heinz-Bernhard KRAATZ, Anwasha KHASNOBISH, Sandip BAG, Indranil BANERJEE a Usha KURUGANTI, ed. *Bioelectronics and Medical Devices*. B.m.: Woodhead Publishing, 2019, Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials, s. 47–95. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102420-1.00004-2
- [91] PERREAULT, H. a LATTOVÁ, E.. Mass Spectrometry. In: *Comprehensive Biotechnology*. B.m.: Elsevier, 2011, s. 669–677. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00077-5

- [92] MELLON, F. A. MASS SPECTROMETRY: Principles and Instrumentation. In: Benjamin CABALLERO, ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 2003, s. 3739–3749. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/00746-X
- [93] SONODA, T., SHIGAKI, S., NAGASHIMA, T., OKITSU, O., KITA, Y., MURATA, M. a KATAYAMA, Y. Mass-tag technology for monitoring of protein kinase activity using mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004, **14**(4), 847–850. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2003.12.022
- [94] KINUMI, T., NIKI, E., SHIGERI, Y. a MATSUMOTO, H. Affinity-tagged phosphorylation assay by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (ATPA-MALDI): application to calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Biochemistry*. 2005, **138**(6), 791–796. Dostupné z: doi:10.1093/jb/mvi178
- [95] SYKES, J. a RANKIN, S. Chapter 2 - Immunoassays. In: Jane E. SYKES, ed. *Canine and Feline Infectious Diseases*. Saint Louis: W.B. Saunders, 2014, s. 10–16. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-0795-3.00002-8
- [96] FORRER, P., TAMASKOVIC, R. a JAUSSI, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of JNK, ERK, and p38 kinase activities. *Biological Chemistry*. 1998, **379**(8–9), 1101–1111. Dostupné z: doi:10.1515/bchm.1998.379.8-9.1101
- [97] RIJKSEN, G., ADRIAANSEN-SLOT, S. a STAAL, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of src-family tyrosine kinase activity in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1996, **39**(2), 139–145. Dostupné z: doi:10.1007/BF01806180
- [98] ZHU, X. a SHI, L. Chapter 9 - Electrochemistry. In: Genxi LI, ed. *Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications*. B.m.: Elsevier, 2019, s. 209–236. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815053-5.00009-X
- [99] HUANG, X., ZHU, Y. a KIANFAR, E. Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*. 2021, **12**, 1649–1672. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmrt.2021.03.048
- [100] ZHAO, J. a CHEN, G. Introduction. In: Genxi LI, ed. *Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications*. B.m.: Elsevier, 2019, s. xvii–xlvii. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815053-5.00016-7
- [101] SILVESTRE, C., PINTO, P., SEGUNDO, M., SARAIVA, L. a LIMA, J. Enzyme based assays in a sequential injection format: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011, **689**(2), 160–177. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.01.048
- [102] CHANG, Y., MA, X., SUN, T., LIU, L. a HAO, Y. Electrochemical detection of kinase by converting homogeneous analysis into heterogeneous assay through avidin-biotin interaction. *Talanta*. 2021, **234**, 122649. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122649
- [103] CLARKE, W. a D'ORAZIO, P. Chapter 9 - Electrochemistry. In: William CLARKE a Mark A. MARZINKE, ed. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth*

*Edition*). B.m.: Academic Press, 2020, s. 159–170. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00009-0

- [104] BATISTA DEROCO, P., GIAROLA, J., WACHHOLZ JÚNIOR, D., ARANTES LORGA, G. a TATSUO KUBOTA, L. Chapter Four - Paper-based electrochemical sensing devices. In: Arben MERKOÇI, ed. *Comprehensive Analytical Chemistry*. B.m.: Elsevier, 2020, Paper Based Sensors, s. 91–137. Dostupné z: doi:10.1016/bs.coac.2019.11.001
- [105] COSIO, M., SCAMPICCHIO, M. a BENEDETTI, S.. Chapter 8 - Electronic Noses and Tongues. In: Yolanda PICÓ, ed. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Boston: Academic Press, 2012, s. 219–247. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384862-8.00008-X
- [106] ALARCON-ANGELES, G., ÁLVAREZ-ROMERO, G. a MERKOÇI, A.. Electrochemical Biosensors: Enzyme Kinetics and Role of Nanomaterials. In: Klaus WANDEL, ed. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*. Oxford: Elsevier, 2018, s. 140–155. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.13477-8
- [107] *Graphene Functionalization for Biosensor Applications - ScienceDirect*. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029930000046>
- [108] HAUSER, P. COULOMETRY. In: Paul WORSFOLD, Alan TOWNSHEND a Colin POOLE, ed. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, 2005, s. 234–240. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00104-7
- [109] HORWOOD, C. a STADERMANN, M. Evaluation of a Ag/Ag<sub>2</sub>S reference electrode with long-term stability for electrochemistry in ionic liquids. *Electrochemistry Communications*. 2018, **88**, 105–108. Dostupné z: doi:10.1016/j.elecom.2018.02.005
- [110] WANG, Z., YAN, Z., WANG, F., CAI, J., GUO, L., SU, J. a LIU, Y. Highly sensitive photoelectrochemical biosensor for kinase activity detection and inhibition based on the surface defect recognition and multiple signal amplification of metal-organic frameworks. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, **97**, 107–114. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2017.05.011
- [111] CHEN, D., ZHANG, H., LI, X. a LI, J. Biofunctional Titania Nanotubes for Visible-Light-Activated Photoelectrochemical Biosensing. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(6), 2253–2261. Dostupné z: doi:10.1021/ac9021055
- [112] SHUMYANTSEVA, V., SUPRUN, E., BULKO, T. a ARCHAKOV, A. Electrochemical methods for detection of post-translational modifications of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, **61**, 131–139. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.05.001
- [113] TALARICO, D., ARDUINI, F., AMINE, A., MOSCONE, D. a PALLESCHI, G. Screen-printed electrode modified with carbon black nanoparticles for phosphate detection by measuring the electroactive phosphomolybdate complex. *Talanta*. 2015, **141**, 267–272. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.04.006
- [114] LIN, L., LIU, Y., ZHAO, X. a LI, J. Sensitive and Rapid Screening of T4 Polynucleotide Kinase Activity and Inhibition Based on Coupled Exonuclease Reaction and Graphene

- Oxide Platform. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**(22), 8396–8402. Dostupné z: doi:10.1021/ac200593g
- [115] MIAO, R., HOU, X. a KIM, D. The Antecedents and Consequences of Job Satisfaction in China. In: Mark ZHOU, ed. *Advances in Education and Management*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, Communications in Computer and Information Science, s. 141–147. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-23062-2\_21
- [116] LIU, L., CHENG, Ch., CHANG, Y., MA, H. a HAO, Y. Two sensitive electrochemical strategies for the detection of protein kinase activity based on the 4-mercaptophenylboronic acid-induced in situ assembly of silver nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017, **248**, 178–186. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.03.122
- [117] KERMAN, K., SONG, H., DUNCAN, J., LITCHFIELD, D. a KRAATZ, H. Peptide Biosensors for the Electrochemical Measurement of Protein Kinase Activity. *Analytical Chemistry*. 2008, **80**(24), 9395–9401. Dostupné z: doi:10.1021/ac801208e
- [118] CHENG, W., MA, J., XIANG, L., SUN, Y., HUANG, W., ZHANG, Z., KONG, D. a LI, J. Zr<sup>4+</sup>-mediated hybrid chain reaction and its application for highly sensitive electrochemical detection of protein kinase A. *Bioelectrochemistry*. 2021, **140**, 107796. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107796
- [119] QIU, W., GAO, F., YANO, N., KATAOKA, Y., HANDA, M., YANG, W., TANAKA, H. a WANG, Q. Specific Coordination between Zr-MOF and Phosphate-Terminated DNA Coupled with Strand Displacement for the Construction of Reusable and Ultrasensitive Aptasensor. *Analytical Chemistry*. 2020, **92**(16), 11332–11340. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.0c02018
- [120] SAHA, K., AGASTI, S., KIM, Ch., LI, X. a ROTELLO, V. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*. 2012, **112**(5), 2739–2779. Dostupné z: doi:10.1021/cr2001178
- [121] CORMA, A. a GARCIA, H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. *Chemical Society Reviews*. 2008, **37**(9), 2096. Dostupné z: doi:10.1039/b707314n
- [122] KERMAN, K. a KRAATZ, H. Electrochemical detection of kinase-catalyzed thiophosphorylation using gold nanoparticles. *Chemical Communications*. 2007, (47), 5019. Dostupné z: doi:10.1039/b713048a
- [123] KERMAN, K., CHIKAE, M., YAMAMURA, S. a TAMIYA, E. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **588**(1), 26–33. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.02.001
- [124] GAO, Ch., GUO, Z., LIU, J. a HUANG, X. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. *Nanoscale*. 2012, **4**(6), 1948. Dostupné z: doi:10.1039/c2nr11757f
- [125] ZHANG, J., LAO, R., SONG, S., YAN, Z. a FAN, Ch. Design of an Oligonucleotide-Incorporated Nonfouling Surface and Its Application in Electrochemical DNA Sensors for Highly Sensitive and Sequence-Specific Detection of Target DNA. *Analytical Chemistry*. 2008, **80**(23), 9029–9033. Dostupné z: doi:10.1021/ac801424y

- [126] PEČOVÁ, M., ZAJONCOVÁ, L., POLÁKOVÁ, K., ČUDA, J., ŠAFAŘÍKOVÁ, M., ŠEBELA, M. a ŠAFAŘÍK, I. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. **2011**(105), 524–530.