

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič pro fosforylaci proteinů

Bc. Markéta Fojtíková

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Fojtíková**  
Osobní číslo: **C17434**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič pro fosforylaci proteinů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

#### Teoretická část:

- Src kináza, její zařazení do skupiny tyrosin kináz, úloha v organismu.
- Přehled metod ukotvení enzymů a kináz k pevným nosičům s diskusí o ovlivnění biologické aktivity.
- Fosforylace nízkomolekulárních a vysokomolekulárních substrátů in vitro.

#### Experimentální část:

- Vazba enzymů (kináz) na superparamagnetické částice, fosforylace peptidových substrátů. Stabilita připravených imobilizovaných enzymů.
- Detekce efektivity vazby pomocí enzymových substrátů a analytických metod jako hmotnostní spektrometrie, elektroforetické metody, protein-specifické metody, blotting.
- Fosforylace myelinového bazického proteinu anebo rek. Tau proteinu, detekce úspěšnosti fosforylace.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Eliška Šťovíčková**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2019

.....  
Bc. Markéta Fojtíková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a vstřícnost jak při práci v laboratoři, tak při samotném zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Elišce Šťovíčkové za pomoc a cenné rady při práci na experimentální části diplomové práce a Mgr. Rudolfu Kupčikovi za pomoc při analýze vzorků a vyhodnocování dat.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací magnetického nosiče s imobilizovanou Src kinázou. Solubilní i imobilizovaná forma Src kinázy byla použita k *in vitro* fosforylaci hovězího myelinového bazického proteinu a rekombinantního proteinu Tau-441. Úspěšnost fosforylace byla hodnocena metodou Western blot, dále pomocí dendrimera pIMAGO a metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Imobilizovaná Src kináza, fosforylace, magnetický nosič, myelinový bazický protein, Tau-441, dendrimer pIMAGO, hmotnostní spektrometrie

## **TITLE**

Immobilization of Src Kinase to a Magnetic Carrier for Phosphorylation of Proteins

## **ANNOTATION**

The thesis deals with the preparation and characterization of magnetic carrier with immobilized Src kinase. Both soluble and immobilized Src kinase was used to *in vitro* phosphorylation bovine myelin basic protein and recombinant protein Tau-441. The success of phosphorylation was assessed by Western blotting, pIMAGO dendrimer and MALDI-Orbitrap mass spectrometry.

## **KEYWORDS**

Immobilized Src kinase, phosphorylation, magnetic carrier, myelin basic protein, Tau-441, pIMAGO dendrimer, mass spectrometry

# OBSAH

0	ÚVOD .....	16
1	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	17
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	18
2.1	Tyrosin kinázy .....	18
2.1.1	Receptorové tyrosin kinázy .....	19
	Struktura receptorových tyrosin kináz.....	19
	Přenos signálu receptorovými tyrosin kinázami.....	21
2.1.2	Nereceptorové tyrosin kinázy .....	22
	Struktura nereceptorových tyrosin kináz.....	22
	Přenos signálu nereceptorovými tyrosin kinázami.....	23
2.2	Src kinázová rodina .....	25
2.2.1	Skupina I.....	25
2.2.2	Skupina II.....	26
2.2.3	Skupina III .....	27
2.3	Src kinázy .....	28
2.3.1	Struktura Src kináz.....	28
	Myristoylová skupina .....	29
	SH3 doména .....	29
	SH2 doména .....	30
	Kinázová doména .....	30
	Regulační místa .....	31
2.3.2	Regulace aktivity Src kináz .....	32
	Unlatching, unclamping a switching .....	33
	Přechod aktivní formy na formu inaktivní .....	33
	Role hořčnatých iontů v průběhu katalytického procesu.....	34
	v-src kinázy .....	36
2.3.3	Přehled regulačních funkcí Src kináz v lidském organismu.....	36
2.3.4	Substráty Src kináz .....	38
	Substráty Src kináz využívané k fosforylacím <i>in vivo</i> .....	39
	Substráty Src kináz využívané k fosforylacím <i>in vitro</i> .....	40
2.3.5	Inhibitory Src kináz .....	40
	Bosutinib.....	41

	Dasatinib.....	41
	Ponatinib.....	41
	Vandetanib.....	42
	Saracatinib .....	42
	Další inhibitory .....	42
2.4	Ukotvení enzymů k pevnému nosiči .....	43
2.4.1	Reverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči.....	44
	Adsorpce.....	44
	Vazba pomocí kovů.....	44
	Vazba pomocí disulfidických můstků .....	44
	Bioafinitní interakce .....	45
2.4.2	Irreverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči .....	45
	Kovalentní ukotvení .....	45
	Fyzické zachycení .....	46
	Cross-linking .....	47
2.4.3	Materiály používané jako nosiče .....	47
	Biopolymery .....	47
	Hydrogely .....	47
	Anorganické nosiče .....	48
	Syntetické organické polymery .....	48
	Inteligentní polymery .....	48
	Zlaté nanočástice .....	49
	Magnetické částice .....	49
2.4.4	Přehled praktického využití imobilizovaných kináz.....	50
2.5	Aplikace tyrosin kináz pro fosforylace modelových molekul <i>in vitro</i> .....	52
2.5.1	Tau protein.....	52
	Struktura a fosforylační místa Tau proteinu.....	53
	Hyperfosforylace Tau proteinu.....	54
2.5.2	Myelinový bazický protein .....	55
	Struktura a fosforylační místa myelinového bazického proteinu .....	55
2.5.3	Metody detekce fosforylovaných peptidů a proteinů .....	56
	Metody využívající radioaktivní značení izotopem fosforu.....	56
	Metody využívající fosfospecifické protilátky .....	56
	Metody využívající chelatační sloučeniny .....	57



	Metody hmotnostní spektrometrie.....	59
2.5.4	Metody pro obohacení fosforylovaných peptidů a proteinů.....	61
	Afinní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů.....	62
	Afinní chromatografie na oxidech kovů.....	62
	Iontově výměnná chromatografie na silném katexu nebo silném anexu.....	62
	Hydrofilní interakční chromatografie.....	63
	Obhacovací metody založené na protilátkách .....	63
	Alternativní obhacovací metody založené na afinitní purifikaci.....	63
	Obhacovací metody na destičce .....	64
	Metody založené na chemické derivatizaci .....	64
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	65
3.1	Přístroje a pomůcky .....	65
3.2	Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič .....	67
3.3	Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou .....	68
3.3.1	Fosforylace peptidového substrátu solubilní Src kinázou v čase .....	69
3.3.2	Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič v čase .....	69
3.3.3	Stanovení operační stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič ....	69
3.3.4	Stanovení skladovací stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič.	70
3.4	Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou .....	70
3.4.1	Fosforylace myelinového bazického proteinu solubilní Src kinázou .....	71
3.4.2	Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič .....	71
3.5	Defosforylace myelinového bazického proteinu alkalickou fosfatázou.....	72
3.6	Fosforylace proteinu Tau-441 Src kinázou .....	72
3.6.1	Fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou.....	73
3.6.2	Fosforylace proteinu Tau-441 Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič. .....	73
3.7	Detekce fosfoproteinů pomocí kitu pIMAGO-biotin pro uspořádání na mikrotitrační destičce .....	74
3.8	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného a glycinu .....	75
3.8.1	Barvení gelu roztokem Coomassie G-250 Stain.....	77
3.8.2	Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra.....	77

3.9	Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí .....	78
3.9.1	Westernový přenos proteinů na membránu .....	78
3.9.2	Detekce přenosu proteinů na membránu roztokem Ponceau S.....	79
3.9.3	Detekce fosfoproteinů na membráně s využitím specifických protilátek.....	79
3.10	Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii a následná analýza .....	80
3.10.1	Proteolytické štěpení proteinu solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci.....	80
	Proteolytické štěpení solubilních proteinů solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci .....	81
	Proteolytické štěpení proteinů v polyakrylamidovém gelu solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci .....	82
3.10.2	Obohacení fosfopeptidů na nosiči Titansphere™ TiO Bulk Material .....	82
3.10.3	Odsolení vzorků na reverzní fázi OLIGO™ R3.....	83
3.10.4	Analýza vzorků hmotnostní spektrometrií.....	84
3.10.5	Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií.....	84
	Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu solubilní/imobilizovanou Src kinázou .....	84
	Vyhodnocení analýzy proteinů.....	85
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	86
4.1	Příprava imobilizované Src kinázy.....	86
4.1.1	Optimalizace podmínek fosforylace peptidového substrátu Src kinázou .....	86
4.1.2	Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič .....	88
4.1.3	Stanovení operační stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič ....	90
4.1.4	Stanovení skladovací stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič.	91
4.2	Fosforylace proteinů Src kinázou a jejich detekce .....	93
4.2.1	Ověření přirozené fosforylace myelinového bazického proteinu .....	93
4.2.2	Fosforylace myelinového bazického proteinu solubilní Src kinázou .....	98
4.2.3	Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič .....	104
4.2.4	Fosforylace rekombinantního proteinu Tau-441 Src kinázou .....	106
5	ZÁVĚR .....	114
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	115

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1</b> Struktura receptorových tyrosin kináz.....	21
<b>Obr. 2</b> Struktura nereceptorových tyrosin kináz.....	23
<b>Obr. 3</b> Struktura lidské Src kinázy.....	29
<b>Obr. 4</b> Sekundární struktura (A) inaktivní a (B) aktivní lidské Src kinázy.....	32
<b>Obr. 5</b> Systémy regulující aktivitu Src kináz: latch, clamp, switch.....	32
<b>Obr. 6</b> Regulace aktivity Src kináz.....	34
<b>Obr. 7</b> Schéma průběhu katalytické reakce protein kináz.....	36
<b>Obr. 8</b> Struktura jednotlivých izoform lidského Tau proteinu.....	53
<b>Obr. 9</b> Fosforylační místa izoformy 2N4R Tau proteinu.....	54
<b>Obr. 10</b> Struktura molekuly pIMAGO.....	58
<b>Obr. 11</b> Pracovní postup detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO (A) na membráně nebo (B) mikrotitrační destičce.....	59
<b>Obr. 12</b> Principy obohacovacích metod fosfopeptidů a fosfoproteinů.....	61
<b>Obr. 13</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro c-Src fosforylovaného solubilní Src kinázou v koncentraci 1 µg/100 µl, matrice DHB.....	87
<b>Obr. 14</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro c-Src fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads, operační stabilita, matrice DHB.....	90
<b>Obr. 15</b> SDS-PAGE analýza hovězího MBP.....	94
<b>Obr. 16</b> Detekce přirozeně se vyskytující fosforylace tyrosinu u hovězího MBP.....	96
<b>Obr. 17</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum hovězího MBP, matrice DHB.....	97
<b>Obr. 18</b> Detekce úspěšnosti fosforylace hovězího MBP solubilní Src kinázou, 3. modifikace experimentu.....	99
<b>Obr. 19</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum hovězího MBP fosforylovaného solubilní Src kinázou, matrice DHB.....	101
<b>Obr. 20</b> SDS-PAGE analýza hovězího MBP v prostředí TFA.....	102
<b>Obr. 21</b> SDS-PAGE analýza proteinů uvolněných z povrchu reakční zkuševky s využitím 0,5% SDS.....	103
<b>Obr. 22</b> Detekce úspěšnosti fosforylace hovězího MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice.....	104
<b>Obr. 23</b> SDS-PAGE analýza rekombinantního proteinu Tau-441.....	106

<b>Obr. 24</b> SDS-PAGE analýza detekce úspěšnosti fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice.....	108
<b>Obr. 25</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum proteinu Tau-441 fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice (blokace 0,05% BSA) (A) bez obohacení, (B) obohacení na 0,2 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material, matrice DHB .....	110
<b>Obr. 26</b> MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum proteinu Tau-441 fosforylovaného (A) Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice (blokace 0,05% BSA), (B) Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice, (C) solubilní Src kinázou, matrice DHB .....	111
<b>Obr. 27</b> SDS-PAGE analýza proteinů uvolněných z povrchu reakčních zkumavek s využitím 0,5% SDS.....	113

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1</b> Příprava dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE v přítomnosti glycinu .....	77
<b>Tab. 2</b> Vyhodnocení přirozeně se vyskytujících fosforylací hovězího MBP lokalizovaných na serinu (S), threoninu (T) nebo tyrosinu (Y) metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie .....	97
<b>Tab. 3</b> Vyhodnocení fosforylace tyrosinu (Y) hovězího MBP solubilní Src kinázou pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie .....	101
<b>Tab. 4</b> Vyhodnocení fosforylace proteinu Tau-441 solubilní a imobilizovanou Src kinázou pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie .....	112

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1</b> Závislost míry fosforylace peptidového substrátu na čase pro 0,3; 0,5 a 1 µg solubilní Src kinázy/100 µl .....	88
<b>Graf 2</b> Závislost míry fosforylace peptidového substrátu na čase pro Src kinázu imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads a ProMag <sup>®</sup> HC 1 Series .....	89
<b>Graf 3</b> Operační stabilita Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads znázorněna prostřednictvím závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu cyklů.....	91
<b>Graf 4</b> Skladovací stabilita Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads znázorněna prostřednictvím závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu dnů.....	92
<b>Graf 5</b> Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, kalibrační řada MBP .....	95
<b>Graf 6</b> Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace MBP solubilní Src kinázou .....	100
<b>Graf 7</b> Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič .....	105
<b>Graf 8</b> Závislost absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny. ....	107
<b>Graf 9</b> Závislost absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič .....	109

## SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
E2	exon 2
E3	exon 3
FAK	fokální adhezivní kináza
FGF	fibroblastový růstový faktor
GSK3 $\beta$	glykogen syntáza kináza 3 $\beta$
IGF	inzulínu podobný růstový faktor
MALDI	desorpční ionizace laserem za asistence matrice (z ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MBP	myelinový bazický protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NGF	nervový růstový faktor
NRTK	nereceptorová tyrosin kináza
PDGF	růstový faktor odvozený od trombocytů
pTyr	fosfotyrosin
rpm	otáčky za minutu (z ang. Revolution Per Minute)
RTK	receptorová tyrosin kináza
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SH1	src-homology 1
SH2	src-homology 2
SH3	src-homology 3
TCR	receptor T-lymfocytů
TLR	toll-like receptor
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

## 0 ÚVOD

Fosforylace je jednou z posttranslačních modifikací, kterou zprostředkovávají enzymy nazývané kinázy. Prostřednictvím této posttranslační modifikace dochází nejen k regulaci funkce proteinů, ale také k regulaci širokého spektra buněčných procesů, jako je diferenciaci a proliferaci buněk, apoptóza či buněčné přežití. Poruchy fosforylačního procesu vedou často k rozvoji patologických stavů, mezi něž se řadí například neurodegenerativní, autoimunitní, nádorová či hematologická onemocnění.

Teoretická část diplomové práce se zabývá zařazením Src kinázy do skupiny tyrosin kináz, její charakterizací, regulací, výskytem a funkcí. Dalšími částmi práce je přehled a význam imobilizačních metod enzymů k pevnému nosiči, detekčních metod fosforylací a obohacovacích metod fosfopeptidů a fosfoproteinů. Imobilizace enzymů je velice studovanou oblastí, a to především díky výhodám, které imobilizované enzymy poskytují oproti solubilním formám. Hlavními výhodami je možnost jejich opakovaného použití, vyšší stabilita, snadná separace z reakční směsi a tím i vyšší čistota výsledného produktu reakce a značné snížení ekonomických nákladů. Využití magnetických nosičů k imobilizaci enzymů je spojeno především s možností jejich velice rychlé separace z reakční směsi.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na imobilizaci Src kinázy na magnetický nosič a sledování skladovací a operační stability imobilizované kinázy. Dále byla Src kináza jak ve své solubilní, tak také imobilizované formě, použita k *in vitro* fosforylaci hovězího myelinového bazického proteinu a rekombinantního proteinu Tau-441. Detekce úspěšnosti *in vitro* fosforylace byla hodnocena metodou Western blot, pomocí dendrimeru pIMAGO a metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.



# 1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vytvořit ucelenou kompilační práci zabývající se:

- zařazením Src kináz do skupiny tyrosin kináz,
- metodami vazby enzymů k pevnému nosiči,
- přehledem obohacovacích a detekčních metod fosfopeptidů a fosfoproteinů.

Cílem experimentální části diplomové práce byla:

- příprava a charakterizace Src kinázy imobilizované na magnetický nosič,
- fosforylace peptidových a proteinových substrátů solubilní i imobilizovanou Src kinázou a detekce úspěšnosti *in vitro* fosforylace.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tyrosin kinázy

Kinázy jsou rozsáhlou rodinou enzymů patřící do třídy transferáz. Tyto enzymy jsou odpovědné za přenos fosfátové skupiny z vysokoenergetického donoru, jako je například adenosintrifosfát (ATP), na akceptorovou molekulu. Tento proces je obecně nazýván jako fosforylace [1]. Jednou ze skupin patřící do rodiny kináz jsou enzymy nazývané jako protein kinázy. Tyto enzymy umožňují přenos fosfátové skupiny na jeden nebo více aminokyselinových zbytků postranního řetězce proteinového substrátu, což vede ke konformační změně ovlivňující funkci proteinu. Protein kinázy, jakožto velká a strukturně různorodá skupina enzymů [2], se dělí do dvou širokých podskupin, a to s ohledem na jejich substrátovou specifitu [3]. První podskupinou jsou serin/threonin kinázy, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP na serinové či threoninové zbytky proteinů. Druhou podskupinou jsou tyrosin kinázy, které naopak katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP na tyrosinové zbytky proteinů [4].

Tyrosin kinázy prostřednictvím fosforylace tyrosinových zbytků ovlivňují široké spektrum vlastností proteinů, jako je například enzymová aktivita, subcelulární lokalizace, či schopnost interakce s jinými molekulami. Tyrosin kinázy se účastní velkého množství signálních kaskád, při nichž jsou signály z extracelulárního prostoru přenášeny přes buněčnou membránu do cytoplazmy buňky. Prostřednictvím dalších interakcí s proteiny mohou signály směřovat až do jádra buňky, což v konečném důsledku může vést k aktivaci nebo inhibici transkripčních faktorů, regulujících expresi cílových genů [5]. Tyrosin kinázy jsou součástí procesů, které jsou odpovědné za klíčové události v lidském organismu [6]. Podílí se například na indukci buněčné mitózy, regulaci buněčného růstu [7], proliferaci [5], aktivaci imunitního systému [7], regulaci fibroblastů [5] nebo mezibuněčné komunikaci [8].

Tyrosin kinázy se dělí do dvou podskupin. V případě prvním, kdy je enzymová aktivita nedílnou součástí receptoru na povrchu buňky, se tyto kinázy nazývají jako receptorové tyrosin kinázy (RTKs). Mimo jiné jsou také definovány jako kinázy obsahující ve své struktuře transmembránovou doménu. V případě druhém, kdy enzymová aktivita není prokazatelně spojena s receptorem na povrchu buňky, se podskupina takovýchto kináz naopak nazývá jako nereceptorové tyrosin kinázy (NRTKs). Oproti RTKs je tato podskupina definována jako skupina kináz, která ve své struktuře neobsahuje transmembránovou doménu [9].

### 2.1.1 Receptorové tyrosin kinázy

V lidském genomu bylo identifikováno 58 RTKs, které jsou rozděleny do 20 různých rodin [10]. Systematický název RTKs je ATP: [protein]-L-tyrosin *O*-fosfotransferázy [11]. Jedná se o transmembránové glykoproteiny vystupující jako receptory, které mají enzymatickou aktivitu. RTKs jsou schopny aktivovat řadu signálních drah, jako například buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci, apoptózu nebo metabolické pochody [8]. Pod pojmem RTKs se skrývá široké spektrum enzymů, podílejících se nejen na důležitých funkcích organismu [12], ale také na rozvoji různých patologických stavů, které mohou být důsledkem genetické změny nebo abnormality RTKs. Mutace v genetickém předpisu těchto enzymů byla kauzálně spojena například s rakovinou prsu, *diabetes mellitus* typu II nebo aterosklerózou. Souvislost těchto patologických stavů s poruchou RTKs vedla k rozvoji nové generace léčiv, která mají schopnost blokovat nebo snižovat aktivitu RTKs [13].

Do skupiny RTKs patří například inzulínové receptory a receptory pro růstové faktory, jako je receptor pro epidermální růstový faktor (EGF), receptor pro fibroblastový růstový faktor (FGF), receptor pro růstový faktor odvozený od trombocytů (PDGF), receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) nebo receptor pro nervový růstový faktor (NGF), přičemž všechny tyto faktory v reakcích vystupují jako ligandy RTKs [12]. K samotné aktivaci RTKs dochází po navázání vhodného ligandu na vazebné místo a následně, prostřednictvím fosforylace tyrosinových zbytků [8], procesu dimerizace a aktivace tyrosin kinázové domény [14] dochází k přenosu signálu z extracelulárního prostoru do cytoplazmy buňky [8].

#### Struktura receptorových tyrosin kináz

Struktura RTKs (Obr. 1) je rozdělena na tři funkčně odlišné oblasti, a to extracelulární oblast vázající polypeptidové ligandy, transmembránový helix a cytoplazmatickou oblast obsahující tyrosin kinázovou doménu. Dále je možno rozlišit také juxtamembránovou oblast, která je začleněna mezi transmembránovým helixem a tyrosin kinázovou doménou, a C-terminální konec, jakožto regulační oblast [15].

Extracelulární oblast je značně rozmanitá napříč všemi podrodinami RTKs. Skládá se z lineární řady po sobě následujících domén. Mezi nejčastěji se vyskytující domény patří L doména, imunoglobulin-like doména, cystein-rich (na cystein bohatá) doména, leucin-rich (na leucin bohatá) doména nebo fibronektin typu III doména. Veškeré domény se od sebe navzájem liší například počtem aminokyselin tvořících doménu, výslednou strukturou, druhem přítomných vazeb nebo místem jejich nejčastějšího výskytu [15]. Extracelulární oblast se podílí

především na rozpoznávání dimerních ligandů a procesu dimerizace receptorového řetězce [16]. Většina ligandů vázajících se na extracelulární oblast je ve vodě rozpustná, s výjimkou ligandů Eph podrodiny [17].

Transmembránový segment, propojující extracelulární domény s doménami intracelulárními, je složen z 20-24 hydrofobních zbytků, které jsou uspořádány do struktury pravotočivého  $\alpha$  helixu [14]. Transmembránový segment hraje důležitou roli jak v dimerizačním procesu, tak při aktivaci receptoru [18]. Bylo prokázáno, že tyto transmembránové segmenty mají sklon k tvorbě stabilních dimerních struktur uvnitř membrány [19], přispívají k celkové stabilitě receptoru a kontrolují orientaci katalytických domén po celé délce receptoru. V transmembránovém segmentu může také docházet ke strukturálním změnám, vznikajícím v důsledku mutací transmembránových domén. Tyto mutace se následně mohou šířit na extracelulární i katalytické domény [20].

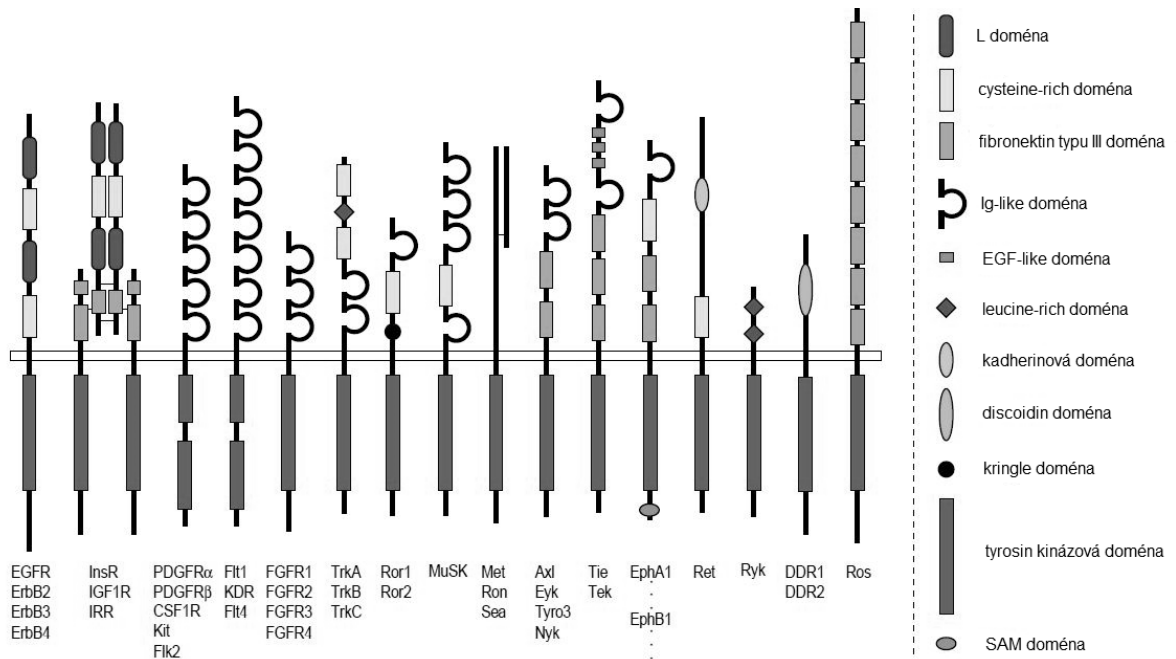
Struktura cytoplazmatické oblasti je v porovnání s extracelulární oblastí značně jednodušší. Je rozdělena na juxtamembránovou oblast, tyrosin kinázovou doménu a C-terminální konec [15].

Juxtamembránová oblast, jakožto úsek mezi transmembránovou doménou a tyrosin kinázovou doménou, pracuje synergicky s doménou transmembránovou, a to především díky její lokalizaci. Struktura juxtamembránového segmentu je 40-80 zbytků dlouhá a obsahuje několik bazických aminokyselin, jako je lysin a arginin, které jsou umístěny poblíž membránového povrchu. Toto umístění má svůj funkční význam, jelikož bylo prokázáno, že právě tyto aminokyseliny slouží jako vazebná místa pro signální molekuly [20]. Náhodná mutace, delece nebo inverze v juxtamembránové oblasti může být spojena s rozvojem patologických stavů, jako je například rakovina plic [21].

Struktura tyrosin kinázové domény je složena z větší karboxy-terminální smyčky, která má charakter  $\alpha$  helixu a amino-koncové smyčky obsahující pět  $\beta$  skládaných listů a jeden  $\alpha$  helix. V průběhu procesu fosforylace se ATP váže na štěrbinu mezi těmito dvěma smyčkami, zatímco peptidové substráty se navazují na karboxy-terminální smyčku [22]. Další částí struktury tyrosin kinázové domény je aktivační smyčka, která se podílí na vazbě hořčák-ATP [23]. Autofosforylace aktivační smyčky mimo jiné vedet také ke stimulaci katalytické aktivity RTKs [24].

C-terminální konce se mezi jednotlivými členy RTKs liší velikostí a obsahem tyrosinu. Tyto rozdíly mají v konečném důsledku vliv na rozvoj a trvání intracelulárních signálů.

C-terminální konec ve své struktuře obsahuje dlouhý segment více než 200 zbytků. Nicméně jen několik z nich má charakter tyrosinu, a právě tyto tyrosinové zbytky po aktivaci receptoru podléhají autofosforylaci. Tyrosinové zbytky slouží také jako vazebná místa pro efektorové proteiny, které přenášejí signál dále do nitra buňky. Veškeré tyrosinové zbytky potřebné pro signalizační procesy RTKs jsou umístěny na C-terminálním konci [25].



**Obr. 1** Struktura receptorových tyrosin kináz, upraveno dle [26]

### Přenos signálu receptorovými tyrosin kinázami

Proces přenosu signálu RTKs je zahájen vazbou dimerního ligandu na extracelulární domény receptoru. Vazba ligandu má za následek zvýšení stability receptorového řetězce, který je v následujícím procesu autofosforylován účinkem tyrosin kinázové domény. Celý tento proces je obecně nazýván jako *trans*-fosforylace. Tato nekovalentní dimerizace je spojena s konformačními změnami, které vedou k aktivaci cytoplazmatické tyrosin kinázové domény receptoru [13]. Nicméně některé ligandy mají charakter monomeru. Příkladem může být EGF. Vazba takovýchto monomerních ligandů na příslušná vazebná místa vyvolává konformační změny. Dochází k posunutí intramolekulární smyčky a vystavení vazebné domény receptoru, což má vliv na průběh dimerizace [27].

Proces dimerizace řetězce RTKs zahrnuje rotaci N-konce a taktéž rotaci C-konce. Aktivační smyčka nesoucí tyrosinové zbytky, které slouží jako vazebná místa, se přesunuje tak, aby byla možná vazba ATP a autofosforylace tyrosinových zbytků lokalizovaných na opačném řetězci receptoru. *Trans*-fosforylace tyrosinových zbytků lokalizovaných na aktivační smyčce

stabilizuje konformaci receptoru a přerušuje vazbu mezi tyrosiny a vazebnými místy proteinových substrátů, což umožňuje přístup k C-konci a následně také rozvoj tyrosin kinázové aktivity [28].

Fosforylace katalytické domény RTKs zvyšuje nebo snižuje aktivitu tyrosin kinázové domény, zatímco nekatalytické domény vytvářejí variabilní vazebná místa pro cytoplazmatické molekuly, které se přímo účastní intracelulárních signálních drah. Tyto vazebná místa jsou často lokalizována v juxtamembránové oblasti nebo na C-konci. Umožňují vazbu, aktivaci a fosforylaci širokého spektra cytoplazmatických proteinů, jejichž aktivace vede ke spuštění intracelulárních signálních drah. Tyto proteiny obsahují ve své struktuře Src-homology 2 (SH2) doménu nebo fosfotyrosin (pTyr) vázající doménu, která rozpoznává tyrosin-fosforylované receptorové řetězce. Tyto proteiny mohou mít vnitřní enzymatickou aktivitu, příkladem může být Src kináza nebo fosfolipáza C $\gamma$ . Mimo to mohou tyto proteiny sloužit také jako adaptérové, jejichž úlohou je aktivace jiných enzymů [29].

### **2.1.2 Nereceptorové tyrosin kinázy**

NRTKs jsou velkou podrodinou tyrosin kináz [30]. Jejich systematický název je ATP: [protein]-L-tyrosin *O*-fosfotransferázy [11]. Jedná se o cytoplazmatické enzymy, které ve své struktuře neobsahují extracelulární ani transmembránovou doménu. Většina těchto enzymů je lokalizovaná v cytoplazmě, ale mohou se vyskytovat i NRTKs, které jsou ukotveny k buněčné membráně [9]. Jejich funkce je založena na fosforylaci tyrosinových zbytků aktivujících proteiny, které dále regulují široké spektrum procesů eukaryotických buněk [30].

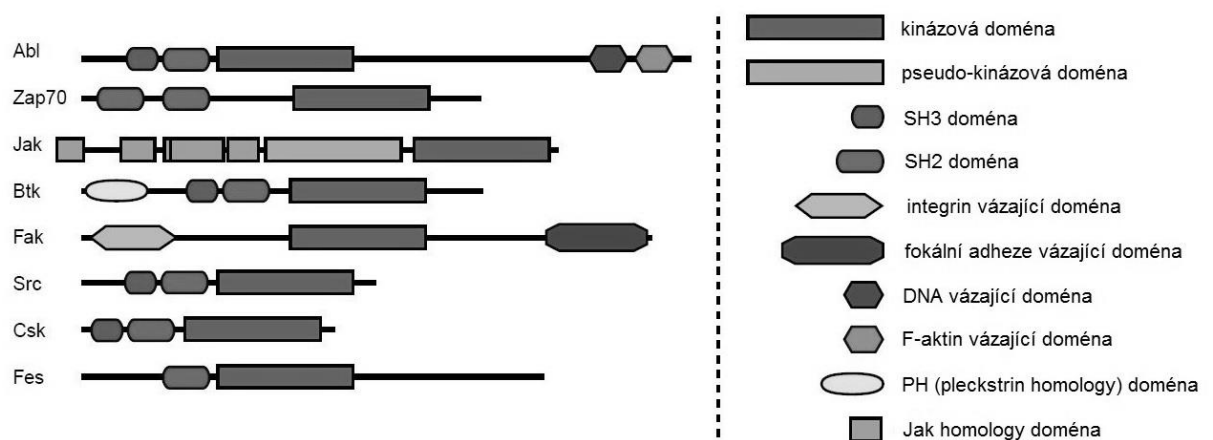
V lidském organismu bylo identifikováno 32 NRTKs, které jsou rozděleny do 10 různých rodin. Mezi tyto rodiny patří rodina Abl, Ack, Csk, Fak, Fes, Frk, Jak, Src, Tec a Syk. Některé z těchto enzymů jsou specifické jen pro určité tkáně, jiné se naopak vyskytují napříč celým organismem. Funkce NRTKs je spojena například s řízením buněčné proliferace, diferenciace, ale i apoptózy [31]. Jedná se o centrální komponenty signální kaskády receptorů T-lymfocytů, při níž jsou důležité především při zahájení, udržování a regulaci signalizace závislé na těchto antigenních receptorech [32]. Velké množství signálních drah spojených s NRTKs se omezuje pouze na hematopoetické buňky [9].

### **Struktura nereceptorových tyrosin kináz**

Struktura NRTKs (Obr. 2) je napříč všemi rodinami velice rozmanitá. Nicméně všechny rodiny mají několik společných strukturálních rysů. Všechny NRTKs mají alespoň jednu tyrosin kinázovou doménu dlouhou 275 aminokyselinových zbytků, jejíž součástí je

aktivní místo. Dále obsahují oblasti, nacházející se na cytoplazmatických doménách, jejichž funkcí je umožnit interakci s pTyr zbytky nebo s jinými specifickými motivy. Ve většině případů se jedná o oblasti umožňující interakce protein-protein, protein-lipid nebo protein-deoxyribonukleová kyselina (DNA). Enzymatická aktivita NRTKs často podléhá pozitivní nebo negativní regulaci, zapříčiněné fosforylací kritických tyrosinových zbytků [9].

Mezi nejčastěji se vyskytující domény, tedy mimo těch, které se vyskytují u všech rodin NRTKs, patří především SH2 a Src-homology 3 (SH3) doména. SH2 doména je typická pro rodiny Fes, Csk, Abl nebo Src [26]. Jedná se o přibližně 100 aminokyselin dlouhé úseky, které rozpoznávají fosforylované tyrosinové zbytky [33]. Druhou nejčastěji se vyskytující doménou je SH3. Tato doména je charakteristická pro rodiny Abl, Src nebo Csk. Jedná se o malé proteinové úseky, které jsou v porovnání s doménou SH2 kratší a skládají se jen z 60 aminokyselinových zbytků [34]. Dalšími méně často se vyskytujícími doménami mohou být například Jak homology domény, které jsou typické pro rodinu Jak, dále domény vázající DNA, které se vyskytují u rodiny Abl nebo integrin vázající domény typické pro rodinu Fak [26].



**Obr. 2** Struktura nereceptorových tyrosin kináz, upraveno dle [26]

### Přenos signálu nereceptorovými tyrosin kinázami

Přenos signálu zástupci jednotlivých rodin NRTKs je v závislosti na jejich strukturální a funkční odlišnosti rozdílný. Příkladem může být přenos signálu prostřednictvím rodiny Tec kináz. Tec kinázy jsou aktivovány několika membránovými receptory, jako například receptory pro integriny, tumor nekrotizující faktory nebo samotnými RTKs. Proces aktivace Tec kináz je dvouступňový děj. V kroku prvním dochází k interakci PH (pleckstrin homology) domény s fosfolipidy, podjednotkami receptorů spřažených s G-proteiny nebo s protein kinázami C.

V důsledku interakce dochází k translokaci Tec kinázy do okolí plazmatické membrány buňky. V kroku druhém dochází k fosforylaci tyrosinových zbytků katalytické domény Tec kinázy, a to v důsledku aktivace Src kináz. Poté nastává proces autofosforylace tyrosinových zbytků v SH3 doméně a spuštění dalších nitrobuněčných signálních drah [35].

Druhým příkladem může být přenos signálu prostřednictvím rodiny Syk kináz. Celková tyrosin kinázová aktivita Syk kináz je regulována SH2 doménami. Samotný přenos signálu těmito kinázami je zahájen vazbou dvou domén SH2 na tyrosin-fosforylované motivy ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) lokalizované na  $\zeta$  řetězci T-lymfocytů. Tato vazba snižuje inhibici tyrosin kinázové domény, což v konečném důsledku vede ke stimulaci katalytické aktivity Syk kinázy [36].



## 2.2 Src kinázová rodina

Manning et al. publikovali, že lidská Src kinázová rodina se skládá z 11 členů [37]. Řadí se zde čtyři úzce příbuzné enzymy patřící do skupiny I, a to Src, Fyn, Yes a Fgr. Dále se zde řadí čtyři úzce příbuzné enzymy patřící do skupiny II, a to Blk, Hck, Lck a Lyn. Zbýlé tři enzymy Frk, Srm a Brk patří do skupiny III [38].

### 2.2.1 Skupina I

Fyn kinázy jsou převážně exprimovány mozkovou tkání a hematopoetickými buňkami [39]. Aktivita Fyn kináz je podobně jako u ostatních členů Src kinázové rodiny regulována intramolekulárními interakcemi, které závisí na rovnováze mezi fosforylací a defosforylací tyrosinu [40]. Aktivní forma těchto kináz je známá v podobách FynT a FynB. Obě tyto aktivní formy se vyskytují především v hematopoetických buňkách, nicméně aktivní forma FynB je ve vysokém zastoupení přítomná také v mozkové tkáni [41]. Fyziologicky se Fyn kinázy podílejí na regulaci procesů, jako je signalizace zprostředkovaná receptory T-lymfocytů, buněčném dělení, adhezi, cytoskeletární přestavbě, funkci trombocytů nebo myelinizaci centrální nervové soustavy [42].

Yes kinázy jsou exprimovány hematopoetickými buňkami, buňkami proximálního tubulu a buňkami žaludeční sliznice [43]. Tyto NRTKs se podílejí na regulaci buněčného růstu, apoptóze, diferenciaci, adhezi buněk a remodelaci buněčného cytoskeletu [39]. V průběhu stimulace T-lymfocytů prostřednictvím cytokinu CXCL12 fosforylují Yes kinázy mediátorové proteiny a tím vyvolávají migraci T-lymfocytů [44]. Yes kinázy hrají roli také v průběhu buněčného cyklu, kdy zprostředkovávají fosforylaci cyklin-dependentní kinázy 4, čímž umožňují regulaci G1 fáze [45].

Exprese Fgr kináz byla detekována v neutrofilech [46], monocitech, NK buňkách a lymfocytech [47]. Fyziologicky se tyto kinázy podílejí na přenosu signálů z povrchových receptorů imunitních buněk a přispívají tak k regulaci imunitní odpovědi. Regulují funkci neutrofilů, monocytů, makrofágů a žírných buněk, podílejí se na remodelaci cytoskeletu buňky v průběhu reakce na extracelulární podněty, fagocytóze, adhezi a migraci buněk. Dále tyto kinázy podporují také degranulaci mastocytů a sekreci prozánětlivých cytokinů [48].

O Src kinázách bude blíže pojednáno v kapitole 2.3 Src kinázy.

### 2.2.2 Skupina II

Blk kinázy jsou exprimovány lymfatickými orgány, Langerhansovými ostrůvky pankreatu, Leydigovými buňkami nebo vlasovými folikuly [49]. Expres těchto kináz je pod kontrolou nukleárního faktoru  $\kappa$ B [50]. Blk kinázy se podílejí na růstu, diferenciaci a buněčné signalizaci B-lymfocytů. Signalizace zprostředkovaná Blk kinázami hraje důležitou roli především v přenosu signálů, které jsou u B-lymfocytů iniciovány stimulací povrchových receptorů. Mimo to Blk kinázy podporují přechod pro-B-lymfocytů do stádia pre-B-lymfocytů a jsou součástí signálních drah vedoucích k zastavení růstu B-lymfocytů a navození jejich apoptózy [51]. V Langerhansových ostrůvcích pankreatu Blk kinázy fungují jako modulátory beta buněk a tím stimulují sekreci inzulínu [49].

Hck kinázy jsou nejčastěji exprimovány myeloidními buňkami a B-lymfocyty [52]. Velmi vysoké koncentrace těchto kináz byly detekovány v granulocytech [53]. Hck kinázy se účastní přenosu signálů z povrchových receptorů imunitních buněk, hrají důležitou roli při regulaci imunitních odpovědí, regulují funkci imunitních buněk a podílejí se na buněčné proliferaci, adhezi a migraci [54].

Lck kinázy jsou nejčastěji exprimovány lymfoidními buňkami. Jednou z hlavních funkcí Lck kináz je zprostředkování signálních drah T-lymfocytů. Při těchto signálních drahách jsou Lck kinázy asociovány s cytoplazmatickými konci koreceptorů CD4 a CD8 [55]. V případě, že receptor T-lymfocytů (TCR) rozpozná specifický antigen prezentovaný hlavním histokompatibilním komplexem (MHC), dojde k reakci katalyzované Lck kinázou, která vede k fosforylaci intracelulárních řetězců molekuly CD3 a  $\zeta$ -řetězců TCR. Výsledkem sledu těchto reakcí je aktivace tyrosin kinázy ZAP-70, která katalyzuje fosforylaci dalších molekul zapojujících se do této signální dráhy [56].

Lyn kinázy jsou exprimovány hematopoetickými [57] a neuronálními buňkami [58]. Jejich přítomnost byla detekována v placentě, fetálním mozku, plicích, játrech a ledvinách [59]. Lyn kinázy se podílejí na inhibici proliferace myeloidních buněk [60]. Mimo to se Lyn kinázy účastní inzulínové signální dráhy. Aktivace Lyn kinázy v inzulínové signální dráze vede k fosforylaci substrátu inzulínového receptoru 1. Tato fosforylace zapříčiňuje zvýšení počtu glukozových transportéru 4 na buněčné membráně, což má za následek zvýšené využití glukózy [61]. Bylo také prokázáno, že aktivace Lyn kináz inhibuje hepatocelulární apoptózu a podporuje regeneraci jaterní tkáně [62].

### 2.2.3 Skupina III

Frk kinázy jsou převážně exprimovány epiteliálními buněčnými liniemi a tkáněmi, zejména jater, ledvin, prsu a tlustého střeva [63]. Frk kinázy negativně regulují proliferaci buněk. Dále pozitivně regulují stabilitu Fosfatázového a tenzinového homologu (PTEN), a to fosforylací Tyr336, což zabraňuje jeho ubiquitinaci a následné degradaci [64].

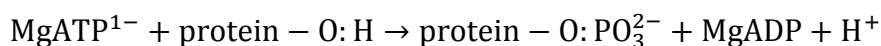
Srm kinázy jsou exprimovány v játrech, plicích, brzlíku, ledvinách, srdci nebo slezině. Ve velké míře jsou exprimovány také v keratinocytech [65].

Brk kinázy jsou typické pro epiteliální tkáň. Ve vysokém množství jsou exprimovány tkání tenkého střeva a prostaty. Jejich exprese stoupá v průběhu nádorového onemocnění prsu, vaječníku, tlustého střeva [66] a prostaty [67]. Brk kinázy se zapojují do různých signálních drah a podílejí se na rozvoji nádorových onemocnění. Jejich přesná funkce se liší v závislosti na typu buňky a intracelulární lokalizaci [68].

## 2.3 Src kinázy

Src kinázy se staly objektem intenzivního zkoumání v souvislosti s maligními transformacemi a onkogenezí. Většina studií zabývajících se touto problematikou vycházela z práce uveřejněné roku 1911. Tato práce pojednávala o viru Rousova sarkomu, virového nádorového onemocnění kuřat, jehož objevitelem se stal americký virolog Francis Peyton Rous [69]. Virový protein, jakožto v-Src je kódován rakovinnými onkogeny Rousova sarkomaviru, zatímco normální buněčný homolog Src je kódován fyziologickým genem [70].

Všechny protein kinázy včetně Src kináz katalyzují níže uvedenou reakci (Rovnice 1). Při této reakci dochází k přenosu fosfátové skupiny z vysokoenergetického donoru, jako je ATP na proteinový substrát. Dochází ke vzniku fosforylovaného proteinového substrátu a adenosindifosfátu (ADP). Ke správnému průběhu reakce je zapotřebí dvoumocného iontu, v tomto případě iontu  $Mg^{2+}$ . Tento proces je obecně nazýván jako fosforylace a jedná se o nejrozšířenější posttranslační modifikaci, která je využívána ke zprostředkování signálních transdukci [37].

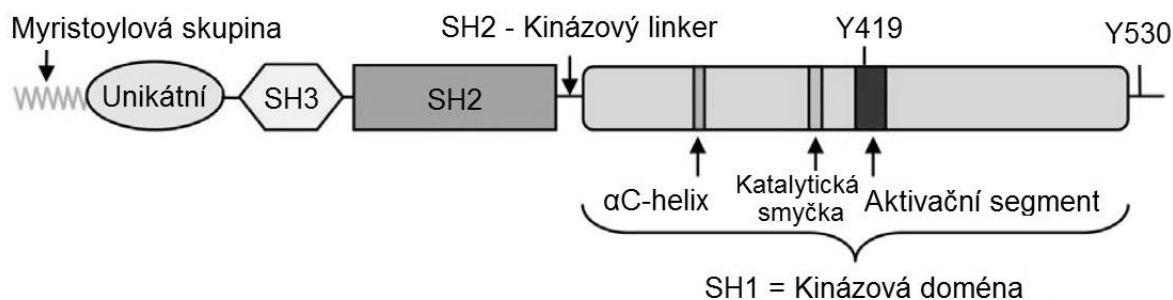


**Rovnice 1** Reakce katalyzovaná protein kinázami [37]

Src kinázy jsou exprimovány všudypřítomně. Nacházejí se v mozkové tkáni, osteoklastech nebo trombocytech. V porovnání s ostatními buňkami je exprese Src kináz v trombocytech mnohonásobně vyšší. Src kinázy jsou přítomny také ve fibroblastech, kde jsou spojeny s endozomy, perinukleární membránou, sekrečními vezikulami nebo cytoplazmatickou stranou plazmatické membrány, kde mohou interagovat s řadou růstových faktorů, integrinů a s receptory spřaženými s G proteinem. Touto cestou mohou sloužit jako základní zprostředkovatelé signálních transdukci [68]. Exprese vysokých hladin Src kináz v trombocytech a neuronech naznačuje, že se tyto kinázy podílejí i na jiných procesech [68] než je jen regulace apoptózy, progresu buněčného růstu, diferenciaci buněk a regulace imunitní odpovědi [39].

### 2.3.1 Struktura Src kináz

Lidský gen Src kináz kóduje řetězec 536 aminokyselin. Od N-konce Src kinázy ve své struktuře (Obr. 3) obsahují myristoylovou skupinu, unikátní doménu, doménu SH3, doménu SH2, SH2-kinázový linker, kinázovou doménu nazývanou také jako Src-homology (SH1) doména a C-terminální regulační segment. Mimo to tyto kinázy obsahují dvě důležitá regulační fosforylační místa, a to Tyr419 a Tyr530.



**Obr. 3** Struktura lidské Src kinázy, upraveno dle [71]

### Myristoylová skupina

Myristoylová skupina Src kináz je využívána k procesu myristoylace [68]. K úspěšnému průběhu myristoylace je potřeba enzymu N-myristoyl transferázy, jakožto katalyzátoru [72] a sedmi aminokyselin lokalizovaných na N-konci, přičemž první aminokyselinou v řetězci musí být glycin [73]. V průběhu toho procesu je čtrnácti-uhlíkatý myristát nasycených mastných kyselin kovalentně vázán k N-koncovému glycinovému zbytku prostřednictvím amidové vazby. Celá reakce v konečném důsledku vede k myristoylaci jakožto nevratné modifikaci [72]. Myristoylace je primárně využívána k ukotvení proteinu k buněčné membráně [68]. Nicméně samotná myristoylace není dostatečně silná a potřebuje druhý signál. Pro Src kinázy je druhým signálem interakce aminokyselin s kyselými fosfolipidy na vnitřní straně fosfolipidové dvojvrstvy. Téměř všechny ostatní kinázy patřící do Src kinázové rodiny jsou modifikovány připojením šestnácti-uhlíkatého palmitátu na cysteinové zbytky N-konce. Procesy myristoylace a palmitoylace spolu tvoří duální signální motiv, který umožňuje vazbu kináz k buněčné membráně. Samotná vazba k membránám je důležitá pro zprostředkování buněčných funkcí, a z tohoto důvodu Src kinázy, které nejsou myristoylované nemohou indukovat buněčnou transformaci [72].

### SH3 doména

SH3 doména má schopnost vázat se na sekvence, které mohou přijímat levostrannou šroubovicovou konformaci. Tato doména se skládá z 60 aminokyselinových zbytků. Celková struktura domény má charakter  $\beta$  barelu, skládajícího se z pěti antiparalelních  $\beta$  řetězců a dvou prominentních smyček nazývaných jako smyčka RT a smyčka n-Src. Tyto smyčky jsou lokalizovány po dvou stranách tak, aby ohraničovaly místo obsahující aromatické a hydrofobní zbytky. Místo mezi těmito dvěma smyčkami tvoří rozpoznávací místo pro proteinové sekvence nesoucí PxxP motiv, který se obvykle nachází v místech cílových proteinů bohatých na prolin. Proteinové sekvence nesoucí motiv PxxP využívají helikální strukturu polyprolinu typu II, která

kompletuje s doménou SH3. Proliny obsažené v těchto sekvencích v průběhu vazby interagují s aromatickými postranními řetězci na povrchu SH3 domény [74].

### **SH2 doména**

SH2 doména se skládá ze 100 aminokyselinových zbytků. Její struktura je složena z centrálního antiparalelního tří řetězcového  $\beta$  skládaného listu, který je z obou stran obklopen helixy nazývanými jako  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ , a ze dvou rozpoznávacích kapes [75]. První kapsa se nazývá fosfotyrosinová. Ve své struktuře obsahuje argininový zbytek a váže se na motiv pYEEI. Druhá kapsa se navazuje C-koncem na pTyr prostřednictvím jedné nebo více hydrofobních vazeb. SH2 doména se však může vázat také na řadu sekvencí, které neodpovídají optimálnímu motivu pYEEI. SH2 doména se může intramolekulárně vázat na pTyr530, který má vliv na inhibici aktivity proteinové kinázy. Přesná sekvence tohoto intramolekulárního místa je pYQPG. Jedná se tedy o jednu z neoptimálních vazebných sekvencí pro tuto doménu. Výsledkem je, že vazba na takovouto neoptimální sekvenci může být snadno nahrazena vazbou na sekvenci optimálnější, což v konečném důsledku může vést k aktivaci enzymu [76].

Doména SH3 a doména SH2 mají čtyři důležité funkce [68]. První z těchto funkcí je, že intramolekulárními kontakty omezují aktivitu enzymu. Druhou funkcí je, že proteiny, které obsahují vazebná místa pro SH3 a SH2 doménu, mohou s těmito doménami interagovat a lokalizovat se tak na specifická místa v buňce. Třetí funkcí je, že důsledkem intramolekulárního přemístování domény SH3 nebo SH2 může dojít se stimulací Src kinázové aktivity. Poslední funkcí je, že proteiny, které ve své struktuře obsahují vhodná vazebná místa pro tyto dvě domény, mohou preferenčně sloužit jako substráty pro Src kinázy [39].

### **Kinázová doména**

Sekundární struktura kinázové domény se skládá z velké karboxy-terminální smyčky, která je tvořena zbytky 341-520 a malé amino-terminální smyčky, která je tvořena zbytky 267-337. Mezi těmito dvěma smyčkami je lokalizováno aktivní místo kinázy.

Velká karboxy-terminální smyčka Src kináz je především helikálního charakteru a obsahuje šest segmentů nazývaných jako  $\alpha D$ - $\alpha I$  helixy [77]. První rentgenová struktura proteinové kinázy obsahovala krátký helix mezi aktivační sekvencí a  $\alpha F$  helixem. Tato struktura v té době nebyla nijak pojmenována [78]. S postupem času se ukázalo, že tento helix je přítomen ve všech strukturách proteinových kináz, včetně Src kináz, a stal se sedmým segmentem karboxy-terminální smyčky nazývaným jako  $\alpha EF$  helix. Důležitým místem této smyčky je  $\alpha F$  helix, který tvoří hydrofobní jádro. Mezi helixy  $\alpha H$  a  $\alpha I$  je přítomen  $\alpha HI$  helix.

Mimo to velká karboxy-terminální smyčka obsahuje sedm krátkých  $\beta$  řetězců značených jako  $\beta 6$ - $\beta 12$  [71].

Struktura malé amino-terminální smyčky je charakteristická přítomností regulačního  $\alpha C$ -helixu a pěti antiparalelních řetězců  $\beta 1$ - $\beta 5$ , které společně utvářejí strukturu  $\beta$ -skládaného listu [77]. Helix  $\alpha C$  má schopnost rotovat a překládat se s ohledem na zbytek smyčky tak, že umožňuje omezení přístupu k aktivnímu místu [68]. Celá tato smyčka se spolu s karboxy-terminální smyčkou primárně podílí na ukotvení a orientaci ATP. Součástí struktury této smyčky je také na glycin bohatá smyčka (G-rich), která tvoří část vazebného místa pro ATP [78].

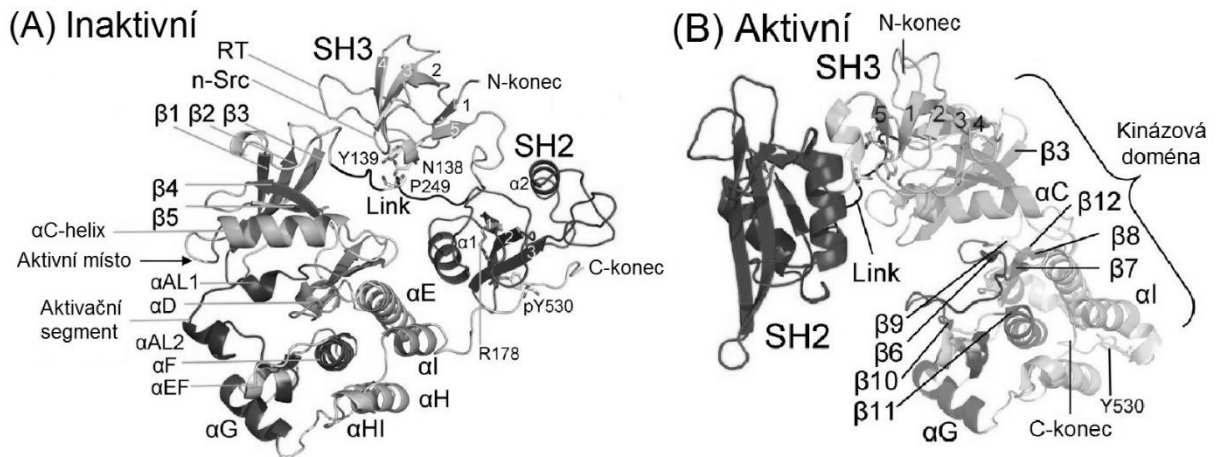
Jak už bylo zmíněno, aktivní místo Src kinázy se nachází mezi karboxy-terminální smyčkou a amino-terminální smyčkou. Tyto dvě smyčky se mohou navzájem pohybovat tak, že umožňují otevření nebo uzavření přístupu k aktivnímu místu. Otevření štěrbin mezi smyčkami je nezbytné pro vazbu ATP a uvolnění ADP, zatímco uzavření štěrbin je potřeba k převedení zbytků do aktivního místa [3]. Jednotlivé zbytky aktivního místa pocházejí z obou smyček, z čehož vyplývá, že jakékoliv změny v jejich orientaci mohou napomáhat nebo omezovat činnost kinázy. Jádro aktivního místa obsahuje K/D/D motiv zbytků, který určuje katalytické vlastnosti kinázy [79]. Lys295 představuje invariantní zbytek, který tvoří iontové páry s  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosfáty ATP. Asp386 orientuje skupinu proteinového substrátu nesoucí tyrosin do katalytického místa. Mimo to může Asp386 fungovat jako katalytická báze, která odebírá proton z tyrosinu, čímž napomáhá nukleofilnímu ataku atomu  $\gamma$ -fosforu MgATP. Asp404 je první zbytek aktivační smyčky nacházející se v karboxy-terminální smyčce. Asp404 váže  $Mg^{2+}$  podporující katalytickou reakci [80].

Aktivační segment je místem lokalizace jednoho z nejdůležitější regulačních míst fosforylace Src kináz, a to Tyr419. Aktivační segment inaktivní Src kinázy obsahuje helixy  $\alpha AL1$ ,  $\alpha AL2$  a  $\alpha EF$ , zatímco aktivační segment aktivní Src kinázy postrádá helixy  $\alpha AL1$ ,  $\alpha AL2$  a obsahuje pouze helix  $\alpha EF$  [71].

### **Regulační místa**

V molekule Src kinázy jsou přítomna dvě důležitá regulační fosforylační místa. První z těchto regulačních míst je Tyr530 nacházející se v C-terminálním regulačním segmentu. Tyr530 se intramolekulárně váže na doménu SH2 a za běžných podmínek *in vivo* je fosforylován v 90 až 95 % případů [81]. Jeho fosforylace je důsledkem aktivity jiných tyrosin kináz, včetně Csk a Chk [82]. Řadí se mezi inhibiční regulátory fosforylace [68].

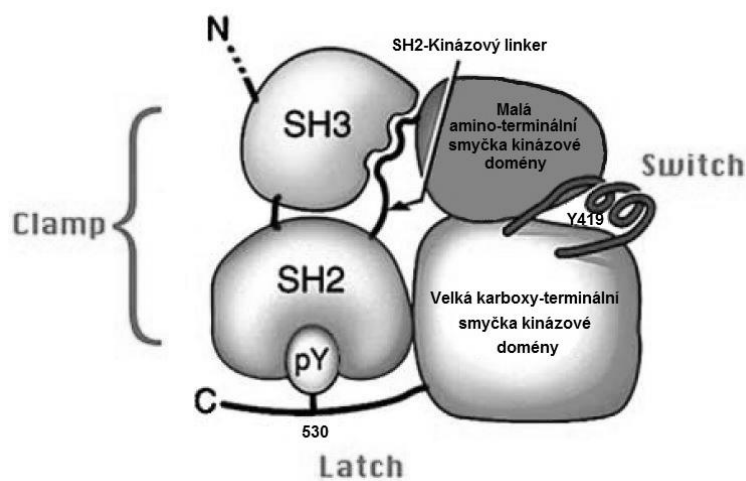
Src kinázy mohou podstoupit také proces intramolekulární autofosforylace, která je katalyzována jinou Src molekulou. K tomuto procesu autofosforylace dochází na Tyr419, který je lokalizován v aktivační smyčce kinázové domény. Tyr419 je druhým důležitým stimulačním regulátorem fosforylace Src kináz, a to z důvodu, že jeho fosforylace podporuje kinázovou aktivitu [68]. Na Obr. 4 je znázorněna podrobná struktura inaktivní a aktivní Src kinázy.



**Obr. 4** Sekundární struktura (A) inaktivní a (B) aktivní lidské Src kinázy, upraveno dle [71]

### 2.3.2 Regulace aktivity Src kináz

Jedny z prvních studií zabývajících se regulací Src kináz vedly k názoru, že na inhibici aktivity těchto kináz se podílejí SH2 a SH3 domény, a to přesněji blokací aktivního místa. Nicméně pozdější trojrozměrné strukturální analýzy ukázaly, že tento názor je mylný [78]. Systém regulující aktivitu Src kináz se skládá ze tří složek, které Harrison označuje jako latch, clamp, switch [83]. Schéma systémů regulujících aktivitu Src kináz je znázorněno na Obr. 5.



**Obr. 5** Systémy regulující aktivitu Src kináz: latch, clamp, switch, upraveno dle [83]



Doména SH2 se váže na Tyr530 C-terminálního regulačního segmentu, čímž vzniká složka latch, stabilizující připojení SH2 domény [71]. Příkladem poškození tohoto systému je ptačí onkogenní forma Src kináz, která v C-terminálním regulačním segmentu postrádá tyrosin, který slouží jako inhibiční regulátor fosforylace. Z toho důvodu je onkogenní forma Src kinázy konstitutivně aktivována [84].

Složka clamp sdružuje dohromady SH2 a SH3 domény, které se připojují ke kinázové doméně. Sdružením SH2 domény s doménou SH3 a připojením tohoto celku ke kinázové doméně dochází k vytlačení  $\alpha$ C helixu a kritického Glu313 z jejich původní lokalizace, což vede k autoinhibici enzymové aktivity [83].

Složka switch se týká aktivační smyčky kinázové domény. Díky této složce může aktivační smyčka přecházet z inaktivní konformace na konformaci aktivní, a to přesněji autofosforylací Tyr419 katalyzovanou jinou Src kinázou [83].

### **Unlatching, unclamping a switching**

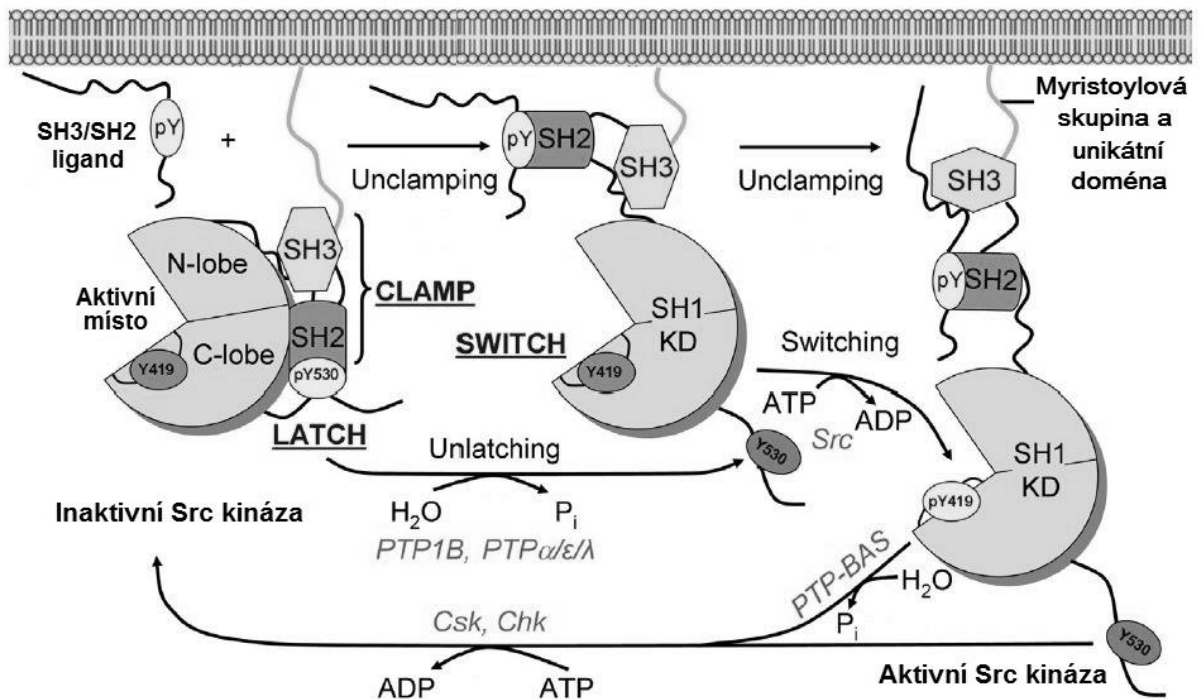
Inaktivní Src kinázy jsou charakteristické lokalizací pTyr530 ve vazebné kapse SH2 domény. Procesem zvaným unlatching může dojít k uvolnění pTyr530 z vazebné kapsy SH2 domény. V důsledku uvolnění pTyr530 dochází také k procesu zvanému unclamping, který neumožňuje dále blokovat kinázovou doménu a udržovat jí tak v inaktivní konformaci. Uvolněný pTyr530 podléhá defosforylaci katalyzované různými tyrosin fosfatázami, což vede k přeměně enzymu na jeho aktivní formu [83]. Mezi fosfatázy umožňující tuto defosforylaci patří například protein tyrosin fosfatáza 1B nebo transmembránové enzymy zahrnující CD45, protein tyrosin fosfatázu  $\alpha$ , protein tyrosin fosfatázu  $\epsilon$  a protein tyrosin fosfatázu  $\lambda$  [85]. Proces unlatching je následován procesem zvaným switching, který je charakteristický autofosforylací Tyr419 katalyzovanou jinou Src kinázou. Následně je Src kináza stabilizována v její aktivní formě [86]. Schéma procesu unlatching, unclamping, a switching je znázorněno na Obr. 6.

### **Přechod aktivní formy na formu inaktivní**

Pro přechod Src kináz z jejich aktivní formy na formu inaktivní je potřeba protein tyrosin fosfatáz BAS. Jedná se o všudypřítomně exprimované cytosolové fosfatázy, jejichž označení BAS značí jejich prvotní identifikaci u basofilů. Protein tyrosin fosfatázy katalyzují defosforylaci pTyr419 zpět na jeho nefosforylovanou formu Tyr419 [85]. V následující reakci dochází k obnovení intramolekulárních vazeb mezi doménou SH2 a SH3 [87].

Posledním krokem vedoucím k inaktivaci Src kináz je fosforylace Tyr530 lokalizovaného na C-terminálním regulačním segmentu a obnovení složky latch. Takovouto

fosforylaci mohou katalyzovat dva typy kináz, a to Csk kináza a Chk kináza [88]. Csk kináza byla první identifikovanou kinázou, která byla prokazatelně spojena s fosforylací Src kináz na Tyr530. Csk kináza je exprimována ve všech savčích buňkách, zatímco exprese Chk kinázy je omezena pouze na hematopoetické buňky, neurony a varlata [68]. Schéma přechodu aktivní formy Src kinázy na formu inaktivní je uvedeno na Obr. 6.



**Obr. 6** Regulace aktivity Src kináz, upraveno dle [71]

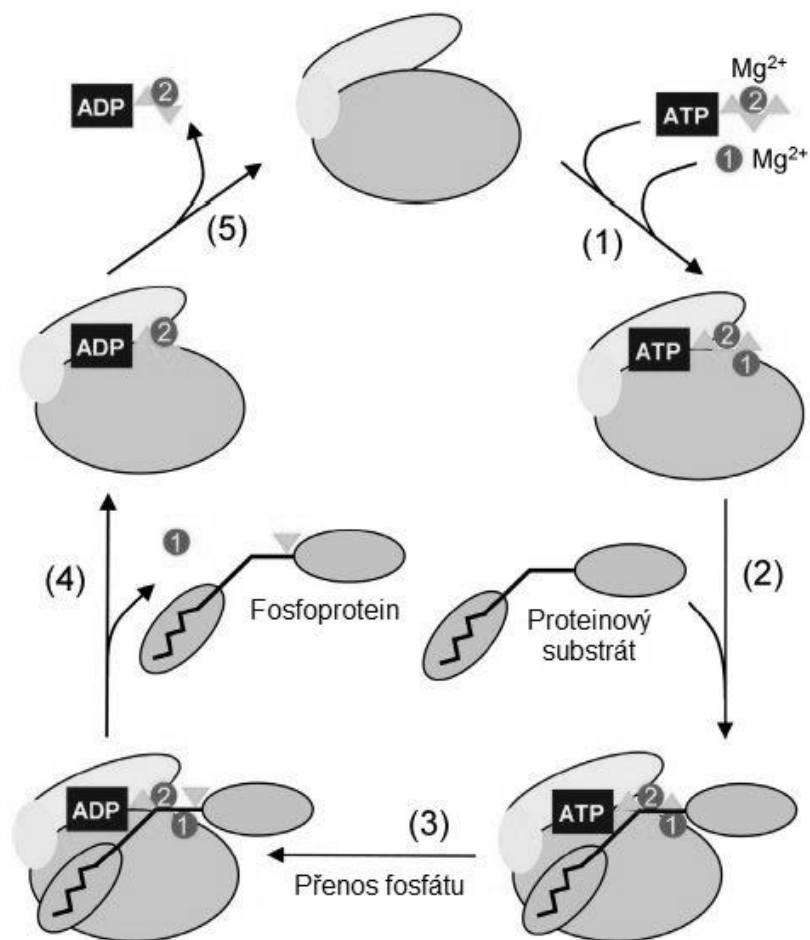
### Role hořčnatých iontů v průběhu katalytického procesu

Src kinázy vyžadují přítomnost dvojmocného kationtu pro správný průběh katalytické reakce. Ve většině případů tyto enzymy využívají kationty hořčnaté nebo manganaté. V důsledku toho, že intracelulární koncentrace hořčíku je ve srovnání s intracelulární koncentrací manganu mnohonásobně vyšší, jsou hořčnaté kationty považovány za důležitější pro správný rozvoj katalytické aktivity a ve srovnání s kationty manganatými jsou těmito enzymy častěji využívány. V průběhu katalytické reakce je potřeba dvou kationtů hořčnatých, přičemž jeden je nutnou součástí nukleotidového substrátu MgATP, zatímco druhý kationt vstupuje do reakce samostatně a interaguje s komplexem enzym-kov-nukleotid, čímž napomáhá ke zvýšení katalytické aktivity enzymu [71].

V souvislosti se studiem úlohy hořčnatých iontů v průběhu katalytického procesu proteinových kináz bylo prováděno mnoho studií. Armstrong et al. potvrdili, že katalytická podjednotka proteinových kináz v přítomnosti nukleotidového ADP obsahuje dvě vazebná

místa pro hořečnaté kationty. V průběhu studie také upozorovali, že se zvyšující se koncentrací hořečnatých kationtů dochází k nárůstu reakční rychlosti, nicméně při dosažení koncentrace 75 M hořečnatých kationtů došlo naopak k poklesu reakční rychlosti [89]. Jacobsen et al. se ve své studii zabývali zkoumáním úlohy hořečnatých kationtů, k čemuž využívali reakční kinetiku v rovnovážném stavu, rentgenovou krystalografii a molekulární simulace dynamiky. Jejich studie prokázala, že hořečnaté kationty jsou nezbytné pro efektivní přenos fosfátu. Dále potvrdili, že mobilita ADP je omezená v případě, kdy jsou na ADP vázány dva kationty hořčíku ve srovnání s vazbou jednoho kationtu hořčíku [90]. Pořadí vazby jednotlivých hořečnatých iontů bylo dlouho nejasné [91]. Výsledky studie Armstronga et al. uvádí, že vazba dvojmocného kationtu je v nepřítomnosti ADP nebo ATP velmi slabá. Tento poznatek odpovídá tomu, že v prvním kroku reakce dochází k vazbě jednoho hořečnatého kationtu na nukleotidový ATP a následně až k vazbě druhého hořečnatého kationtu na komplex enzym-kov-nukleotid [89]. Pořadí uvolnění hořečnatých kationtů je nejasné, nicméně je známo, že hořečnatý kationt vázaný na ADP se uvolňuje v posledním, rychlost omezujícím kroku katalytické reakce [92].

Na Obr. 7 je znázorněno schéma průběhu katalytické reakce protein kináz. V prvním kroku do reakce vstupuje nukleotidový substrát MgATP a samostatný hořečnatý kationt. Nejdříve dochází k vazbě nukleotidového substrátu MgATP do příslušného místa enzymu a až poté dochází k vazbě druhého hořečnatého kationtu na komplex enzym-kov-nukleotid. V kroku druhém do reakce vstupuje peptidový substrát, který se vhodně orientuje a váže se do aktivního místa enzymu. V kroku třetím dochází k přenosu fosfátové skupiny na peptidový substrát. V kroku čtvrtém nastává uvolnění fosfoproteinu a jednoho hořečnatého kationtu, který byl původně vázán na komplex enzym-kov-nukleotid. V kroku posledním, pátém se uvolňuje nukleotidový substrát MgADP [71].



**Obr. 7** Schéma průběhu katalytické reakce protein kináz, upraveno dle [71]

### v-src kinázy

Onkogen v-src vzniká transdukcí genu c-Src kuřat benigním virem leukózy ptáků. Src gen je ve virovém genomu exprimován ve formě fosfoproteinů o velikosti 60kDa, taktéž značeného jako pp60v-src. Buněčná transformace je výsledkem nadměrné fosforylace pp60v-src. Geny c-Src jsou exprimovány ve formě fosfoproteinů o velikosti taktéž 60kDa, značených jako pp60c-Src. Pp60c-Src jsou přítomny v genomu eukaryot. Ve srovnání je pp60c-Src méně aktivní pp60v-src a neindukuje buněčnou transformaci, i když je exprimován v hladinách srovnatelných s hladinami pp60v-src. Vyšší aktivita pp60v-src je dána nepřítomností jednoho z regulačních míst, a to Tyr530 nacházejícího se na C-terminálním konci, jehož nepřítomnost má za následek neschopnost inhibice aktivity tohoto enzymu [93].

### 2.3.3 Přehled regulačních funkcí Src kináz v lidském organismu

Src kinázy se v lidském organismu podílejí na širokém spektru funkcí, přičemž mnoho z nich je spojeno s rozvojem nádorových onemocnění. Src kinázy regulují například buněčnou adhezi, kdy pro správný průběh adheze, migrace, či dělení buněk jsou důležitá buněčná spojení,

a to především *zonula occludens* a *zonula adhaerens*. Právě Src kinázy jsou jedny z hlavních enzymů podílejících se na vzniku a odstranění těchto buněčných spojů [94]. V průběhu vzniku nebo odstranění těchto spojů jsou Src kinázy přidružovány k plazmatické membráně prostřednictvím myristoylové skupiny, poté jsou aktivovány a translokovány na membránově-cytoskeletární rozhraní, kde katalyzují vznik nebo odstranění buněčných spojů [95]. Aktivované formy Src kináz tvoří na periferiích buněk komplexy s cytoplazmatickými proteiny, mezi něž patří například fokální adhezivní kináza (FAK) [96]. Src kinázy ve spolupráci s FAK zprostředkovávají přenos signálů z extracelulárního komplexu matrix-integrin do vnitřního prostoru buňky, čímž ovlivňují buněčnou motilitu, proliferaci a přežití [97].

Src kinázy se také podílejí na aktivaci signálních drah zprostředkovaných receptory. V tomto případě signální dráhy růstových faktorů aktivované RTKs mohou dále aktivovat Src kinázy. U většiny nádorových onemocnění je tato signální dráha narušena a to tak, že nádorově zvrhlé buňky nadměrně exprimují, nebo mají konstitutivně aktivovanou signalizaci RTKs a v důsledku toho zvýšeně exprimují nebo aktivují Src kinázy [98].

Prováděné studie naznačují, že Src kinázy se mohou podílet také na regulaci progresu buněčné proliferace a mitogeneze [99]. Src kinázy jsou dočasně aktivovány během přechodu z G2 do M fáze a jejich aktivace je nezbytná pro efektivní buněčné dělení [100].

Další regulační funkce Src kináz je spojena s regulací angiogeneze. Dysregulace angiogeneze je jednou z častých příčin nádorových onemocnění. Samotný proces angiogeneze je regulován širokým spektrem cytokinů podporujících migraci a proliferaci endotelových buněk [101]. Aktivace Src kináz má v procesu angiogeneze za následek zvýšení exprese proangiogenních cytokinů, mezi něž se řadí například VEGF nebo interleukin 8 [101].

Regulace remodelace kostní tkáně a vzniku kostních metastáz je dalším regulačním mechanismem Src kináz. V tomto případě Src kinázy fungují jako centrální regulátory remodelace kostní tkáně, což bylo prokázáno na myších prostých Src kináz, jež byly vysoce náchylné k rozvoji osteoporózy [102]. Výskyt Src kináz je navíc výrazně zvýšen u funkčních osteoklastů. Přerušení signalizace zprostředkované Src kinázami právě u těchto osteoklastů zabraňuje jejich migraci a následné resorpci kostní tkáně [103].

Src kinázy se podílejí také na regulaci zánětlivé reakce, při níž se zapojují do signálních drah spjatých s Toll-like receptory (TLRs) [104]. Například TLR2 je stimulován lipoproteiny gram pozitivních bakterií, a právě Src kinázy jsou široce využívány v dalších

reakcích této signální dráhy [105]. V případě TLR3, který je stimulován virovými ligandy, Src kinázy interagují s cytoplazmatickým koncem tohoto receptoru a prostřednictvím dalších regulačních mechanismů indukují antivirové účinky [106]. Posledním příkladem je TLR4, který se podílí na regulaci obranných mechanismů. Doposud není známo, zda se Src kinázy přímo váží na TLR4. Nicméně molekula CD14, o níž je známo, že tvoří komplex s TLR4, se sdružuje s Src kinázami, což naznačuje tomu, že Src kinázy s tímto receptorem interagují [107].

Další regulační funkcí Src kináz je regulace mitochondriálních funkcí. Src kinázy jsou citlivé na redoxní změny, a proto oxidace těchto kináz vede k jejich aktivaci. Hlavní cesta aktivující Src kinázy v mitochondriích je katalyzována tyrosin fosfatázami, které mohou být aktivovány zvýšením mitochondriální koncentrace vápníku. Stejně jako Src kinázy jsou tyrosin fosfatázy citlivé na redoxní změny a jejich oxidace inhibuje jejich aktivitu. Src kinázy se v mitochondriích podílejí především na regulaci oxidativní fosforylace a apoptózy [108].

Src kinázy se podílejí také na regulaci pannexinových kanálů centrálního nervového systému. Pannexinové kanály jsou membránové molekuly, které regulují průchod iontů, malých molekul a metabolitů mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Pannexinové kanály podléhají posttranslačním modifikacím, z nichž právě fosforylace má zásadní vliv na jejich funkčnost. Poslední studie naznačují, že právě Src kinázy se ve velké míře podílí na regulaci aktivity těchto kanálů [109].

#### **2.3.4 Substráty Src kináz**

Osmdesátá léta minulého století byla obdobím objevu onkogenních signálních drah zprostředkovaných v-src kinázami [110] a dalšími protein tyrosin kinázami [111]. Objev onkogenních signálních drah vedl také ke snahám identifikovat substráty kináz účastnících se těchto signálních drah. Identifikace substrátů RTKs byla usnadněna tvorbou ligandem indukovaného komplexu receptor-substrát, který mohl být následně imunoprecipitován. Naopak tomu bylo v případě substrátů Src kináz, kdy při identifikaci těchto substrátů muselo dojít k mnoha technickým omezením. Samotná identifikace substrátů Src kináz byla velmi zdoluhavým a pracovně náročným procesem, který zahrnoval značení Src-transformovaných buněk izotopem fosforu, následnou separaci radioaktivně značených fosfoproteinů pomocí 2D polyakrylamidové gelové elektroforézy a alkalické ošetření v gelu, které vedlo ke štěpení fosfoserinu a fosfothreoninu a odstranění intaktního pTyr. V průběhu času se metoda ukázala jako nedostatečně účinná a do roku 1988 bylo touto metodou identifikováno jen několik málo substrátů, mezi něž se řadí například  $\beta$ 1-integrin, talin, vinculin, fosfatidylinositol-3 kináza,

calpactin nebo mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) [112]. Tato metoda potýkající se s mnoha technickými problémy byla v průběhu času nahrazena metodou využívající specifických protilátek namířených proti pTyr [113], které se za vhodně nastavených podmínek navazují na proteiny obsahující pTyr. Takto značené proteiny je následně možno imunoprecipitovat nebo vizualizovat metodou Western blot [114].

### **Substráty Src kináz využívané k fosforylacím *in vivo***

S přibývajícími studii, zabývajícími se úlohou Src kináz v lidském organismu a jejich zapojením v různých signálních drahách, neustále narůstá i počet identifikovaných substrátů účastnících se fosforylací *in vivo*. Mezi takovéto substráty patří například cortactin, AFAP1, p130CAS, FAK nebo p120-catenin [115].

Cortactin, také často označován jako p85, je lokalizován především na kortikálním aktinovém cytoskeletu [116] a je fosforylován zástupci Src kinázové rodiny po předchozí aktivaci receptoru pro FGF. Hlavní funkcí tohoto proteinu je podpora polymerizace aktinového cytoskeletu a také se významně podílí na migraci a endocytóze buněk [117].

AFAP1 byl původně označován jako tyrosin-fosforylovaný protein o velikosti 110 kDa. Imunofluorescenční analýza buněk zaměřená na tento protein odhalila, že je asociován především s aktinovými filamenty. Díky karboxyterminálnímu leucinovému motivu je AFAP1 schopen multimerizovat a napomáhat tak k zesílení aktinových vláken [115].

Protein p130CAS je dalším ze zástupců substrátů Src kináz. Jeho hlavní funkce je spojena především s buněčnou adhezí [118]. Fosforylace p130CAS je výslednou reakcí na interakci integrinů. Tento protein je lokalizován do centrálních míst adheze a má důležitou úlohu jak v průběhu adheze, tak v průběhu cytoskeletární remodelace a migrace buněk [115].

FAK, taktéž označována jako p125, se nachází především ve místech fokálních adhezí. Hlavním fosforylačním místem tohoto substrátu je Tyr397, který tvoří vazebné místo pro SH2 doménu Src kináz. V důsledku fosforylace je FAK schopna podílet se na regulaci signálních drah ovlivňujících například buněčný růst nebo pohyblivost buněk [115].

P120-catenin je ve srovnání s ostatními substráty odlišný tím, že jeho fosforylace koreluje s mírou transformace buněk, což nasvědčuje tomu, že by se tento substrát mohl významně podílet na mechanismech souvisejících s transformací buněk. Mimo to je také významným regulátorem buněčné adheze [119].

### **Substráty Src kináz využívané k fosforylacím *in vitro***

Jako substráty Src kináz využívané k fosforylacím *in vitro* slouží krátké syntetické peptidové řetězce, které obsahují aminokyselinovou sekvenci shodnou se sekvencí části řetězce proteinu využívaného organismem k fosforylacím *in vivo*. Tyto syntetické substráty slouží v laboratorní praxi například ke zjištění aktivity nebo stability jak solubilních, tak i imobilizovaných enzymů, optimalizaci reakčních podmínek nebo zjištění průběhu dané reakce. Příkladem takového syntetického substrátu je například protein o aminokyselinové sekvenci KVEKIGEGTYGVVYK. Tato sekvence se v lidském organismu vyskytuje mezi pozicemi 6 až 20 aminokyselinového řetězce kinázy, označované také jako p34cdc2, která je *in vivo* fosforylována Src kinázami [120]. Dalším příkladem je syntetický substrát o aminokyselinové sekvenci YIYGSK, který je vysoce specifický pro celou Src kinázovou rodinu [121].

### **2.3.5 Inhibitory Src kináz**

Studie, zabývající se návrhem a následnou syntézou vhodných inhibitorů Src kináz, jsou zaměřeny na rozvoj nových farmaceutických prostředků využitelných především v onkologii. Src kinázy nejsou samy o sobě primárním spouštěčem tumorigeneze, ale jsou spíše považovány za účastníky mnoha signálních drah, které se společně podílejí na proliferaci a přežití nádorově zvrhlých buněk. Proto je velice nepravděpodobné, že by monoterapie zaměřená pouze na inhibici samotných Src kináz byla v onkologické léčbě účinná. Z tohoto důvodu se ve většině případů syntetizují inhibitory, které regulují několik signálních drah zároveň a tím zvyšují účinek onkologické léčby [71].

Nejčastěji využívanou skupinou inhibitorů jsou takzvané ATP-kompetitivní inhibitory, které mají schopnost soutěžit o vazebné místo enzymu s molekulou ATP. Část vazebného místa pro molekulu ATP tvoří smyčka bohatá na glycin, která je přítomna napříč celým spektrem proteinových kináz. Na glycin bohatá smyčka tvoří víčko nad navázanou molekulou ATP a je jednou z nejpohyblivějších částí proteinových kináz. Její vysoká pohyblivost je pravděpodobně způsobena nutností kinázy v prvním kroku vázat molekulu ATP a následně ihned uvolňovat molekulu ADP. Samotný fosfát molekuly ATP je ve smyčce bohaté na glycin vázán pomocí třetího glycinu a předposledního fenylyalaninu [122].

ATP-kompetitivní inhibitory Src kinázy se dělí do dvou hlavních tříd, a to třídy typu I a třídy typu II [123]. Inhibitory třídy typu I jsou charakteristické svou vazbou na DFGD motiv Src kináz, zatímco inhibitory třídy typu II jsou charakteristické svou vazbou na DGFD motiv



Src kináz [124]. Mezi zástupce kompetitivních inhibitorů Src kináz se řadí například léčiva známá pod názvy Bosutinib, Dasatinib, Ponatinib, Vandetanib nebo Saracatinib [71]. Díky rentgenové krystalografii bylo zjištěno, že právě Dasatinib [124] a Bosutinib patří do třídy inhibitorů Src kináz typu I [123].

### **Bosutinib**

Bosutinib je syntetickým derivátem chinolonu, který funguje jako duální ATP-kompetitivní inhibitor kináz. Jeho mechanismem účinku je kompetitivní inhibice jak BCR-Abl tyrosin kináz, tak některých členů Src kinázové rodiny, mezi něž patří Src kinázy, Lyn kinázy a Hck kinázy. Inhibice skupiny těchto kináz vede k útlumu buněčného růstu a navození apoptózy [125]. Bosutinib se v současné době používá k léčbě chronické myeloidní leukémie s pozitivním nálezem Philadelphského chromozomu a při léčbě akutní lymfoblastické leukémie taktéž s pozitivním nálezem Philadelphského chromozomu. Další klinické studie Bosutinibu mohou rozšířit spektrum jeho uplatnění, přičemž v současné době připadá v úvahu možnost jeho využití při léčbě nádoru prsu a glioblastomu [71].

### **Dasatinib**

Dasatinib je další ze zástupců ATP-kompetitivních inhibitorů kináz. Jeho mechanismem účinku je kompetitivní inhibice BCR-Abl tyrosin kinázy a některých členů Src kinázové rodiny, mezi něž se řadí Lck kinázy, Fyn kinázy a Yes kinázy [71]. Dasatinib je využíván pro léčbu pacientů s chronickou myeloidní leukémií a u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií v obou případech se současným pozitivním nálezem Philadelphského chromozomu [126].

### **Ponatinib**

Ponatinib je taktéž ATP-kompetitivní inhibitor kináz. Jeho mechanismem účinku je ATP-kompetitivní inhibice BCR-Abl tyrosin kináz, zástupců Src kinázové rodiny a celé řady buněčných receptorů, jako jsou receptory pro VEGF nebo receptory pro FGF [71]. Ponatinib se stejně jako v předcházejících dvou případech využívá při léčbě chronické myeloidní leukémie s pozitivním nálezem Philadelphského chromozomu a při léčbě akutní lymfoblastické leukémie taktéž s pozitivním nálezem Philadelphského chromozomu [127]. Další možností využití tohoto léčiva je při léčbě nádorového onemocnění jater, žlučníku, štítné žlázy nebo malobuněčného karcinomu plic [128].

### **Vandetanib**

Vandetanib je léčivo inhibující členy Src kinázové rodiny, RET tyrosin kinázy a buněčné receptory, mezi něž se řadí receptory pro VEGF nebo receptory pro EGF [71]. Vandetanib se využívá především při léčbě nádorového onemocnění štítné žlázy [129].

### **Saracatinib**

Saracatinib je léčivo inhibující jak BCR-Abl kinázy, tak i členy Src kinázové rodiny. Jeho účinky jsou zkoumány v souvislosti s léčbou kolorektálního karcinomu, nádorového onemocnění žaludku, vaječníků a malobuněčného karcinomu plic [71].

### **Další inhibitory**

Mimo výše zmíněné inhibitory Src kináz byla prováděna studie, při níž byla hodnocena řada cyklických a lineárních peptidů, které měly sloužit jako inhibitory Src kináz. Struktury těchto lineárních i cyklických peptidů se navzájem lišily přítomností různých aminokyselin. Tato studie vedla ke zjištění, že lineární peptidy vystupující jako inhibitory mají omezenou stabilitu a špatnou biologickou dostupnost především v důsledku toho, že jsou proteolyticky degradovány buněčnými proteázami. Pro zvýšení stability, účinnosti a selektivity těchto lineárních peptidů by bylo zapotřebí dalších syntetických modifikací. Dále bylo zjištěno, že cyklické peptidy obsahující ve své struktuře arginin a tryptofan fungují jako nejlepší inhibitory Src kináz. Samotná cyklizace má za následek zvýšení stability inhibitoru a také zvýšení jeho afinity [130].

## 2.4 Ukotvení enzymů k pevnému nosiči

Enzymy jsou široce využívány napříč rozsáhlým spektrem průmyslových odvětví, nejčastěji v průmyslu potravinářském, chemickém a farmaceutickém. Využívání solubilních forem enzymů v průmyslových procesech je doprovázeno nedostatečně dlouhou dobou provozní stability enzymů, krátkou skladovací dobou a nemožností opakovaného použití. Všechny tyto zásadní nevýhody solubilních forem enzymů je možno překonat takzvanou imobilizací enzymů [131].

Pojem imobilizace enzymů popisuje proces vedoucí k ukotvení enzymu k pevnému nosiči. Obecně je v biotechnologii imobilizace popisována jako proces používaný k fyzikální nebo chemické fixaci buněk, organel, enzymů nebo jiných proteinů, jako například monoklonálních protilátek na pevný nosič, do pevné matrice nebo pro zadržení membránou. Proces imobilizace je prováděn především za účelem zvýšení stability imobilizované látky a možnosti jejího opakovaného použití [132].

Pojem imobilizovaný enzym je definován jako enzym vázaný na organickou nebo anorganickou matici nebo také jako enzym zadržený membránou. Samotná imobilizace enzymu vede primárně ke zvýšení stability enzymu, možnosti jeho opakovaného použití [133], zvýšení jeho odolnosti vůči změnám životního prostředí, možnosti rychlého ukončení reakce, snadné separaci imobilizovaného enzymu z reakční směsi a možnosti kontinuálního provozu enzymatických procesů. Nicméně imobilizované enzymy mají i své nevýhody a to například, že jsou charakteristické složitějším přístupem substrátu do aktivního místa enzymu [131]. Tyto nevýhody je však možno eliminovat výběrem vhodného materiálu nosiče, formou nosiče a způsobem vazby enzymu.

Imobilizační metody neboli metody, kterými je možno ukotvit enzymy k pevnému nosiči, se zpravidla dělí na imobilizační metody reverzibilní a imobilizační metody irreverzibilní. Reverzibilní imobilizační metody jsou charakterizovány možností uvolnění enzymu z vazby na nosič, a to, aniž by došlo ke snížení aktivity enzymu nebo porušení nosiče. Uvolnění enzymu z vazby na nosič je možno navodit například změnou pH, reakční teploty, iontové síly nebo polaroty rozpouštědla. Mezi reverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči patří adsorpce, vazba pomocí kovu, vazba pomocí disulfidických můstků nebo různé druhy bioafinitních interakcí. Naopak imobilizační metody irreverzibilní jsou charakterizovány nemožností uvolnění enzymu z vazby na nosič, aniž by nedošlo ke ztrátě aktivity enzymu nebo

porušení nosiče. Mezi irreverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči patří kovalentní ukotvení, fyzické zachycení nebo cross-linking.

## **2.4.1 Reverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči**

### **Adsorpce**

Adsorpce se řadí mezi nekovalentní metody imobilizace. Zpravidla je dělena do dvou skupin, a to na pasivní adsorpci na hydrofobních površích nebo na adsorpci pomocí elektrostatických interakcí s nabitými povrchy. Obecnou výhodou adsorpce je, že není potřeba žádné předchozí modifikace enzymu, aby došlo k úspěšné imobilizaci. Jelikož je adsorpce nekovalentní metodou, potýká se také s nevýhodami, sice že tato imobilizace zahrnuje pouze relativně slabé a reverzibilní interakce. Mimo to adsorpce proteinů na různé druhy povrchů často vede ke konformačním změnám a denaturaci proteinů, které mohou mít za následek masivní ztrátu biologické aktivity proteinu. Mezi nejvíce rozšířenou modifikaci adsorpce patří použití nitrocelulózových membrán a skel potažených polylysinem určených pro elektrostatickou adsorpci enzymů [131]. Další možností modifikace je adsorpce na mezoporézní silikáty. Tyto mezoporézní silikáty jsou charakteristické povrchem amorfního křemíku a póry o velikosti v rozmezí 20-300 Å. A právě tyto pravidelně se opakující mezoporézní struktury nabídl možnost adsorpce, popřípadě i zachycení velkých molekul přímo uvnitř pórů. Mezoporézní silikáty jsou chemicky a mechanicky stabilní a jejich povrch je možno modifikovat různými funkčními skupinami a regulovat tak průběh imobilizace [134].

### **Vazba pomocí kovů**

Vazba pomocí kovů, také často nazývaná jako immobilized metal-ion affinity, je široce vyžívanou metodou pro dočasné zachycení proteinů především v průběhu procesu jejich čištění. Asi nejznámější afinitní značkou využívanou v této metodě je polyhistidinová kotva. Tato polyhistidinová kotva se skládá z šesti sekvenčních histidinových zbytků, které mají schopnost chelátovat s přechodnými kovy, jako je nikl, zinek nebo měď, jež jsou pevně vázány na povrchu vhodného nosiče. Nevýhoda této metody je spojena s poměrně nízkou silou vazebných interakcí. Uvolnění enzymu nebo jiného proteinu z vazby na nosič je možno navodit například dostatečnou změnou pH [135].

### **Vazba pomocí disulfidických můstků**

Tato metoda imobilizace je založena na tvorbě disulfidických můstků mezi enzymem a nosičem. Enzymy, které nesou neesenční skupiny thiolu, které nejsou nutné k zachování struktury a aktivity enzymu, mohou být imobilizovány na nosiče nesoucí na svém povrchu

reaktivní disulfidy nebo oxidy disulfidu, jako jsou thiosulfínátové nebo thiosulfonátové skupiny. Výhodou této metody je především její vratnost, která může být navozena reakcí s vhodným činidlem, jako je například dithiothreitol. Při reakcích s činidly, jako je zmíněný dithiothreitol, dochází k degradaci imobilizovaného enzymu daleko rychleji než k degradaci samotného nosiče, což umožňuje opětovné použití nosiče v dalších procesech [136].

### **Bioafinitní interakce**

Bioafinitní imobilizace jsou založeny na bioafinitních interakcích utvářejících se mezi afinitními páry. Existuje velké množství afinitních párů, přičemž mezi nejznámější patří biotin-avidin nebo protilátka-antigen. Bioafinitní imobilizace se dále dělí na dva typy. V případě prvním je na matici předem vázán ligand, který má afinitu k enzymu, zatímco v případě druhém je enzym konjugován s jinou molekulou, která má afinitu k matici. Použití afinitního páru antigen-protilátka je primárně spojeno s metodou afinitní chromatografie využívané především k izolaci specifických proteinů ze směsi. Tyto afinitní páry mohou být využity také k imobilizaci enzymů, ale potýkají se s několika nevýhodami. Jednou z nevýhod je, že pro jednotnou a dostatečnou imobilizaci je potřeba monoklonálních protilátek, s jejichž použitím se zvyšují i náklady dané metody. Relativně slabá vazba, vznikající mezi afinitním párem antigen-protilátka, znamená, že takováto interakce může být pro většinu imobilizací nevhodná. Opakem je afinitní pár biotin-avidin [137]. Vazba vznikající mezi biotinem a avidinem je extrémně silná, čemuž napomáhá skutečnost, že tyto proteiny jsou velice stabilní vůči změnám teploty, pH, působení denaturačních činidel a působení proteáz. Široká škála materiálů, jako jsou mikrotitrační destičky, vlákna nebo magnetické částice, na něž mohou být tímto afinitním párem imobilizovány enzymy, přispěla k popularitě této metody [138].

## **2.4.2 Irreverzibilní metody ukotvení enzymů k pevnému nosiči**

### **Kovalentní ukotvení**

Ke vzniku kovalentní vazby dochází reakcí s funkčními skupinami na povrchu proteinu. Příkladem kovalentního ukotvení je například vznik amidové vazby, která vzniká reakcí aminových skupin lysinových zbytků s aktivní formou esteru, jakožto nosičem. Příkladem aktivní formy esteru je například N-hydroxysukcinimid ester, jehož použití má i své nevýhody. Tyto estery jsou nestabilní ve vodném prostředí, a proto je samotná imobilizace doprovázená také hydrolyzou esteru, která vede k nižším imobilizačním výtěžkům. Alternativou může být vznik sekundární aminové vazby, která vzniká reakcí aldehydických skupin s aminoskupinami. Tato reakce je následována redukcí pomocí kyanoborohydridu sodného nebo jiného činidla [131]. Pro kovalentní imobilizaci jsou také často využívány

cysteinové zbytky nesoucí thiolové skupiny, které snadno podléhají konjugaci s nenasycenými karbonyly za vzniku stabilních thioesterových vazeb. Dále se pro kovalentní imobilizaci využívají také zbytky kyseliny asparagové a kyseliny glutamové. Nezbytným krokem takovéto imobilizace je *in situ* konverze na jejich odpovídající aktivní ester s karbodiimidovým činidlem a pomocným nukleofilem. Výhodou této imobilizace je, že obě činidla jsou ve vodě rozpustná a mohou být použita ve vodných médiích [139].

### **Fyzické zachycení**

Struktura enzymu může být narušena působením negativních vlivů vnějšího prostředí, a proto se z pohledu ochrany struktury enzymu jeví jako nejlepší způsob imobilizace metoda zapouzdření. Zapouzdření je nejčastěji založeno na sol-gel metodě, při které je enzym zachycen do matrice sol-gelu. Sol-gel je chemicky inertní oxid křemičitý, který je za běžných podmínek porézní a křehký, ale jeho modifikace umožňují navodit jeho tepelnou a mechanickou stabilitu. V prvním kroku syntézy sol-gelu dochází ke kyselé hydrolyze tetraalkoxysilanů, která je následována kondenzací. Všechny vzniklé póry jsou naplněny vodou a alkoholem a vzniká takzvaný aquagel. Aquagel je poté vysušen odpařováním a vzniká takzvaný xerogel. Aquagel může být také odpařován oxidem uhličitým a vzniká aerogel. Do takto syntetizovaných struktur jsou následně imobilizovány enzymy [140].

Druhou modifikací fyzického zachycení je metoda zapouzdření do lipidových vezikul. Jedná se o polymolekulární agregáty tvořené dvojvrstvou amfifilních molekul, jako jsou například fosfolipidy. Vnější část vezikul je hydrofobní, zatímco vnitřní část je hydrofilní a je naplněna tekutinou, která odpovídá vodnému roztoku, v němž byly vezikuly připraveny [131]. Tato metoda imobilizace je využívána především v biomedicínských oborech. Právě zde se tyto imobilizované enzymy zapouzdřené ve vezikulách využívají především při substitučních terapiích souvisejících s deficitem nebo poruchou funkčnosti enzymu, kdy je zapotřebí transportovat funkční enzym do daného místa v lidském organismu [141]. Výhodnější alternativou k lipidovým vezikulám jsou nanočásticové systémy biologicky rozložitelných polymerů, jejichž výhodou je delší doba cirkulace v krevním oběhu a vyšší kapacita pro imobilizaci enzymu. Jako nosiče v těchto polymerních nanočásticových systémech se využívá alginát nebo chitosan, přičemž bylo zjištěno, že oproti samotnému alginátu nebo samotnému chitosanu, kopolymer alginátu a chitosanu vytváří příznivější podmínky pro ochranu a stabilizaci v průběhu zapouzdření a následného uvolnění imobilizované látky [142].

## **Cross-linking**

Cross-linking, jinak také nazýván jako zesítení, je imobilizační metoda, která vede ke vzniku takzvaných zesítených enzymových krystalů nebo zesítených enzymových agregátů. Zesítené enzymové krystaly jsou vysoce aktivní imobilizované enzymy, které jsou svojí provozní stabilitou, možností opakovatelného použití a vysokou katalytickou aktivitou ideální pro využití v průmyslových biotransformacích. Nevýhoda těchto krystalů je spojena s jejich vznikem, ke kterému dochází procesem krystalizace. Proto, aby došlo k úspěšné krystalizaci, je potřeba vysoce čistých enzymů, s čímž jsou spojeny i vysoké náklady této metody [143]. Alternativou k zesíteným enzymovým krystalům jsou zesítené krystalové agregáty, které jsou produkovány jednoduchým srážením enzymů ve vodném roztoku v přítomnosti vhodného zesíťujícího činidla, nejčastěji glutaraldehydu. Tyto agregáty jsou dohromady udržovány nekovalentními interakcemi, které nenarušují terciální strukturu enzymu a nevedou tedy k jejich denaturaci. Následné zesítení vhodným zesíťujícím činidlem vede ke vzniku nerozpustných agregátů, které neztratily katalytickou aktivitu [144]. Enzymy imobilizované tímto způsobem jsou velmi účinnými biokatalyzátory, a to především díky jejich ekonomické výrobě a efektivitě metody. Metoda zesítení, vedoucí ke vzniku zesítených enzymových agregátů, je použitelná v podstatě pro jakýkoliv enzym včetně oxidoreduktáz závislých na kofaktoru [143].

### **2.4.3 Materiály používané jako nosiče**

#### **Biopolymery**

Ze skupiny biopolymerů se k imobilizacím používají zejména biopolymery ve vodě nerozpustných polysacharidů, jako je celulóza, škrob, agaróza nebo chitosan. Tyto matrice tvoří inertní vodné gely vyznačující se vysokou pevností i při jejich nízkých koncentracích [145]. Díky své chemické struktuře a snadné aktivaci mohou být použity jak k reverzibilním, tak i k ireverzibilním imobilizacím. S použitím vhodných činidel je možno imobilizovat na tyto nosiče i metodou cross-linking, která navíc zvýší jejich mechanickou a tepelnou odolnost. Pro konjugaci biopolymeru s imobilizovaným enzymem se využívá radikálových a adičních reakcí nebo reakcí s aldehydy, karbodiimidů, epoxidů nebo aktivními estery, z nichž některé jsou vhodnější pro *in situ* konjugaci s biopolymerem, zatímco jiné jsou vhodnější pro konjugaci a purifikaci *ex situ* [131].

#### **Hydrogely**

Enzymy mohou být v nevodných médiích imobilizovány na kryogely nebo přírodní či syntetické hydrogely. Například kryogely polyvinylalkoholu, které jsou vytvářeny metodou

zmrazování a rozmrazování, byly široce využívány pro imobilizaci celých buněk [146]. Nicméně volné enzymy, především vzhledem ke své velikosti, mohou difundovat z gelové matrice do vodného prostředí a tím znemožnit imobilizaci. Aby došlo k úspěšné imobilizaci enzymů na hydrogely, musí být velikost enzymu zvětšena, a to například takzvaným zesíťováním nebo vytvořením komplexu s polyelektrolytem [131].

### **Anorganické nosiče**

Pro imobilizaci enzymů mohou být použity také anorganické nosiče vyrobené z oxidu hlinitého, oxidu křemičitého, zeolitu nebo mezoporézního oxidu křemičitého [147]. Nosiče na bázi oxidu křemičitého jsou nejvhodnější matricí pro imobilizaci enzymů k výzkumným účelům. Často využívané jsou také silikagely, jejichž hlavní výhodou v porovnání s ostatními měkkými gely je jejich vysoká mechanická odolnost, umožňující jejich použití v širším rozsahu experimentálních podmínek, a to především za velmi vysokých tlaků, o čemž svědčí jejich využití při výrobě kolon pro vysoko účinnou kapalinovou chromatografii [131]. Navíc tyto silikagely mohou být snadno modifikovány chemickými metodami poskytujícími různé typy funkčních skupin, které usnadňují vazbu enzymu [148]. Jednou z nejjednodušších a nejlevnějších metod, jak imobilizovat enzym na nosič z oxidu křemičitého, je jednoduchá adsorpce. Tento proces je využíván například pro přípravu enzymů do detergentních prášků [131].

### **Syntetické organické polymery**

Ze skupiny syntetických organických polymerů jsou k imobilizacím nejčastěji používány akrylové pryskyřice, jako například Eupergit C. Jedná se o makroporézní kopolymer N,N'-methylen-bi-(methakrylamidu), glycidylmethakrylátu, alyglycidyletheru, a methakrylamidu s průměrnou velikostí pórů 25 nm [149]. Nosiče vyrobené z těchto akrylových pryskyřic jsou velice hydrofilní a stabilní vůči mechanickým i chemickým změnám v rozmezí pH od 0 do 14. Další vlastností je jejich vysoká odolnost vůči bobtnání nebo smršťování při velkých změnách pH. Imobilizace velkého množství enzymů kovalentní vazbou na tyto akrylové pryskyřice je typická především pro průmyslová použití [131].

### **Inteligentní polymery**

Inteligentní polymery jsou nosiče, které jsou charakteristické velkými konformačními změnami v důsledku reakce na změnu teploty, pH či iontové síly. Nejvíce studovaným příkladem inteligentního polymeru je poly-N-isopropylakrylamid. Vodné roztoky tohoto polymeru vykazují kritickou teplotu okolo 32°C. Při hodnotách nižších, než je kritická teplota



je polymer ve vodě rozpustný, zatímco při hodnotách vyšších, než je kritická teplota se polymer stává nerozpustným, a to v důsledku vylučování molekul vody ze své struktury. Imobilizace může být provedena za podmínek, kdy je enzym rozpustný, čímž se minimalizuje omezení difuze a ztráta aktivity enzymu v důsledku konformačních změn na povrchu nosiče. Následné zvýšení teploty nad hodnotu kritické teploty vede ke srážení imobilizovaného enzymu, což usnadňuje jeho využití a opětovné použití. Imobilizace je prováděna metodou kovalentní vazby, kdy se obecně používají dvě modifikace. První modifikace je založena na zavedení polymerizovatelných vinylových skupin do struktury imobilizovaného enzymu a následné kopolymeraci s poly-N-isopropylakrylamidem. Druhá modifikace je založena na reakci amino skupin na povrchu enzymu s reaktivními esterovými vazbami kopolymeru N-isopropylakrylamidu [143].

### **Zlaté nanočástice**

Rozvoj nanotechnologie vedl také k rozvoji nanobiotechnologie a nanobiokatalýzy. V oboru nanobiokatalýzy jsou enzymy imobilizovány na různé druhy nanomateriálů, a to především metodou jednoduché adsorpce a kovalentní vazby. Především velký povrch nanomateriálů má za následek zvýšení enzymové aktivity a stability imobilizovaného enzymu ve srovnání s běžnými nosiči [150]. Často využívané jsou nanočástice vzácných kovů, zejména tedy nanočástice zlata, které díky svým elektrickým, optickým a tepelným vlastnostem našly své uplatnění v oblasti fyziky, chemie, biologie i medicíny. Jejich široké spektrum uplatnění vedlo také k vývoji různých metod přípravy zlatých nanočástic [151]. Typicky se zlaté nanočástice připravují chemickou redukcí soli odpovídajícího kovu, a to v přítomnosti stabilizátoru, který se váže na jejich povrch za účelem stabilizace. Dalším krokem je povrchová pasivace vedoucí k ochraně mnohovrstvy nanočástic. Nejčastěji se k této pasivaci používají citrát nebo thiol-funkcionalizované organické látky, zapouzdření ve vodném prostředí reverzních mikroemulzí nebo disperze v polymerních maticích [131].

### **Magnetické částice**

V uplynulých letech došlo k výraznému rozvoji technologií v oblasti magnetických nosičů, které jsou využívány například k magnetické separaci. Magnetická separace je technologie využívající mikrometrických, nanometrických, paramagnetických a feromagnetických částic k separaci látek z chemických a biologických vzorků. S rozvojem nanotechnologie došlo i k rozvoji magnetických nanočástic, které jsou v současné době široce studovány [152]. Magnetické nanočástice vykazují vlastnost nazývanou jako superparamagnetismus, která znamená, že takovéto částice jsou přitahovány magnetickým

polem, ale po odstranění magnetického pole nezachovávají žádný zbytkový magnetismus a jsou volně suspendovány v roztoku [131]. Magnetické částice vyráběné z oxidu železa byly nejdříve vyvinuty jako zobrazovací látky pro magnetickou resonanci. Dnes se magnetické částice využívají také k imobilizaci enzymů, která primárně vede k posílení stability enzymů a jejich snadné separaci z reakční směsi [153]. Magnetické nanočástice jsou využívány také v medicíně, a to k usnadnění diagnostiky a při léčbě. Nanočástice železa byly použity například u léčby nádorů, kde jejich hlavní úlohou byla přednostní akumulace v nádorových tkáních [154]. Samotná příprava magnetických nanočástic zahrnuje společné srážení železnatých a železitých iontů v základních roztocích. Následně je možno částice pokrýt oxidem křemičitým nebo polymery, jako je dextranem a polyvinylalkohol, především za účelem zvýšení jejich stability [131].

#### **2.4.4 Přehled praktického využití imobilizovaných kináz**

V dnešní době nachází imobilizace kináz uplatnění především v odvětví biotechnologie, kde se imobilizované kinázy stávají součástí specializovaných biosenzorů. Mimo to nachází imobilizace enzymů uplatnění také v případech, kdy je potřeba získat opakovaně použitelný enzym a zvýšit jeho stabilitu například v průmyslových procesech. Příkladem samotné imobilizace kinázy na nosič může být imobilizace hexokinázy na polystyrenové částice obsahující příměs chitosanu. Tato imobilizace byla provedena metodou adsorpce a vedla ke vzniku částic citlivých na glukózu, které mohou být dlouhodobě skladovány a jsou opakovaně použitelné. Nicméně tyto částice jsou také doprovázeny ztrátou aktivity enzymu, která je ale v porovnání se solubilní hexokinázou z praktického a ekonomického hlediska kompenzována právě možností opakovaného použití [155].

Příkladem praktického využití imobilizovaných kináz je jejich uplatnění při výrobě amperometrického glycerolového biosenzoru. V tomto případě byly připraveny enzymy glycerol kináza a glycerol-3-fosfát oxidáza, které byly navázány na nanočástice a tyto nanočástice s navázanými enzymy byly následně metodou fyzikálního zachycení imobilizovány na grafitovou elektrodu. Druhou možností imobilizace by mohla být i klasická adsorpce, a to díky elektrostatické přitažlivosti mezi negativně nabitými karboxylovými skupinami grafitové elektrody a aminoskupinami enzymu navázaného na povrchu nanočástic. Takto vytvořené biosenzory vykazovaly lepší analytické vlastnosti z hlediska rychlosti odezvy a nízkého detekčního limitu ve srovnání s glycerolovými biosenzory, které využívají jen solubilní formy enzymů [156].

Druhým příkladem je jednoduchý biosenzor pro stanovení koncentrace ATP ve vodných vzorcích. Tento biosenzor je založen na konduktometrickém převodníku, který obsahuje dva páry zlatých elektrod. Na jeden z těchto párů elektrod byl metodou zesíťení v přítomnosti zesítujícího činidla glutaraldehydu imobilizován enzym hexokináza. Tento biosenzor byl úspěšně použit pro měření koncentrace ATP ve farmaceutických vzorcích a uvažuje se také o jeho využití ke stanovení ATP a glukosy ve vodných vzorcích [157].

Třetím příkladem uplatnění imobilizovaných kináz jsou biostripy použitelné pro stanovení triacylglycerolů. Opakovaně použitelný biostrip obsahuje enzymy imobilizované na akrylamínových skleněných částicích, které jsou umístěny na plastifikovaném polyvinylchloridovém stripu. Nevýhodou těchto biostripů je, že jsou zatíženy ztrátami skleněných částic v důsledku vymývání, což vede k postupné ztrátě aktivity imobilizovaného enzymu. Z tohoto důvodu byla provedena studie se snahou vyvinout levnější a stabilnější biostrip pro stanovení triacylglycerolů. Přímou na polyvinylchloridový biostrip byly metodou kovalentního ukotvení imobilizovány enzymy lipáza, glycerol kináza, glycerol-3-fosfát oxidáza a peroxidáza. Takto modifikované biostripy již nejsou zatíženy ztrátami z vymývání a jsou použitelné ve 200 opakováních s pouze 50% ztrátou aktivity enzymů [158].

Dalším nalezeným příkladem využití imobilizovaných kináz v literatuře je kovalentní imobilizace GSK3 $\beta$  a MAPK 1, také označované jako ERK2, na karboxylované magnetické částice Sera-Mag. V tomto případě byly nízkomolekulární substráty použity k ověření úspěšné imobilizace enzymu a takto imobilizované enzymy byly po ověření použity k fosforylaci proteinu Tau. Ve srovnání s rozpustnými formami enzymů je práce s enzymy imobilizovanými na magnetické částice spojena se snadnou manipulací, možností jejich opakovaného použití a tím i se snížením nákladů dané analýzy. V případě imobilizace GSK3 $\beta$  byla zbytková aktivita po 10 použitích  $99,5 \pm 0,34$  %, zatímco zbytková aktivity imobilizované ERK2 činila po 10 použitích  $36,2 \pm 2,01$  %. Velice důležitou vlastností těchto imobilizovaných enzymů je možnost jejich rychlého odstranění z reakční směsi, což minimalizuje kontaminaci fosforylovaných produktů [159].

## 2.5 Aplikace tyrosin kináz pro fosforylace modelových molekul *in vitro*

Posttranslační modifikace poskytují v organismu možnost regulace aktivity proteinů, jejich subcelulární lokalizace či stability. Mezi tyto posttranslační modifikace patří mimo jiné také proces fosforylace, který je podrobně zkoumán vědním oborem nazývaným jako fosfoproteomika [160]. Fosfoproteomika je částí proteomiky, která se zabývá globální analýzou fosforylací proteinů, přičemž mezi hlavní cíle tohoto oboru patří identifikace fosfoproteinů a fosfopeptidů, přesná identifikace fosforylačních míst a kvantifikace fosforylací [161]. Počet substrátů kináz je v lidském organismu značně rozsáhlý a odhaduje se, že přibližně 30 % proteinů lidského organismu je fosforylováno [162]. Ve všech eukaryotických buňkách dochází k fosforylacím primárně na serinu, poté na threoninu a nejméně často na tyrosinu [163]. Fosforylace serinu představují přibližně 90 % veškerých fosforylací, dalších 10 % připadá na fosforylace threoninu a pouhých 0,05 % veškerých fosforylací připadá na fosforylace tyrosinu [164].

Vzhledem k výše zmíněnému vysokému podílu fosforylovaných proteinů vzrostla i snaha o vývoj nových proteinových farmaceutických prostředků, s jejichž rozvojem souvisí také produkce rekombinantních proteinů. Proteiny jsou z hlediska struktury a funkce komplexními molekulami, které je nutné syntetizovat biologickými procesy uvnitř expresních systémů. Rekombinantní proteiny jsou často syntetizovány v expresních systémech odlišného druhu, jejichž DNA byla rekombinována či upravena, a právě proto jsou produkty těchto systémů nazývány jako rekombinantní proteiny. Jako expresní systémy jsou nejčastěji využívány bakterie, jejichž hlavní nevýhoda souvisí s neschopností posttranslačně modifikovat syntetizované proteiny způsobem, jakým je tomu u eukaryotických buněk. Důvodem neschopnosti bakterií posttranslačně modifikovat proteiny je odlišná buněčná struktura, která ve srovnání s eukaryotickými buňkami neobsahuje hlavní místa posttranslačních modifikací, a to endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Ke správné funkci rekombinantních proteinů je nutná jejich posttranslační modifikace zahrnující také fosforylaci, kterou je možno provést metodami *in vitro* [165].

### 2.5.1 Tau protein

Většina neurodegenerativních onemocnění je charakterizována intracelulárními agregáty nerozpustných proteinů, mezi něž se řadí také Tau protein. Tau protein je jedním z proteinů asociovaných s mikrotubuly, který je schopen v intracelulárním prostoru neuronů a gliových buněk vytvářet agregáty. Tento patologický nález je společným znakem pro skupinu chorob souhrnně nazývaných jako tauopatie [166]. Do skupiny tauopatii se řadí například

Alzheimerova choroba, progresivní supranukleární obrna, Pickova choroba nebo kortikobazální degradace [167].

Tau protein patří do rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly, které jsou exprimovány především v neuronech, kde hrají důležitou roli při uskupování tubulinových monomerů do mikrotubulů, které společně dále utvářejí mikrotubulinové neuronální síť. Tau protein přispívá především ke stabilizaci mikrotubulů a ve své hyperfosforylované formě vede naopak k jejich depolymerizaci. Tyto mikrotubuly se dále podílejí na zachování buněčného tvaru a axonálním transportu. Mimo to je Tau protein schopen vytvářet vazby mezi mikrotubuly a dalšími cytoskeletárními prvky nebo jinými proteiny [168].

### Struktura a fosforylační místa Tau proteinu

Ve struktuře Tau proteinu lze napříč celou aminokyselinovou sekvencí rozlišit čtyři funkčně a strukturálně odlišné domény, a to N-terminální projekční doménu, na prolin bohatou oblast, oblast vázající mikrotubuly a C-terminální oblast [166]. V dospělém centrálním nervovém systému se Tau protein vyskytuje celkem v šesti izoformách, a to v rozmezí délek 352 až 441 aminokyselin. Molekulové hmotnosti jednotlivých izoform dosahují hodnot od 45 do 65 kDa [168]. Jednotlivé izoformy se navzájem liší přítomností nebo nepřítomností exonu 2 (E2) a exonu 3 (E3), které jsou umístěny na N-terminálním konci. Nepřítomnost E2 i E3 vede ke vzniku 0N izoformy, přítomnost pouze E2 vede ke vzniku 1N izoformy a přítomnost E2 i E3 vede ke vzniku izoformy 2N. Druhým znakem rozlišující typy izoform je přítomností tří nebo čtyř repetitivních oblastí umístěných na C-terminálním konci, značených jako M1, M2, M3 a M4. Nepřítomnost pouze M2 repetitivní oblasti vede ke vzniku 3R izoformy, zatímco přítomnost všech čtyř repetitivních oblastí vede ke vzniku 4R izoformy. Jednotlivými kombinacemi mohou vzniknout izoformy typu 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R a 2N4R [167], jejichž struktura je zobrazena na Obr. 8.



**Obr. 8** Struktura jednotlivých izoform lidského Tau proteinu, upraveno dle [167]

Identifikace fosforylačních míst Tau proteinu se staly cílem studií prováděných jak na rekombinantním Tau proteinu metodami *in vitro*, tak na fyziologických i patologických posmrtných biotických odběrech mozkové tkáně, a to přímými sekvenčními metodami, jako je hmotnostní spektrometrie a Edmanovo odbourávání nebo nepřímými metodami pomocí fosfospecifických Tau protilátek [167]. Izoforma 2N4R lidského Tau proteinu, vyskytující se v centrálním nervovém systému, jejíž molekulová hmotnost dosahuje hodnoty 45,9 kDa obsahuje 85 fosforylačních míst, z toho 45 fosforylačních míst tvoří serin a 35 threonin. Těchto 80 fosforylačních míst může být fosforylováno serin/threonin kinázami. Pouhých pět fosforylačních míst je tvořeno tyrosinem, a to přesněji Tyr18, Tyr29, Tyr197, Tyr310 a Tyr394, které mohou být fosforylovány tyrosin kinázami [166]. Schéma fosforylačních míst izoformy 2N4R lidského Tau proteinu je znázorněno na Obr. 9.



**Obr. 9** Fosforylační místa izoformy 2N4R Tau proteinu, upraveno dle [166]

### Hyperfosforylace Tau proteinu

Hyperfosforylace Tau proteinu byla identifikována jako hlavní molekulární znak neurofibrilární degradace u Alzheimerovy choroby a dalších tauopatií. V pokročilých stádiích Alzheimerovy choroby nesou Tau proteiny trojnásobné množství fosfátů ve srovnání s fyziologickými nálezů. Hyperfosforylace je charakterizována zvýšeným podílem molekul Tau proteinu, které jsou fosforylovány na daných zbytcích, spíše než zvýšením počtu fosforylovaných zbytků na každé molekule Tau proteinu. Hyperfosforylace Tau proteinu, vznikající důsledkem nerovnováhy aktivity proteinových kináz a fosfatáz, je rozhodující pro tvorbu fibrilárních Tau agregátů. Vznik těchto agregátů je spojen se ztrátou schopnosti Tau proteinu stabilizovat mikrotubuly, následným narušením dynamiky cytoskeletu a axonálního transportu, což v konečném důsledku vede k synaptické dysfunkci a neurodegeneraci. Nicméně hyperfosforylace Tau proteinu není nutně škodlivá, a to jak za fyziologických, tak i patologických stavů. Například v průběhu embryonálního vývoje mozku dochází ke zvýšení fosforylace Tau proteinu. Reverzibilní fosforylace Tau proteinu byla taktéž pozorována u stavů doprovázených hypotermií, chronickým stresem nebo anestezií [166].

### 2.5.2 Myelinový bazický protein

Myelinový plášť je multilamelární membránovou strukturou obalující axony centrálního a periferního nervového systému. Pouze proteiny tvoří 30 % sušiny myelinu. Dvěma nejvíce zastoupenými proteiny v myelinu jsou proteolipidy a právě myelinové bazické proteiny (MBPs) [169].

MBP se primárně podílí na tvorbě a ztuhnutí cytoplazmatického povrchu oligodendrocytů a Schwannových buněk. MBP může interagovat s jinými proteiny, jako je například aktin, tubulin, kadherin nebo negativně nabitě lipidy. Mimo to může vystupovat jako membránový protein vázající aktin, což umožňuje jeho účast při přenosu extracelulárních signálů do cytoskeletu oligodendrocytů [170]. Tento protein se také podílí na stimulaci aktivity fosfolipázy C a může mít potenciální regulační funkci jako transkripční faktor. V souvislosti s patologickými procesy je MBP cílem autoimunitní reakce, která má za následek degradaci myelinového pláště, jako je tomu v případě roztroušené sklerózy [169].

MBP je charakteristický vysokým stupněm posttranslačních modifikací. Mezi typické posttranslační modifikace patří deaminace glutaminu, acetylace alaninu, deaminace argininu za vzniku citrulinu a fosforylace několika fosforylačních míst [171]. Tyto posttranslační modifikace mohou mít také patologický účinek při destabilizaci myelinu [170].

#### Struktura a fosforylační místa myelinového bazického proteinu

MBP se vyskytuje v několika izoformách, jejichž molekulové hmotnosti dosahují hodnot od 17,3 do 33,1 kDa. Jednotlivé izoformy mohou existovat jako jeden z mnoha možných nábojových izomerů, přičemž odlišnost nábojů je dána různou kombinací posttranslačních modifikací [172]. Tyto nábojové izomery jsou označovány jako C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 a C8, a to podle elučního profilu jednotlivých izomerů na katexové koloně při pH 10,5 [173]. Izomer C1 je nejméně posttranslačně modifikován a má nejkladnější náboj. Naopak je tomu v případě izomeru C8, který je ze všech izomerů nejvíce posttranslačně modifikován a má tedy nejzápornější náboj [172].

Fosforylace MBP je komplexní regulační proces, který přispívá ke stabilitě myelinového pláště. Míra fosforylace MBP v myelinovém plášti se mění v reakci na účinek nervového potenciálu. MBP může být *in vitro* fosforylován protein kinázou C, protein kinázou A, glykogen syntázou kinázou, kalmodulin-dependentní kinázou a MAPK. Fosforylační místa *in vitro* se v některých případech liší od fosforylačních míst MBP *in vivo* [170]. Využitím

fosfospecifických protilátek, bylo detekováno jedno z hlavních fosforylačních míst specifických pro MAPK, a to Thr95 [174].

### **2.5.3 Metody detekce fosforylovaných peptidů a proteinů**

Jednou z nejstarších metod detekce fosfopeptidů a fosfoproteinů je metoda využívající radioaktivní značení izotopem fosforu, další možností detekce jsou metody využívající fosfospecifické protilátky nebo chelatační sloučeniny [175]. S postupným rozvojem metod hmotnostní spektrometrie našla i tato metoda své uplatnění v detekci fosforylací. V dnešní době se jedná již o jednu z nejčastěji využívaných metod detekce v této problematice [176].

#### **Metody využívající radioaktivní značení izotopem fosforu**

Jednou z tradičních metod detekce fosforylace peptidů či proteinů je radioaktivní značení izotopem fosforu  $^{32}\text{P}$  [175]. Tato metoda je založena na značení peptidů či proteinů podléhajících kinázovým reakcím radioaktivně značeným ( $\gamma^{32}\text{P}$ )ATP. V průběhu kinázové reakce dochází k inkorporaci radioaktivně značeného fosfátu do místa fosforylace peptidového či proteinového substrátu. Míra kinázové aktivity je přímo úměrná intenzitě radioaktivního záření, které také koreluje s relativní mírou fosforylace substrátu. Obvykle jsou radioaktivně značené peptidy a proteiny rozděleny na gelu metodou dvourozměrné polyakrylamidové gelové elektroforézy a následně přeneseny na nitrocelulóзовou membránu [177]. Míra radioaktivity je poté detekována autoradiografickými metodami. Výraznými nevýhodami této metody je pracnost, dlouhá doba analýzy, nutnost opatrné manipulace s radioaktivním materiálem a potenciální riziko pro lidské zdraví [175].

#### **Metody využívající fosfospecifické protilátky**

První zmínka o fosfospecifických protilátkách přišla roku 1981, kdy byla poprvé zdokumentována produkce fosfospecifických protilátek u králíků imunizovaných benzylofosfonátem konjugovaným s hemocyaninem. Tento druh protilátek široce rozpoznával proteiny nesoucí pTyr [178]. O deset let později byly vyvinuty fosfospecifické protilátky, které vznikly imunizací králíků syntetickými fosfopeptidy, které představovaly aminokyselinovou sekvenci obklopující fosforylační místo cílového proteinu [179].

Detekce fosforylovaných peptidů a proteinů pomocí fosfospecifických protilátek je alternativní metodou. Navzdory dlouhodobé znalosti této metody existuje mnoho nedostatků, které omezují aplikaci této detekce. Například možnost použití fosfospecifických protilátek vyžaduje předchozí znalost fosforylačních míst a omezuje analýzy pouze na již charakterizované fosforylace. Další nevýhodou této metody je, že úspěšnost detekce závisí na



specifitě a afinitě protilátek k požadovanému fosfoproteinu. To znamená, že pro každé fosforylační místo musí existovat specifická protilátka, což činí tuto metodu velice nákladnou. Fosfospecifické protilátky jsou stále velice cenné pro analýzu specifických fosforylačních procesů, ale jsou neoptimální pro analýzy vedoucí k objevu nových fosforylačních míst [180].

Fosfospecifické protilátky mohou být využívány ve spojení s imunoanalytickými metodami Western blot nebo Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Western blot je jednou z často využívaných metod k detekci fosforylovaných peptidů a proteinů. V prvním kroku je analyt rozdělen metodou polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a následně je přenesen na nitrocelulózu nebo polyvinylidenofluoridovou membránu. Analyt je následně detekován pomocí fosfospecifických protilátek. Druhou možností je metoda ELISA. Jedná se o často využívanou metodu, a to především díky jejím výhodám, které jsou spojeny se snadnou kvantifikací prostřednictvím standardů, vysokou citlivostí a možností práce s malými objemy analytu [175]. Příkladem kitu založeného na principu ELISA s fosfospecifickými protilátkami je Protein Tyrosine Kinase Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Metody využívající chelatační sloučeniny**

Další skupinou metod detekující fosforylované peptidy a proteiny jsou metody využívající chelatační sloučeniny, které mají schopnost se selektivně vázat na fosfátové skupiny fosfoproteinů. Tyto chelatační sloučeniny ve své struktuře obsahují ionty kovů, a to především ionty  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  nebo  $Ti^{4+}$ , které umožňují specifickou vazbu k fosfátové skupině. Dále tyto sloučeniny obsahují značky, díky kterým je možno detekovat fosforylace. Poslední složkou chelatačních sloučenin je samotná nosná látka, která funguje jako nosič kovů a detekčních značek [175].

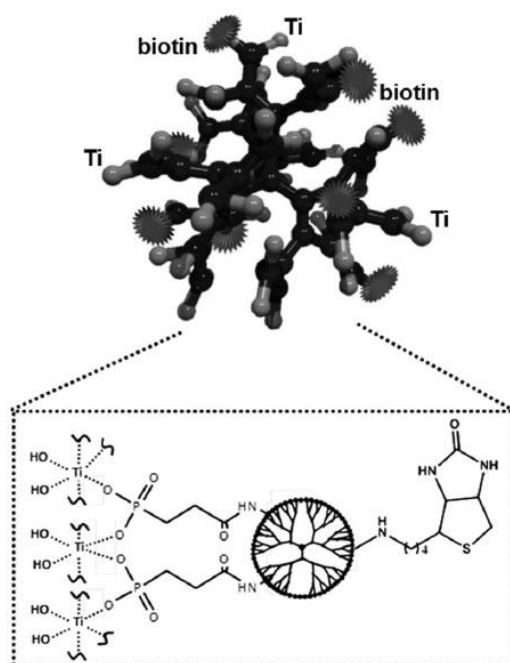
#### Detekce pomocí značky Phos-tag

Jednou z modifikací využívající chelatační sloučeniny je detekce pomocí značky Phos-tag. Struktura této značky obsahuje alkoxidem přemostěné ionty  $Zn^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ , které specificky rozpoznávají fosfomonoesterové dianionty vázané na serinových, threoninových nebo tyrosinových zbytcích fosfoproteinů. Phos-tag značky se mohou využívat ve spojení s polyakrylamidovou gelovou elektroforézou, kde vazba Phos-tag značky na fosfoprotein způsobí snížení pohyblivosti značeného fosfoproteinu v polyakrylamidovém gelu a jeho následné elektroforetické oddělení od nefosforylovaných proteinů. Další modifikací je konjugace Phos-tag značek s biotinem pro uspořádání Western blot. Po rozdělení fosfoproteinů

na polyvinylidenfluoridové membráně a označení fosfoproteinů Phos-tag značkou je přidán komplex streptavidin-peroxidáza a je detekována přítomnost fosforylace. Phos-tag značky jsou vhodným prostředkem jak pro detekci, tak pro separaci, purifikaci či analýzu analytu hmotnostní spektrometrií [181].

### Detekce pomocí dendrimery pIMAGO

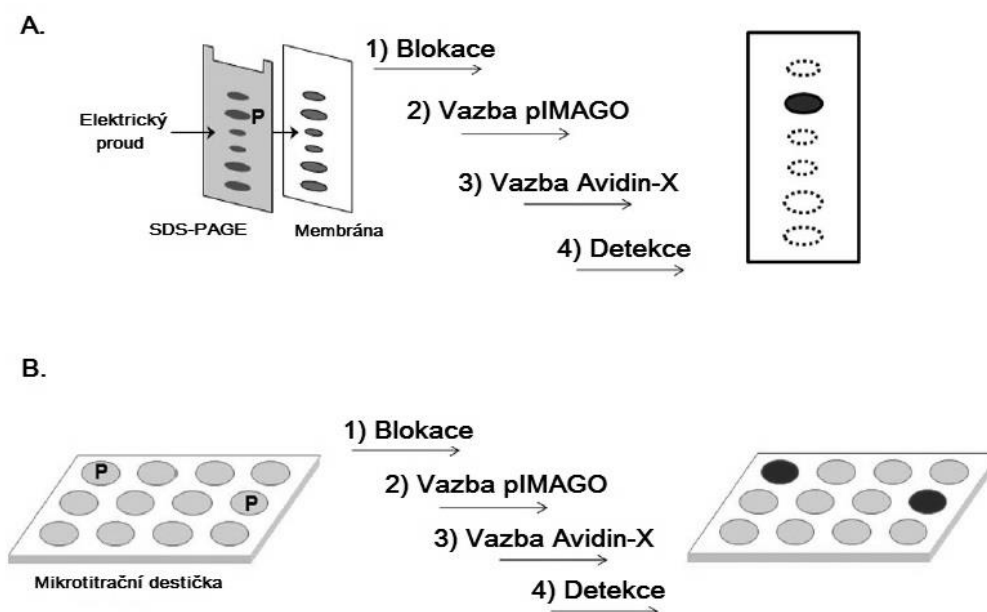
Další modifikací metod využívajících chelatační sloučeniny je detekce pomocí dendrimery pIMAGO. Technologie této detekce je založena na ve vodě nerozpustných, globulárních nanopolymerech, nazývaných jako dendrimery. Tyto dendrimery jsou funkcionalizovány reaktivními skupinami  $Ti^{4+}$  iontů rozpoznávajících fosfátové skupiny a molekulami biotinu, které specificky interagují s molekulami avidinu, což umožňuje průkaz přítomnosti fosforylace. Specifická vazba mezi dendrimerem pIMAGO a fosfátovou skupinou je založena na interakcích náboj-náboj [180], kdy ionty  $Ti^{4+}$  jsou schopny specificky rozpoznávat fosfátové skupiny, a to především v přítomnosti benzoových a  $\alpha$ -hydroxy kyselin [182]. Struktura molekuly pIMAGO je znázorněna na Obr. 10.



**Obr. 10** Struktura molekuly pIMAGO [180]

Dendrimer pIMAGO může být využit pro detekci fosfoproteinů vázaných na pevné fázi mikrotitrační destičky nebo na polyvinylidenfluoridových membránách. Každá molekula pIMAGO obsahuje několik funkčních skupin, čímž se zvyšuje účinnost detekce. Modifikace detekce na polyvinylidenfluoridových membránách je podobná metodě Western blot, kdy rozdíl spočívá v substituci primární protilátky dendrimerem pIMAGO a substituci sekundární

protilátky komplexem avidin-peroxidáza nebo komplexem avidin-fluorofor. Modifikace na pevné fázi mikrotitrační destičky je velice podobná metodě ELISA. V prvním kroku dochází k pasivní adsorpci proteinu na pevnou fázi, která je následována blokací. Poté je místo primární protilátky přidán dendrimer pIMAGO značený biotinem, který specificky rozpoznává fosfátové skupiny. V posledním kroku dochází k detekci a kvantifikaci fosforylace komplexem avidin-peroxidáza nebo avidin-fluorofor [180]. Schéma detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO je znázorněno na Obr. 11.



**Obr. 11** Pracovní postup detekce fosfoproteinů pomocí dendrimeru pIMAGO (A) na membráně nebo (B) mikrotitrační destičce. X označuje křenovou peroxidázu nebo fluorofor konjugovaný s avidinem. P označuje fosfoprotein, upraveno dle [180].

## Metody hmotnostní spektrometrie

Proteomické studie založené na hmotnostní spektrometrii jsou rozvíjeny především v důsledku skutečnosti, že posttranslační modifikace nemohou být identifikovány pouze samotnou sekvenací DNA. Proto se hmotnostní spektrometrie stala důležitou technikou, v dnešní době již rutinně využívanou, pro kvantifikaci fosforylací a identifikaci fosforylačních míst [183]. Ve srovnání s výše zmíněnými detekčními metodami fosforylací má hmotnostní spektrometrie své výhody spojené především s menší časovou náročností, možností použití malých objemů vzorků, vysokou citlivostí a selektivitou [176].

Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií se skládá z několika kroků. V případě analýzy fosfoproteinů pocházejících z buněčného lyzátu je potřeba při lýze buňky použít inhibitory fosfatáz minimalizující defosforylací a degradaci fosfoproteinů. Dalším krokem v případě analýzy dlouhých proteinů je štěpení proteázou, například trypsinem. Tyto

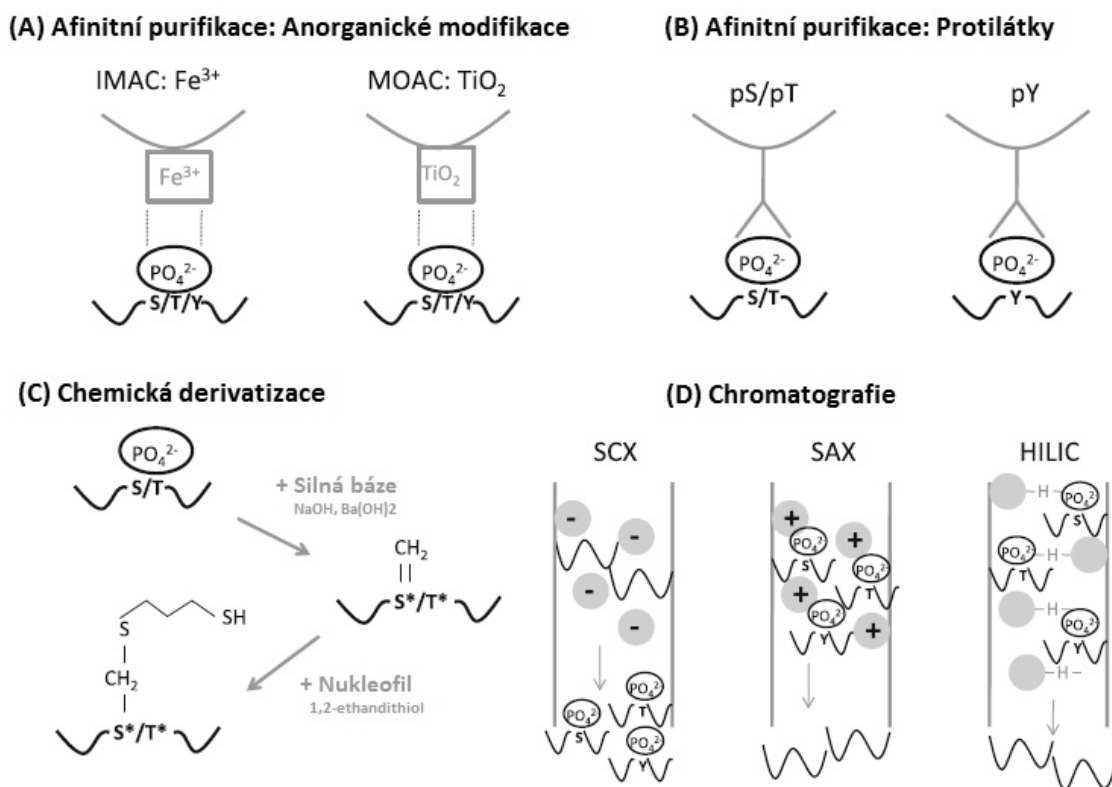
proteázy umožní vznik směsi menších peptidů, které jsou vhodné pro fragmentaci v hmotnostním spektrometru [183]. Vzhledem k tomu, že fosfoproteiny se mohou vyskytovat v relativně nízkých koncentracích, je v dalším kroku vhodné fosfoproteiny obohatit [184]. Pro obohacení fosfoproteinů existuje široké spektrum metod, o kterých bude blíže pojednáno v kapitole 2.5.4 Metody pro obohacení fosforylovaných peptidů a proteinů. Některé vzorky poté vyžadují čistící nebo odsolovací krok. Jedná se například o vzorky obsahující nadbytek ATP, jako je tomu v případě *in vitro* fosforylačních reakcí nebo vzorky rozpuštěné v silně iontových roztocích, například v močovině. Takto připravené vzorky mohou být zavedeny do hmotnostního spektrometru například kapalinovou chromatografií spojenou s ionizací elektrosprejem nebo pomocí desorpční ionizace laserem za asistence matrice (MALDI) [183]. Mezi matrice využívané metodou MALDI patří kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová nebo 2,4,6-trihydroxyacetofenon [184]. Nejčastěji využívané analyzátoři hmotnostní spektrometrie pro analýzu fosforylací pracují na principu záchytu iontů v cele či pasti, jako například lineární iontová past a orbitrap. Často využívanou modifikací hmotnostní spektrometrie pro detekci fosforylací je také tandemová hmotnostní spektrometrie [183].

Detekce fosfopeptidů pomocí hmotnostní spektrometrie může vycházet například ze skutečnosti, že fosfatázy jsou schopny defosforylovat neboli odstranit fosfátové skupiny z fosfopeptidů, což způsobí relativní hmotnostní posun oproti původnímu fosfopeptidu. V závislosti na počtu fosfátových skupin dochází k hmotnostnímu posunu o  $n$ -násobek  $-80$  Da, které připadají na jednu fosfátovou skupinu ( $\text{HPO}_3 = 79.966$  Da), přičemž  $n$  značí počet fosfátových skupin [185]. Druhá možnost detekce fosfopeptidů pomocí hmotnostní spektrometrie je založena na iontovém skenování prekurzoru. Tato metoda vychází ze skutečnosti, že fosfátové skupiny mají během fragmentace, za podmínek vysokého pH, tendenci ztrácet ionty, které vedou ke vzniku fosfátových aniontů o poměru  $m/z$  rovno 79 ( $\text{PO}_3$ ). Hmotnostní spektrometry pracující v záporném iontovém režimu jsou nastaveny tak, aby detekovaly tento signál [186]. Třetí možností detekce fosfopeptidů pomocí hmotnostní spektrometrie je sken neutrálních ztrát. Tato metoda je využívána u tandemové hmotnostní spektrometrie v pozitivním režimu a vychází ze skutečnosti, že peptidy nesoucí fosfoserin a fosfothreonin podléhají  $\beta$ -eliminační reakci vedoucí k neutrální ztrátě 98 Da ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) nebo 80 Da ( $\text{HPO}_3$ ). A právě tento jev může být použit pro selektivní detekci fosfopeptidů [176]. Ve spektrech tandemové hmotnostní spektrometrie ztráta kyseliny fosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) převádí fosfoserinové a fosfothreoninové zbytky na dehydroanilinové (69 Da) a dehydroaminomáselné

(83 Da) zbytků, které prezentují přesné umístění fosfoserinových a fosfothreoninových zbytků [187].

## 2.5.4 Metody pro obohacení fosforylovaných peptidů a proteinů

Fosfoproteiny a fosfopeptidy se běžně ve vzorcích vyskytují v nízkých koncentracích, například v porovnání s jejich nefosforylovanými protějšky, a proto je vhodné před analýzou takovéto vzorky obohatit. Obohacovací metody se běžně dělí na dvě skupiny, a to metody, které obohacují celé fosfoproteiny a metody, které obohacují fosfopeptidy, které vznikly naštěpením fosfoproteinu proteázou. Mezi běžně využívané obohacovací metody pro celé fosfoproteiny patří afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů a metody založené na protilátkách. Mezi metody obohacující pouze fosfopeptidy patří afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů, afinitní chromatografie na oxidech kovů, iontově výměnná chromatografie na silném katexu nebo silném anexu a hydrofilní interakční chromatografie, dále také metody založené na protilátkách, alternativních modifikacích využívající afinitní purifikaci [188] nebo také obohacovací metody na destičce [189]. Principy jednotlivých obohacovacích metod jsou uvedeny na Obr. 12.



**Obr. 12** Principy obohacovacích metod fosfopeptidů a fosfoproteinů, jednotlivé zkratky označují: (IMAC) afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů, (MOAC) afinitní chromatografie na oxidech kovů, (S) serin, (T) threonin, (Y) tyrosin, (pS) fosfoserin, (pT) fosfothreonin, (pY) fosfotyrosin, (S\*) dehydroanilin, (T\*) dehydro-2-aminomáselná kyselina, (SCX) iontově výměnná chromatografie na silném anexu, (SAX) iontově výměnná chromatografie na silném katexu, (HILIC) hydrofilní interakční chromatografie, upraveno dle [188].

### **Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů**

Obohacovací metody, založené na afinitní chromatografii na imobilizovaných iontech kovů, využívají afinity fosfátových skupin k iontům přechodných kovů, mezi něž se nejčastěji řadí ionty  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$ . Vzájemná interakce je založena na koordinačních vazbách vznikajících mezi donorovým elektronem fosfátové skupiny a iontem přechodného kovu [190]. Přechodné kovy mají mimo jiné také afinitu k dusíku a síře. To znamená, že například silná koordinační vazba vzniká mezi ionty přechodných kovů a histidinem. Proto byla afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů původně vyvinuta jako metoda pro separaci peptidů bohatých na histidin [191]. Bylo zjištěno, že ionty  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$  mají vyšší afinitu k funkčním skupinám bohatých na dusík, zatímco ionty  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  mají vyšší afinitu ke kyslíku fosfátové skupiny. Ionty  $\text{Fe}^{3+}$  mají vysokou afinitu k fosfátovým skupinám a zároveň relativně nízkou afinitu pro fenolové skupiny. Právě díky těmto vlastnostem jsou ionty  $\text{Fe}^{3+}$  nejčastěji využívány právě pro obohacení fosfopeptidů [190].

### **Afinitní chromatografie na oxidech kovů**

Afinitní chromatografie na oxidech kovů nejčastěji využívá jako matrice oxid titaničitý nebo oxid zirkoničitý. Tyto oxidy disponují vlastností, že v prostředí kyselého pH získávají kladný náboj a jsou schopny afinitně vázat negativně nabitě fosfátové skupiny. K eluci afinitně vázaných fosfopeptidů se nejčastěji používají roztoky hydroxidu amonného [188]. Oxid zirkoničitý disponuje vysokou fyzickou a tepelnou stabilitou [192] a i přes tyto vlastnosti je v současné době častěji využívanou maticí oxid titaničitý. Mimo výše zmíněných oxidů se jako matrice může využívat také oxid hlinitý nebo oxid niobičný [188].

### **Iontově výměnná chromatografie na silném katexu nebo silném anexu**

Obohacovací metody, využívající iontově výměnnou chromatografii na silném katexu nebo silném anexu, patří mezi přímé obohacovací metody, které dělí molekuly na základě jejich náboje. V případě chromatografie na silném katexu nese stacionární fáze negativně nabitě funkční skupiny. Na svůj povrch pevně váže kationty, které mohou být postupně eluovány zvyšujícím se gradientem soli nebo pH [193]. Fosfopeptidy se v takovémto případě, díky zápornému náboji fosfátových skupin, neváží na stacionární fázi [188]. Iontově výměnná chromatografie na silném anexu je založená na stejném principu, pouze s opačnými polaritami. V tomto případě stacionární fáze nese kladně nabitě funkční skupiny, které mají schopnost vázat anionty [193]. Zde se fosfopeptidy pomocí záporně nabitých fosfátových skupin váží na stacionární fázi a poté jsou eluovány přidávkem vhodného elučního činidla [188].

## **Hydrofilní interakční chromatografie**

Obohacovací metody využívající hydrofilní interakční chromatografii jsou založeny na vzájemné interakci molekul s hydrofilní stacionární fází, a to v důsledku vzniku vodíkových vazeb. Síla interakce se stacionární fází se zvyšuje s rostoucí polaritou molekul [194]. Základem této obohacovací metody v případě fosfopeptidů je, že tyto fosfopeptidy ve srovnání s nefosforylovanými peptidy mají vyšší hydrofilní charakter a jsou zadržovány stacionární fází, zatímco nefosforylované peptidy procházejí obohacovacím systémem bez zadržení. Eluce fosfopeptidů se provádí polární, hydrofilní mobilní fází. Jak hydrofilní interakční chromatografie, tak i iontově výměnná chromatografie na silném katexu nebo silném anexu nejsou samy o sobě dostatečně specifickými metodami. A právě proto jsou tyto metody využívány především jako první separační krok před specifitější metodou obohacení, jako například afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů [188].

## **Obohacovací metody založené na protilátkách**

Stejně jako pro detekční metody, tak taktéž pro metody obohacovací je možno využít fosfospecifické protilátky [176]. Tato obohacovací metoda využívá specifitu některých protilátek vůči fosforylovaným oblastem peptidů [188]. V dnešní době existuje několik komerčně dostupných protilátek, které jsou schopny specificky rozpoznávat fosforylované serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky [176]. Nejčastěji je tato obohacovací metoda modifikovaná jako imunoprecipitační reakce, při které dochází k precipitaci fosfopeptidů fosfospecifickými protilátkami. Vyšší úspěšnost obohacovacích metod založených na protilátkách byla prokázána u obohacování peptidů a proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích, a to i přes to, že ve srovnání s fosforylacemi serinu a threoninu se fosforylace tyrosinu vyskytují v daleko nižších hladinách [188].

## **Alternativní obohacovací metody založené na afinitní purifikaci**

Jednou z alternativních obohacovacích metod založených na afinitní purifikaci je obohacování pomocí značky Phos-tag. Jedná se o stejnou značku, která je používána taktéž k detekci fosfopeptidů a fosfoproteinů. Phos-tag značka je komplex nesoucí dva ionty  $Zn^{2+}$ , který byl navržen tak, aby měl v prostřední neutrálního pH vysokou afinitu pro fosfátové skupiny [195]. Druhou možností alternativní obohacovací metody založené na afinitní purifikaci je srážení fosfopeptidů s ionty  $Ca^{2+}$ . Tato metoda je založena na srážení ionty  $Ca^{2+}$ , kdy je ke vzorku obsahujícímu fosfopeptidy přidána vápenatá sůl. Vzájemná interakce těchto komponent vede ke vzniku nerozpustného fosforečnanu vápenatého, který může být poté od směsi peptidů oddělen [196].

### **Obohacovací metody na destičce**

Obohacovací metody přímo na destičkách sloužících pro MALDI analýzu hmotnostní spektrometrií jsou jednou z nejvhodnějších obohacovacích metod. Tento typ obohacení umožňuje minimální manipulaci se vzorkem, a tím i snížení ztrát zapříčiněných touto manipulací, jak je tomu u jiných obohacovacích metod. Povrch destiček může být modifikován ionty přechodných kovů, jako například  $\text{Ga}^{3+}$  nebo  $\text{Fe}^{3+}$ , různými druhy polymerů, oxidem zirkoničitým nebo oxidem titaničitým. Jedná se tedy o uplatnění některých výše zmíněných obohacovacích metod přímo na destičce. Samotný proces práce se vzorkem se skládá z inkubace vzorku na destičce za účelem vazby fosfopeptidů, následného proplachovacího kroku, který odstraní všechny nefosforylované peptidy, a konečného kroku přidání vhodné matrice [189].

### **Metody založené na chemické derivatizaci**

Metody založené na chemické derivatizaci zahrnují selektivní modifikaci fosfátové skupiny ještě před samotným obohacovacím krokem. Nejčastěji se tato metoda používá před analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. Důvodem této derivatizace je snaha o zvýšení citlivosti a sekvenčního pokrytí fosfopeptidové analýzy odstraněním fosfátových skupin před analýzou. Derivatizace zabraňuje neutrálním ztrátám kyseliny fosforečné, které mají za následek snížení fragmentační účinnosti zbývající části peptidu během analýzy tandemovou hmotností spektrometrií. Derivatizace se skládá z  $\beta$ -eliminačního kroku fosfátové skupiny a následné Michaelovy adice vhodné skupiny. Nejčastěji se fosfátová skupina eliminuje silnou bází, jako je hydroxid sodný nebo hydroxid barnatý, a poté je přidána látka, která je schopna vytvořit skupinu stabilněji vázanou na nenasycených zbytcích, jako například 1,2-ethandithiol [188].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Aparatura pro elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad (Hercules, CA USA)
- Aparatura pro Semi-dry Wester blot Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Bio vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Folie na mikrotitrační destičky (Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada)
- Fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Inkubátor Memmert INE 400 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- Inzulínová stříkačka U-100 (B. Braun, Praha, ČR)
- Koncentrátor Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor Tube SureBeads™, Bio-Rad (Hercules, CA USA)
- Magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- MALDI destička Opti-TOF™ 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)
- Mikrostríkačka Hamilton (Hamilton AG, Bonaduz, GR, Švýcarsko)
- Mikrozkmavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destička s plochým dnem, 96 jamek (Anicrin S.R.L., Scorzè, Itálie)
- Nitrocelulózová (NC) membrána, porozita 0,2 µm, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Nosič Titansphere™ TiO Bulk Material, 5 µm (GL Sciences™, Tokio, Japonsko)
- OLIGO™ R3 Reversed – Phase Resin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Orbitální třepačka Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Parafilm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- pH papírky (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Silné filtrační papíry Extra thick blot paper, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Multiscan RC, typ 351 (Thermo LabSystems Inc., Helsinky, Finsko)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky BioTek PowerWave 340 (Thermo LabSystems Inc., Helsinky, Finsko)
- Stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Špičky s prodlouženým tenkým koncem Eppendorf GELoader Tips 20 $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Topné hnízdo Block heater Grant Bio BTB (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky Grant Bio PMS-100i (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- Vakuovačka (ETA, Praha, ČR)
- Zdroj napětí Powerpac 200, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Zkumavky 0,2; 0,5; 1,5; 2; 5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)

### 3.2 Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič

#### Použité chemikálie:

- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>)
- MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Src kináza, lidská, aktivní, rekombinantní, exprimovaná v *E. Coli*, ≥ 70 % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 83 kDa, aktivita 83 – 113 nmol/min·mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 0,5 M MES pufr, pH 6,0
- 50 mM MES pufr, pH 6,0
- 40 mM HEPES pufr, pH 7,2
- 9 M NaOH
- Reakční pufr, pH 7,2: 40 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EGTA

#### Použité magnetické nosiče:

- ProMag<sup>®</sup> HC 1 Series, magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou, Ø 0,87 µm (Bangs Laboratories Inc., Indiana, USA)
- Sera-Mag Speed Beads, magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou, Ø 0,816 µm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

#### Postup:

Metoda imobilizace Src kinázy na magnetický nosič byla upravena podle [159]. Postup je uveden pro vazbu 1,5 µg Src kinázy na 0,3 mg magnetického nosiče. Bylo odebráno 0,3 mg magnetických částic, které byly pomocí magnetického separátoru promyty 5× 1 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0. K magnetickým částicím bylo přidáno 660 µl ultračisté vody, 110 µl 0,5 M MES pufru, pH 6,0, 2,42 mg Sulfo-NHS ve 220 µl ultračisté vody a 2,2 mg EDAC

ve 110  $\mu$ l ultračisté vody. Takto připravená reakční směs byla inkubována (30 minut, laboratorní teplota, mírné otáčení). Poté byly magnetické částice promyty 1  $\times$  1 ml 0,5 M MES pufru, pH 6,0 a 1  $\times$  1 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0. Po promytí bylo k částicím přidáno 485  $\mu$ l 50 mM MES pufru, pH 6,0 a 15  $\mu$ l (1,5  $\mu$ g) Src kinázy. Takto připravená reakční směs byla inkubována (16 hodin, 4  $^{\circ}$ C, mírné otáčení). Následující den byla od částic odebrána vazebná frakce, která byla zamražena na -20  $^{\circ}$ C a částice byly promyty 4  $\times$  1 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0, 3  $\times$  1 ml 40 mM HEPES pufru, pH 7,2 a resuspendovány v 0,6 ml reakčního pufru. Pro pozdější použití mohou být magnetické částice s imobilizovanou Src kinázou skladovány v 40 mM HEPES pufru, pH 7,2 při teplotě 4  $^{\circ}$ C.

### 3.3 Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou

Metoda fosforylace peptidového substrátu Src kinázou vychází z principu uvedeného v [197]. Metoda byla založena na reakci peptidového substrátu s ATP za katalýzy Src kinázou v přítomnosti  $Mg^{2+}$  v prostředí pH 7,2. Výsledným produktem reakce je fosforylovaný peptidový substrát a ADP.

#### Použité chemikálie:

- Adenosin-5'-trifosfát, 10 mM (ATP, New England Biolabs, Massachusetts, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid hořečnatý ( $MgCl_2$ )
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Peptidový substrát pro c-Src kinázu, aminokyselinová sekvence: H-Tyr-Ile-Tyr-Gly-Ser-Phe-Lys-OH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)
- Src kináza, lidská, aktivní, rekombinantní, exprimovaná v *E. Coli*,  $\geq 70$  % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 83 kDa, aktivita 83 – 113 nmol/min·mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 5% TFA
- 9 M NaOH
- 40 mM HEPES pufr, pH 7,2

- Reakční pufr, pH 7,2: 40 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EGTA

### **3.3.1 Fosforylace peptidového substrátu solubilní Src kinázou v čase**

#### Postup:

Byly připraveny tři různé reakční směsi, přičemž každá byla připravena ve třech opakováních. Pro přípravu první reakční směsi bylo do zkumavky dávkováno 87 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM), 5 µl (10 µg) peptidového substrátu a 3 µl (0,3 µg) Src kinázy. Pro přípravu druhé reakční směsi bylo do zkumavky dávkováno 85 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM), 5 µl (10 µg) peptidového substrátu a 5 µl (0,5 µg) Src kinázy. Pro přípravu třetí reakční směsi bylo do zkumavky dávkováno 80 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM), 5 µl (10 µg) peptidového substrátu a 10 µl (1 µg) Src kinázy. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány (24 hodin, 30 °C, 250 rpm). V časech 5 minut, 15 minut, 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny, 5 hodin a 24 hodin byly ze všech reakčních směsí odebrány frakce o objemu 10 µl, které byly okyseleny přidávkem 10 µl 5% TFA na hodnotu pH 1 – 2. Vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.3.2 Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič v čase**

#### Postup:

Z magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou byly vytvořeny tři alikvoty obsahující 0,1 mg magnetických částic. Ke každému alikvotu magnetických částic byly přidány reakční komponenty, a to 90 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM) a 5 µl (10 µg) peptidového substrátu. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány (24 hodin, 30 °C, 250 rpm). V časech 5 minut, 15 minut, 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny, 5 hodin a 24 hodin byly ze všech reakčních směsí odebrány frakce o objemu 10 µl (s magnetickými částicemi). Magnetické částice byly odseparovány a frakce s fosforylovaným peptidovým substrátem byly okyseleny přidávkem 10 µl 5% TFA na hodnotu pH 1 – 2. Vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.3.3 Stanovení operační stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič**

#### Postup:

Z magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou byly vytvořeny dva alikvoty obsahující 0,1 mg magnetických částic. Ke každému alikvotu magnetických částic byly přidány reakční komponenty, a to 90 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM) a 5 µl (10 µg) peptidového substrátu. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány (24 hodin, 30 °C, 250 rpm). Po

24 hodinách byly z obou reakčních směsí odebrány frakce o objemu 10  $\mu$ l (s magnetickými částicemi). Magnetické částice byly odseparovány a frakce s fosforylovaným peptidovým substrátem byly okyseleny přidavkem 10  $\mu$ l 5% TFA na hodnotu pH 1 – 2. Vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly skladovány při teplotě -20 °C. Po provedení reakce a odebrání frakcí byly magnetické částice promyty 3 $\times$  0,2 ml 40 mM HEPES pufru, pH 7,2. Totožná reakce byla se stejnými magnetickými částicemi provedena v dalších pěti po sobě jdoucích opakováních.

### **3.3.4 Stanovení skladovací stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič**

#### Postup:

Z magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou bylo vytvořeno 10 alikvotů obsahujících 0,1 mg magnetických částic. Každý týden byly ke dvěma alikvotům přidány reakční komponenty, a to 90  $\mu$ l reakčního pufru, 5  $\mu$ l ATP (0,5 mM) a 5  $\mu$ l (10  $\mu$ g) peptidového substrátu. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány (24 hodin, 30 °C, 250 rpm). Poté byly z obou reakčních směsí odebrány frakce o objemu 10  $\mu$ l (s magnetickými částicemi). Magnetické částice byly odseparovány a frakce s fosforylovaným peptidovým substrátem byly okyseleny přidavkem 10  $\mu$ l 5% TFA na hodnotu pH 1 – 2. Vzorky fosforylovaných peptidových substrátů byly skladovány při teplotě -20 °C. Po provedení reakce a odebrání frakcí byly magnetické částice promyty 3 $\times$  0,2 ml 40 mM HEPES pufru, pH 7,2 a skladovány při teplotě 4 °C. Totožná reakce byla každý týden provedena se dvěma novými alikvoty magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou.

### **3.4 Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou**

#### Použité chemikálie:

- Acetonitril 99,9% (ACN, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Adenosin-5'-trifosfát, 10 mM (ATP, New England Biolabs, Massachusetts, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>)
- Kyselina trifluorooctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Myelinový bazický protein z hovězího mozku, lyofilizát, čistota  $\geq 90\%$  (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 18,4 kDa (MBP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Src kináza, lidská, aktivní, rekombinantní, exprimovaná v *E. Coli*,  $\geq 70\%$  (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 83 kDa, aktivita 83 – 113 nmol/min·mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- 0,05% TFA
- 5% TFA
- 9 M NaOH
- Reakční pufr, pH 7,2: 40 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EGTA
- Zásobní roztok MBP o koncentraci 1 mg/ml ultračisté vody

### **3.4.1 Fosforylace myelinového bazického proteinu solubilní Src kinázou**

Postup:

Byla připravena reakční směs, která obsahovala 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g) zásobního roztoku MBP, 10  $\mu$ l ATP (1 mM), 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g) solubilní Src kinázy a 70  $\mu$ l reakčního pufru. Reakční směs byla inkubována (20 hodin, 30 °C, 250 rpm). Po inkubaci byla reakční směs rozdělena na alikvoty obsahující 2  $\times$  2  $\mu$ g fosforylovaného MBP, ke kterým bylo přidáno 7  $\mu$ l 4 $\times$  Laemmlí Sample Buffer s přidavkem 2-merkaptoethanolu (3 minuty, 100 °C, skladování 4 °C) (analýza metodou Western blot), 5  $\mu$ g fosforylovaného MBP (analýza hmotnostní spektrometrií) a 1  $\mu$ g fosforylovaného MBP (analýza kitem pIMAGO), které byly okyseleny přidavkem 5% TFA na výsledné pH 3 – 4. Okyselené vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.4.2 Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič**

Postup:

Bylo odebráno 0,1 mg magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou, ke kterým bylo přidáno 5  $\mu$ l (5  $\mu$ g) zásobního roztoku MBP, 5  $\mu$ l ATP (0,5 mM) a 90  $\mu$ l reakčního pufru. Reakční směs byla inkubována (20 hodin, 30 °C, 250 rpm). Po inkubaci byly magnetické částice odděleny a byl odebrán roztok s fosforylovaným MBP. Za účelem uvolnění sorbovaného MBP byly magnetické částice promyty 2  $\times$  100  $\mu$ l 0,05% TFA (2 minuty, laboratorní teplota, mírné otáčení). Po promytí byly magnetické částice odděleny a veškerý objem 0,05% TFA byl přidán k již odebranému roztoku s fosforylovaným MBP. Celý objem byl poté rozdělen na alikvoty o obsahu 2  $\mu$ g fosforylovaného MBP (analýza hmotnostní

spektrometrií), 2 µg fosforylovaného MBP (analýza metodou Western blot) a 1 µg fosforylovaného MBP (analýza kitem pIMAGO). Všechny alikvoty byly okyseleny přidavkem 5% TFA na hodnotu pH 3 – 4 a skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.5 Defosforylace myelinového bazického proteinu alkalickou fosfatázou**

#### Použité chemikálie:

- Alkalická fosfatáza z hovězí ledviny, lyofilizát, aktivita  $\geq 5$  U/mg proteinu (ALP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2$ )
- Chlorid zinečnatý ( $\text{ZnCl}_2$ , Lachema, Neratovice, ČR)
- Myelinový bazický protein z hovězího mozku, lyofilizát, čistota  $\geq 90$  % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 18,4 kDa (MBP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- Reakční pufr, pH 10,4: 0,1 M glycin, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{ZnCl}_2$
- Zásobní roztok ALP o koncentraci 1 mg/ml reakčního pufru
- Zásobní roztok MBP o koncentraci 1 mg/ml ultračisté vody

#### Postup:

Byla připravena reakční směs, která obsahovala 5 µl (5 µg) zásobního roztoku MBP, 10 µl (10 µg) zásobního roztoku ALP a 35 µl reakčního pufru. Reakční směs byla inkubována (2 hodiny, 30 °C, 250 rpm). Vzorek defosforylovaného MBP byl skladován při teplotě -20 °C.

### **3.6 Fosforylace proteinu Tau-441 Src kinázou**

#### Použité chemikálie:

- Adenosin-5'-trifosfát, 10 mM (ATP, New England Biolabs, Massachusetts, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2$ )
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)



- Protein Tau-441, rekombinantní, DNA sekvence kódující lidskou tau-441 izoformu 2N4R, původ *E. coli*, lyofilizát, bez His-tagu, čistota > 90 % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 45,9 kDa (rPeptide, Bogart, GA, USA)
- Src kináza, lidská, aktivní, rekombinantní, exprimovaná v *E. Coli*,  $\geq 70$  % (SDS-PAGE), molekulová hmotnost 83 kDa, aktivita 83 – 113 nmol/min·mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 0,05% TFA
- 5% TFA
- 9 M NaOH
- Reakční pufr, pH 7,2: 40 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EGTA
- Zásobní roztok proteinu Tau-441 o koncentraci 100 µg/100 µl ultračisté vody

### **3.6.1 Fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou**

#### Postup:

Byla připravena reakční směs, která obsahovala 10 µl (10 µg) zásobního roztoku proteinu Tau-441, 10 µl ATP (1 mM), 5 µl (0,5 µg) solubilní Src kinázy a 70 µl reakčního pufru. Reakční směs byla inkubována (20 hodin, 30 °C, 250 rpm). Po inkubaci byla reakční směs rozdělena na alikvoty obsahující 2 × 2 µg fosforylovaného proteinu Tau-441, ke kterým bylo přidáno 7 µl 4 × Laemmli Sample Buffer s přídavkem 2-merkptoethanolu (3 minuty, 100 °C, skladování 4 °C) (analýza metodou Western blot), 5 µg fosforylovaného proteinu Tau-441 (analýza hmotnostní spektrometrií) a 1 µg fosforylovaného proteinu Tau-441 (analýza kitem pIMAGO), které byly okyseleny přídavkem 5% TFA na výsledné pH 3 – 4. Okyselené vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.6.2 Fosforylace proteinu Tau-441 Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič**

#### Postup:

Bylo odebráno 0,1 mg magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou, ke kterým bylo přidáno 10 µl (10 µg) zásobního roztoku proteinu Tau-441, 10 µl ATP (1 mM) a 80 µl reakčního pufru. Reakční směs byla inkubována (20 hodin, 30 °C, 250 rpm). Po inkubaci byly magnetické částice odděleny a byl odebrán roztok s fosforylovaným proteinem Tau-441. Za účelem uvolnění sorbovaného proteinu Tau-441 byly magnetické částice promyty 2 × 100 µl 0,05% TFA (2 minuty, laboratorní teplota, mírné otáčení). Po promytí byly magnetické částice

odděleny a veškerý objem 0,05% TFA byl přidán k již odebranému roztoku s fosforylovaným proteinem Tau-441. Poté byl celý objem reakční směsi rozdělen, zpracován a skladován jako v případě kapitoly 3.6.1.

### **3.7 Detekce fosfoproteinů pomocí kitu pIMAGO-biotin pro uspořádání na mikrotitrační destičce**

#### Použité chemikálie:

- pIMAGO<sup>®</sup>-biotin Phosphoprotein Detection Kit, for Microplate Blot, HRP-based detection (400 wells) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- TBS-T, pH 7,5: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20

#### Postup:

Vzorky fosfoproteinů byly rozpuštěny ve vazebném pufru v koncentracích 25 – 400 ng/100 µl a následně dávkovány po 100 µl/jamka na mikrotitrační destičku. Takto připravená destička byla inkubována (16 hodin, 4 °C, 400 rpm). Po inkubaci byl obsah jamek vyklepnut, do jamek byl pipetován blokační roztok 150 µl/jamka a destička byla inkubována (2-3 minuty, laboratorní teplota). Následně byl obsah jamek vyklepnut a jamky destičky byly opět blokovány 150 µl/jamka blokačním roztokem (30 minut, laboratorní teplota, 400 rpm). V průběhu inkubace byl do zkumavky připraven roztok pIMAGO reagentie v pIMAGO pufru a to tak, že na každých 100 µl pIMAGO pufru byl přidán 1 µl pIMAGO reagentie. Po inkubaci byla destička vyklepnuta a byl přidán roztok pIMAGO reagentie po 100 µl/jamka. Takto připravená destička byla inkubována (1 hodina, laboratorní teplota, 400 rpm). Po inkubaci byla destička vyklepnuta a promyta pIMAGO pufrem 150 µl/jamka (3× 2 minuty, laboratorní teplota, 400 rpm). Poté byla destička blokována blokačním roztokem 150 µl/jamka (15 minut, laboratorní teplota, 400 rpm). V průběhu blokace byl připraven roztok konjugátu avidin-HRP v blokačním roztoku a to tak, že na každých 100 µl blokačního roztoku byl přidán 1 µl avidin-HRP. Takto připravený roztok byl po blokaci a vyklepnutí destičky dávkován po 100 µl/jamka na mikrotitrační destičku a následovala inkubace (1 hodina, laboratorní teplota, 400 rpm). Poté byla destička vyklepnuta a promyta 150 µl/jamka TBS-T, pH 7,2 (3× 2 minuty, laboratorní teplota, 400 rpm). Následně byl přidán substrát po 100 µl/jamka. Destička byla

inkubována (laboratorní teplota, 400 rpm) až do zeleno – modrého zbarvení jamek. Poté byla reakce zastavena přidávkem zastavovacího roztoku po 150 µl/jamka. Nakonec byla proměřena absorbance při 415 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.

### **3.8 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného a glycinu**

#### Použité chemikálie:

- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, Lachema, Neratovice, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl, Penta, Chrudim, ČR)
- Marker molekulových hmotností:
  - Precision Plus Protein™ Dual Color Protein Standards, 10 – 250 kDa, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
  - Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- N,N'-metylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N, N, N, N-tetramethylenethylendiamin (TEMED, Lachema, Neratovice, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 6 M HCl
- Roztok A: 29,2% akrylamid, 0,8% N,N'-metylenbisakrylamidu
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- Roztok C: 1 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- Roztok D: 10% SDS
- Roztok E: 10% persíran amonný
- Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3 – 8,6
- Vzorkový pufr
  - Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad (Hercules, CA, USA) bez přidavku 2-merkaptoethanolu

- 1× a 4× Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad (Hercules, CA, USA) s přidavkem 2-merkaptoethanolu

#### Postup:

Skla potřebná k vytvoření gelu byla nejprve očištěna lihem a poté vložena do držáku. Držák se zajištěnými skly byl vložen do stojánku, ve kterém probíhá nalévání a následná polymerace gelu.

Směs pro dělicí gel byla vytvořena smícháním destilované vody, roztoku A, B, D, E a TEMED, přičemž přesné objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v Tab. 1. Takto vytvořená směs byla homogenizována promícháním, nadávkována mezi skla a převrstvena destilovanou vodou. Polymerace dělicího gelu probíhala 20 minut. Po uplynutí doby potřebné k polymeraci byla destilovaná voda odsáta filtračním papírem a byla připravena směs pro zaostřovací gel. Směs pro zaostřovací gel byla připravena smícháním destilované vody, roztoku A, C, D, E a TEMED, přičemž přesné objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v Tab. 1. Takto vytvořená směs byla homogenizována promícháním, nadávkována mezi skla, na již zpolymerovanou vrstvu dělicího gelu a to tak, že vrstva zaostřovacího gelu sahala až po horní okraj skel. Po nadávkování směsi pro zaostřovací gel byla mezi skla vložena šablona umožňující vytvoření jamek. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala 20 minut. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byla opatrně vyjmuta šablona a skla s gelem byla vytažena nejprve ze stojánku a poté i z držáku a následně vložena do stojánku s elektrodami a takto přenesena do elektroforetické vany. Vnitřní prostor mezi gely byl vyplněn elektrodovým pufrem až po okraj skel a jamky byly opatrně promyty elektrodovým pufrem.

V této fázi je gel připraven k aplikaci vzorku. Každý vzorek byl smíchán s vzorkovým pufrem v poměru 1:1, promíchán a následně vložena na 3 minuty do termobloku předehřátého na 100 °C. Takto připravené vzorky byly po ochlazení na laboratorní teplotu dávkovány Hamiltonovou pipetou do jamek zaostřovacího gelu. Marker molekulových hmotností byl na gel dávkován bez úpravy.

Po nadávkování vzorků a markeru byl prostor elektroforetické vany vyplněn elektrodovým pufrem, vana byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí na kterém bylo nastaveno napětí 180 V a proudu 30 mA v případě separace jednoho polyakrylamidového gelu. Průměrná doba separace činila 45 minut.

**Tab. 1** Příprava dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE v přítomnosti glycinu

	Dělicí gel [ml]			Zaostřovací gel [ml] 5%
	10%	12%	16,5%	
Destilovaná voda	2	1,68	0,9	1,4
Roztok A	1,65	2	2,75	0,33
Roztok B	1,25	1,25	1,25	-
Roztok C	-	-	-	0,25
Roztok D	0,05	0,05	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002	0,002	0,002
Roztok E	0,05	0,05	0,05	0,02

### 3.8.1 Barvení gelu roztokem Coomassie G-250 Stain

#### Použité chemikálie:

- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina octová 99% (CH<sub>3</sub>COOH, Lach-Ner, Neratovice, ČR)

#### Použité roztoky:

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

#### Postup:

Po elektroforetické separaci byl gel vyjmut z elektroforetické aparatury a uvolněn ze skel. Veškeré inkubace probíhaly při laboratorní teplotě a za mírného míchání. Gel byl propláchnut destilovanou vodou a poté inkubován 30 minut ve fixačním roztoku. Následně byl gel 30 minut rehydratován v destilované vodě a poté převrstven barvicím roztokem a inkubován 1 hodinu. Po obarvení byl gel 2× 30 minut proplachován destilovanou vodou.

### 3.8.2 Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra

#### Použité chemikálie:

- Amoniak vodný roztok 25-29% (Penta, Chrudim, ČR)
- Dusičnan stříbrný (AgNO<sub>3</sub>, Penta, Chrudim, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Formaldehyd vodný roztok 36 – 38% (Penta, Chrudim, ČR)
- Glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citronová bezvodá (Penta, Chrudim, ČR)

- Kyselina octová 99% (CH<sub>3</sub>COOH, Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- 10% glutaraldehyd
- Fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- Roztok amoniakálního stříbra:
  - 20% AgNO<sub>3</sub> byl přikapáván k roztoku (10,5 ml destilované vody, 0,7 ml vodného roztoku amoniaku a 119,5 μl 9 M NaOH) do vzniku světle hnědého zákalu. Poté byl roztok doplněn destilovanou vodou na konečný objem 50 ml.
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová, 0,04% formaldehyd

Postup:

Po elektroforetické separaci byl gel vyjmut z elektroforetické aparatury a uvolněn ze skel. Veškeré inkubace probíhaly při laboratorní teplotě a za mírného míchání. Gel byl propláchnut destilovanou vodou a následně 30 minut fixován ve fixačním roztoku. Po fixaci byl gel 30 minut rehydratován v destilované vodě a následně inkubován 30 minut v 10% glutaraldehydu. Poté byl gel 6× po dobu 10 minut proplachován destilovanou vodou. Propláchnutý gel byl inkubován 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra. Následně byl gel propláchnut destilovanou vodou a vyvolán ve vyvolávacím roztoku. Vyvolaný gel byl přenesen do roztoku ustalovacího, ve kterém může být také skladován.

### **3.9 Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí**

#### **3.9.1 Westernový přenos proteinů na membránu**

Použité chemikálie:

- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol 99,9% (Penta, Chrudim, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Transferový roztok (Towbin): 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol

Postup:

Veškerá manipulace s nitrocelulózovou membránou a blotovacími papíry byla prováděna výhradně pomocí pinzety. Před samotným transferem byla nitrocelulózová membrána a dva blotovací papíry inkubovány v transferovém roztoku (30 minut, 4 °C). Po

provedení elektroforetické separace proteinů byl gel promyt destilovanou vodou a inkubován v transferovém roztoku (20 minut, 4 °C). Do Western blotové aparatury byl nejprve umístěn blotovací papír, následně nitrocelulózová membrána, poté polyakrylamidový gel a jako poslední byl umístěn druhý blotovací papír. Poté byla aparatura uzavřena víkem. Transfer probíhal 30 minut při konstantním napětí 12 V.

### **3.9.2 Detekce přenosu proteinů na membránu roztokem Ponceau S**

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99% (CH<sub>3</sub>COOH, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

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

Postup:

Po provedení westernového přenosu proteinů na membránu byla membrána inkubována 20 minut v roztoku Ponceau S při laboratorní teplotě a za mírného míchání. Poté bylo dle vizuálního hodnocení odbarveno pozadí membrány proudem destilované vody ze stříčky.

### **3.9.3 Detekce fosfoproteinů na membráně s využitím specifických protilátek**

Použité chemikálie:

- Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
  - Roztok chemiluminiscenčního substrátu: roztok peroxidu a roztok luminolu s urychlovačem, poměr 1:1
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, Penta, Chrudim, ČR)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid draselný (KCl, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Sušené mléko, odtučněné (Nutri Star, Praha, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- Blokační roztok: 10% sušené mléko v PBS-T, pH 7,2

- PBS-T, pH 7,2: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,1% Tween 20
- Ředící roztok pro protilátky: 1% BSA v PBS-T, pH 7,2

#### Použité primární protilátky:

- Monoklonální myší anti-pTyr protilátka, uchovávací roztok: 20 mM fosfátový pufr, pH 7,5, 150 mM chlorid sodný, 50% glycerol, 3 mM azid sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité sekundární protilátky:

- Polyklonální kozí anti-myší IgG protilátka konjugovaná s peroxidázou, uchovávací roztok: 0,01 M PBS pH 7,4, 150 mM chlorid sodný, 1% BSA a 0,01% thimerosal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Postup:

Po provedení westernového přenosu proteinů na membránu byla membrána blokována v blokačním roztoku (2 hodiny, laboratorní teplota, mírné míchání). Po blokaci byla membrána inkubována s primární protilátkou ředěnou v poměru 1:2000 (16 hodin, 4 °C, mírné otáčení). Po inkubaci byla membrána promyta v PBS-T, pH 7,2 (4× 5 minut, laboratorní teplota, mírné míchání). Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou ředěnou v poměru 1:10000 (2 hodiny, laboratorní teplota, mírné otáčení). Po inkubaci byla membrána promyta v PBS-T, pH 7,2 (5× 5 minut, laboratorní teplota, mírné míchání). Následně byla membrána přenesena na parafilm a na její povrch byl nanesen chemiluminiscenční substrát a následovala inkubace (5 minut, laboratorní teplota, mírné míchání). Nakonec byla provedena chemiluminiscenční detekce.

### **3.10 Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii a následná analýza**

#### **3.10.1 Proteolytické štěpení proteinu solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci**

##### Použité chemikálie:

- 2-jodoacetamid (IAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenuhličitan amonný (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)
- Kyselina mravenčí (HCOOH, Fluka, New Jersey, USA)
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)



- Modifikovaný Trypsin pro sekvenaci/Lys-C Mix, Mass Spec Grad, aktivita: 19136 U/mg (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

Použité roztoky:

- 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 200 mM DTT v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 10 mM DTT ve 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 400 mM IAA v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 55 mM IAA ve 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 0,1% TFA
- 10% TFA
- Extrakční roztok: 60% ACN/2% HCOOH
- Odbarvovací roztok: 50% ACN/50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

**Proteolytické štěpení solubilních proteinů solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci**

Postup:

Vzorek proteinu byl odpařen v koncentrátoru (30 °C, 1400 rpm) a následně rozpuštěn v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> do celkového objemu 60 µl. Ke vzorku bylo přidáno 10 µl 200 mM DTT v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a následovala inkubace reakční směsi v termobloku s třepáním (30 minut, 60 °C, 500 rpm). Po vychlazení reakční směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 µl 400 mM IAA v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a následovala inkubace (30 minut, laboratorní teplota, ve tmě). Poté bylo k reakční směsi přidáno 10 µl 200 mM DTT v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> za účelem neutralizace přebytečného IAA. Tato reakční směs byla inkubována (15 minut, laboratorní teplota). Během neutralizace byl připraven zásobní roztok modifikovaného trypsinu, z něhož bylo odpipetováno množství potřebné k reakci. Do reakce byl modifikovaný trypsin přidáván v hmotnostním poměru 1:50 (modifikovaný trypsin:protein). Odebrané množství modifikovaného trypsinu bylo zahřáto na 30 °C po dobu 15 minut. Takto připravený trypsin byl přidán k roztoku proteinu a reakční směs byla doplněna 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> do celkového objemu 95 µl. Následovala inkubace (16 hodin, 37 °C, 500 rpm). Po naštěpení proteinu byla reakce zastavena přidáním 5 µl 10% TFA. Vzorky naštěpeného proteinu byly skladovány při teplotě -20 °C.

## **Proteolytické štěpení proteinů v polyakrylamidovém gelu solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci**

### Postup:

Příslušné proužky proteinu byly vyříznuty z polyakrylamidového gelu barveného Coomassie G-250 Stain, přeneseny do zkumavky a rozdrceny na menší kousky. Ke gelu bylo přidáno 100  $\mu$ l odbarvovacího roztoku a následovala inkubace (30 minut, laboratorní teplota). Pokud nedošlo k odbarvení gelu, krok byl zopakován. Poté bylo ke gelu přidáno 400  $\mu$ l 99,9% ACN. Inkubace probíhala, dokud gel nebyl bílý a následně byl zbylý roztok odsán. Ke vzorku bylo poté přidáno 50  $\mu$ l 10 mM DTT a následovala inkubace (30 minut, 60 °C, 500 rpm). Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 400  $\mu$ l 99,9% ACN. Inkubace probíhala, dokud gel nebyl bílý a následně byl zbylý roztok odsán. Poté bylo ke vzorku přidáno 50  $\mu$ l 55 mM IAA a následovala inkubace (30 minut, laboratorní teplota, ve tmě). Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 400  $\mu$ l 99,9% ACN. Inkubace probíhala, dokud gel nebyl bílý a následně byl zbylý roztok odsán. Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku trypsinu o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 10% ACN. Takto byl vzorek inkubován (50 minut, 4 °C). Po inkubaci byl vzorek přemístěn do termobloku s třepáním a inkubován (18 hodin, 37 °C, 500 rpm). Po naštěpení byl odebrán supernatant a okyselen 5% TFA na výslednou hodnotu pH 3 – 4. Ke zbylému gelu bylo přidáno 50  $\mu$ l extrakčního roztoku a následovala inkubace (15 minut, 37 °C, 500 rpm). Extrahované peptidy byly vysušeny (45 °C, 1400 rpm) a rozpuštěny ve 20  $\mu$ l 0,1% TFA. Vzorky peptidů byly skladovány při -20 °C.

### **3.10.2 Obohacení fosfopeptidů na nosiči Titansphere™ TiO Bulk Material**

#### Použité chemikálie:

- Acetonitril 99,9% (ACN, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid amonný ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina mléčná 85% (LA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 20% TFA
- 20% ACN s 0,5% TFA
- 80% ACN s 0,1% TFA
- 80% ACN s 1% TFA

- 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA
- Eluční roztok: 1% NH<sub>4</sub>OH

#### Postup:

Pro obohacení fosfopeptidů bylo odebráno 0,5 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material, který byl pomocí centrifugace promyt 1× 400 µl 80% ACN s 0,1% TFA (1 minuta, 3000 rpm) a 1× 400 µl 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA (1 minuta, 3000 rpm). K takto připravenému nosiči byl přidán vzorek fosfopeptidů rozpuštěný v 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA do celkového objemu 200 µl. Nosič s naneseným vzorkem byl poté inkubován (30 minut, laboratorní teplota, 1150 rpm, ve tmě). Po inkubaci byl odebrán roztok s nenavázanými složkami a nosič byl promyt 2× 400 µl 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA, 2× 400 µl 80% ACN s 1% TFA a 1× 400 µl 20% ACN s 0,5% TFA. K promytému nosiči bylo přidáno 100 µl elučního roztoku a následovala inkubace (15 minut, laboratorní teplota, 1400 rpm). Po inkubaci byl roztok nad nosičem odebrán a okyselen 20% TFA na výslednou hodnotu pH 3 – 4. Obohacené vzorky fosfopeptidů byly skladovány při teplotě -20 °C.

### **3.10.3 Odsolení vzorků na reverzní fázi OLIGO™ R3**

#### Použité chemikálie:

- Acetonitril 99,9% (ACN, 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)
- Kyselina trifluoroctová 99% (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Použité roztoky:

- 80% ACN s 0,1% TFA
- 0,1% TFA
- Matrice pro fosfopeptidy: DHB 10 mg/ml v 50% ACN s 0,1% TFA a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Suspenze fáze: OLIGO™ R3 Reversed – Phase Resin v 80% ACN s 0,1% TFA

#### Postup:

Konec GELoaderu byl na posledních 2-3 mm stlačen tak, aby nedocházelo k uvolňování fáze. Do takto připraveného GELoaderu bylo dávkováno 10-15 µl suspenze fáze. Fáze byla opatrně stlačena inzulínovou stříkačkou, díky čemuž došlo ke generaci mírného přetlaku, který zajistil průchod fáze GELoaderem. Dávkovaný objem suspenze fáze byl upraven tak, aby délka mikrokolonky dosahovala přibližně 1 cm. Do takto připravené mikrokolonky bylo dávkováno 10 µl 80% ACN s 0,1% TFA a obsah byl plně protlačen skrz mikrokolonku.

Poté byla mikrokolonka promyta 15  $\mu$ l 0,1% TFA tak, aby 5  $\mu$ l zůstalo nad fází (takto připravené mikrokolonky je možno skladovat při teplotě 4 °C). Od této chvíle bylo vše skrz mikrokolonku protlačováno zpět do původních zkumavek se vzorkem a to proto, aby byl vzorek případně k dispozici, i když naředený. Na připravenou mikrokolonku bylo pipetováno 20  $\mu$ l okyseleného, v případě potřeby i obohaceného vzorku a protlačeno skrz mikrokolonku tak, aby nedocházelo k vysušování fáze proudem vzduchu. Fáze s navázaným vzorkem byla promyta 15  $\mu$ l 0,1% TFA a zbytkový vzduch byl protlačen skrz fázi. Eluce vzorku na spotu MALDI destičky byla provedena 4  $\mu$ l matrice.

### 3.10.4 Analýza vzorků hmotnostní spektrometrií

#### Postup:

Analýza vzorků byla provedena Mgr. R. Kupčíkem z KBBV. Vzorky byly analyzovány na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL, který analyzuje v pozitivním módu s rozlišovací schopností 60000 (FWHM u  $m/z = 400$ ).

### 3.10.5 Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií

#### **Stanovení míry fosforylace peptidového substrátu solubilní/imobilizovanou Src kinázou**

#### Postup:

I přes to, že může docházet k rozdílům v ionizaci substrátu před a po fosforylaci a nemusí tak nutně intenzita plně odpovídat reálné koncentraci jednotlivých položek, tak byla tato metoda využita k porovnání fosforylace a byla pro potřeby hodnocení této práce nazvána jako míra fosforylace dle [159]. Metodou hmotnostní spektrometrie byla získána MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra. Poměr hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) fosforylované formy peptidového substrátu pro c-Src kinázu odpovídá hodnotě 957,4, zatímco  $m/z$  nefosforylované formy peptidového substrátu odpovídá hodnotě 877,4. Z hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity píků odpovídající fosforylované a nefosforylované formě peptidového substrátu. Ze získaných intenzit byla vypočtena procentuální míra fosforylace peptidového substrátu podle Rovnice 2.

$$\text{Míra fosforylace [\%]} = \frac{I (\text{fosforylovaný substrát})}{I (\text{nefosforylovaný substrát}) + I (\text{fosforylovaný substrát})} \times 100$$

**Rovnice 2** Výpočet míry fosforylace peptidového substrátu [%], I – relativní intenzita píku

## **Vyhodnocení analýzy proteinů**

### Postup:

Metodou hmotnostní spektrometrie byla získaná MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra. Výsledky analýzy byly vyhodnoceny metodou „Peptide Mass Fingerprinting“ v online programu MS-Fit, který je součástí ProteinProspector v 5.19.1. Experimentální data v tomto programu byla porovnána s teoretickými hodnotami proteinů ze Swiss-Prot databáze. Maximální možná chyba v přesnosti určení hmoty byla stanovena na 10 ppm a povoleny maximálně dvě vynechaná místa štěpení. Jako variabilní modifikace byly nastaveny: fosforylace (S, T, Y), oxidace (M), glutamin na kyselinu pyroglutámovou a acetylace N-terminální části proteinu. Jako fixní modifikace byla nastavena karbamidomethylace (C).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stěžejním tématem diplomové práce byla imobilizace Src kinázy na magnetické částice a sledování míry aktivity imobilizované kinázy pomocí fosforylace peptidového substrátu s cílem ověřit stabilitu imobilizované kinázy. Pro ověření schopnosti solubilní i imobilizované Src kinázy fosforylovat vysokomolekulární substrát byly vybrány dva modelové proteiny, a to hovězí myelinový bazický protein a rekombinantní protein Tau-441, kódující lidskou izoformu 2N4R.

### 4.1 Příprava imobilizované Src kinázy

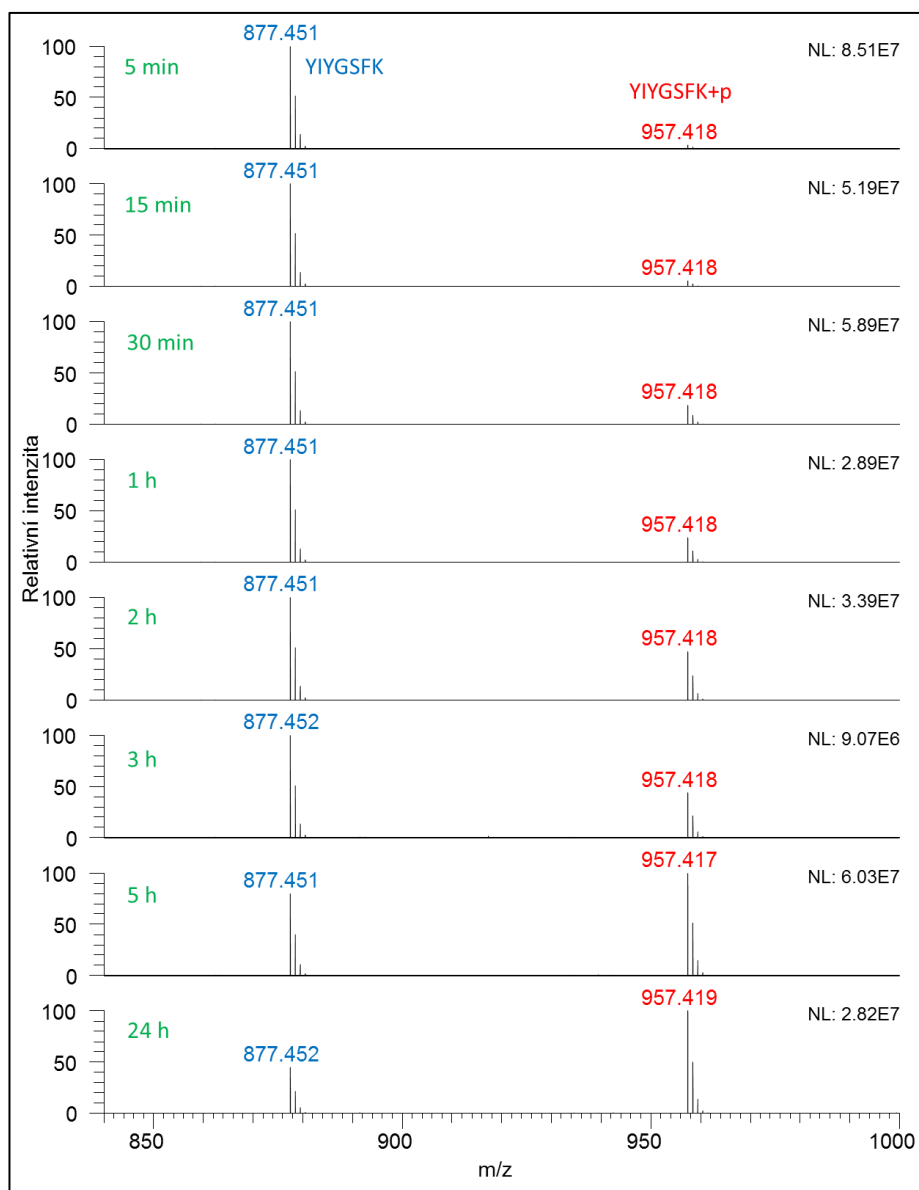
Imobilizace enzymů je velice studovanou oblastí, a to především díky výhodám, které imobilizované enzymy poskytují oproti solubilním formám. Hlavními výhodami je možnost jejich opakovaného použití, vyšší stabilita, snadná separace z reakční směsi a tím i vyšší čistota výsledného produktu reakce a značné snížení ekonomických nákladů.

Pro ověření aktivity solubilních i imobilizovaných enzymů a optimalizaci reakčních podmínek je možno využít nízkomolekulární peptidové substráty. Pro účely stanovení míry fosforylace Src kinázou (ASV, c-Src, p60-Src) byl použit peptidový substrát o molekulové hmotnosti 877,3 Da a aminokyselinové sekvenci H-Tyr-Ile-Tyr-Gly-Ser-Phe-Lys-OH. Metoda fosforylace peptidového substrátu Src kinázou vychází z principu uvedeného v [197]. Stanovení míry fosforylace bylo založeno na reakci peptidového substrátu s ATP za katalýzy Src kinázou v přítomnosti  $Mg^{2+}$ , při pH 7,2. Výsledným produktem reakce je fosforylovaný peptidový substrát a ADP. Míra fosforylace peptidového substrátu byla hodnocena pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie na základě poměru relativních intenzit píků odpovídajících fosforylované formě peptidového substrátu a celkové intenzity signálu, která byla dána součtem relativních intenzit píků odpovídajících fosforylované a nefosforylované formě peptidového substrátu [198].

#### 4.1.1 Optimalizace podmínek fosforylace peptidového substrátu Src kinázou

Cílem experimentu bylo ověřit podmínky metody fosforylace a její detekce se zvyšující se koncentrací solubilní Src kinázy vstupující do reakce. Metoda byla provedena dle kapitoly 3.3.1. Reakční směsi byly tvořeny reakčním pufrům, peptidovým substrátem, ATP a Src kinázou v různých koncentracích (0,3  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g a 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l) v celkovém reakčním objemu 100  $\mu$ l. V časech 5 minut, 15 minut, 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny, 5 hodin a 24 hodin byly odebírány frakce obsahující 1  $\mu$ g fosforylovaného peptidového substrátu.

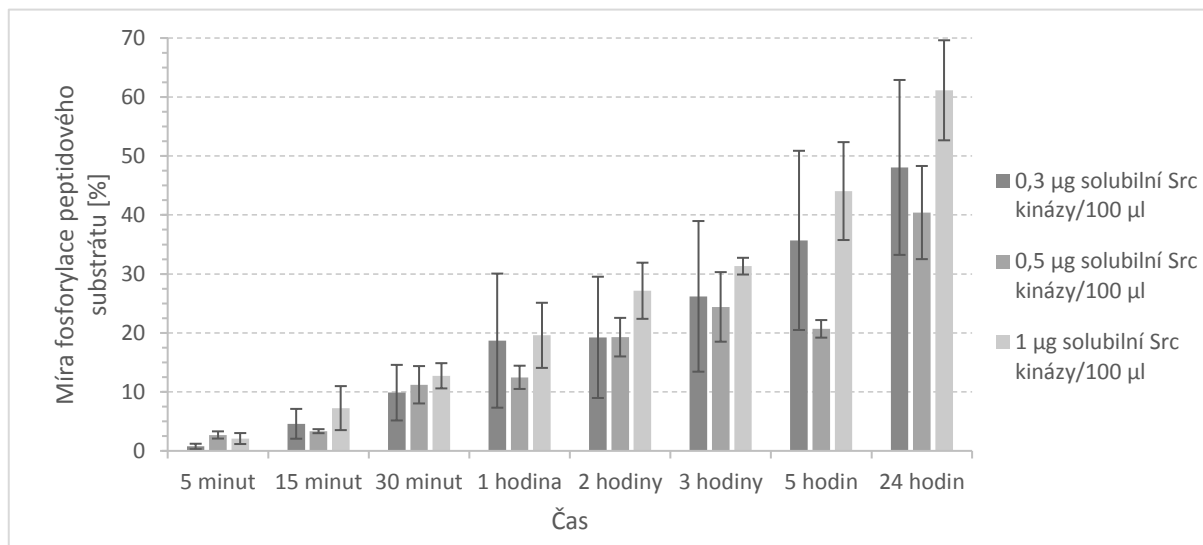
Frakce peptidů byly následně odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.10.3 a analyzovány MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrií (Obr. 13).



**Obr. 13** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro c-Src fosforylovaného solubilní Src kinázou v koncentraci 1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , matrice DHB; jsou uvedena hmotnostní spektra z druhého opakování experimentu.

Z jednotlivých MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter (Obr. 13) je patrné, že s narůstajícím časem klesá intenzita nefosforylovaného peptidového substrátu ( $m/z$  877,4), zatímco intenzita fosforylovaného peptidového substrátu ( $m/z$  957,4) se s narůstajícím časem zvyšuje. Z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity pík odpovídající fosforylované a nefosforylované formě peptidového substrátu a míra fosforylace substrátu byla vyhodnocena dle kapitoly 3.10.5. Na základě získaných průměrných hodnot míry

fosforylace byl sestaven graf závislosti procentuální míry fosforylace peptidového substrátu solubilní Src kinázou ve třech různých koncentracích na čase (Graf 1).



**Graf 1** Závislost míry fosforylace peptidového substrátu na čase pro 0,3; 0,5 a 1 µg solubilní Src kinázy/100 µl; průměrné hodnoty míry fosforylace peptidového substrátu ze tří opakování a příslušné směrodatné odchylky.

Z grafu 1 je patrné, že procentuální míra fosforylace peptidového substrátu má v závislosti na množství solubilní Src kinázy vstupující do reakce s jednotným množstvím substrátu a ATP stoupající tendenci. Nejvyšší procentuální míry fosforylace peptidového substrátu bylo dosaženo při použití Src kinázy v koncentraci 1 µg/100 µl. Po 24 hodinách bylo fosforylováno 61,14 % peptidového substrátu. Dále je z grafu zřejmé, že k nejvyššímu nárůstu fosforylace dochází v prvních pěti hodinách reakce. Z naměřených hodnot tedy vyplývá, že pro dosažení nejvyšší míry fosforylace je z výše uvedených koncentrací vhodná koncentrace solubilní Src kinázy 1 µg/100 µl.

#### 4.1.2 Fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič

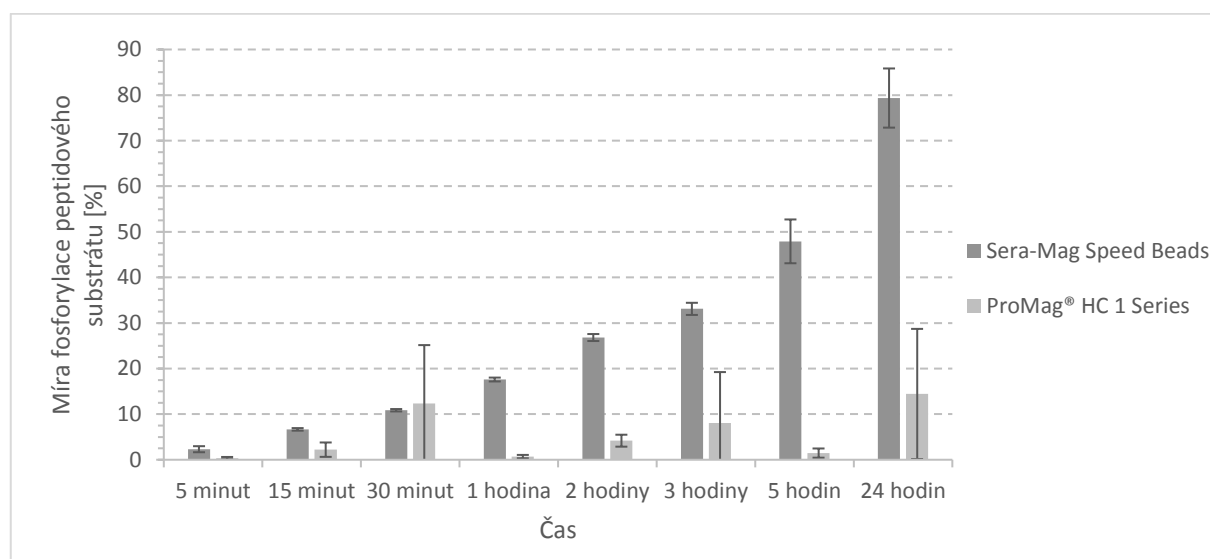
Cílem experimentu bylo připravit magnetický nosič s imobilizovanou Src kinázou a ověřit aktivitu připraveného nosiče prostřednictvím fosforylace peptidového substrátu. Pro imobilizaci Src kinázy byly použity dva typy magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou, a to magnetické částice Sera-Mag Speed Beads s průměrem 0,816 µm a magnetické částice ProMag® HC 1 Series s průměrem 0,87 µm. V obou případech se jedná o částice s rychlou magnetickou odezvou, modifikací povrchu proti nespecifické vazbě a vysokou vazebnou kapacitou deklarovanou výrobcí. Pro imobilizaci 0,5 µg Src kinázy na 0,1 mg magnetických částic dle kapitoly 3.2 byla použita kovalentní metoda imobilizace, principem



kteře je interakce aminových skupin enzymu s karboxylovými skupinami nosiče v přítomnosti N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDAC) a N-hydroxysulfosukcinimidu sodného (Sulfo-NHS) za vzniku amidov vazby.

Ověření úspěšnosti imobilizace a aktivity imobilizovan Src kinázy bylo provedeno stanovením míry fosforylace peptidového substrátu dle kapitoly 3.3.2. Reakční směs byla tvořena 0,5 µg Src kinázy imobilizovan na 0,1 mg magnetických částic, reakčním puřrem, peptidovm substrátem a ATP v celkovém reakčním objemu 100 µl. Nsledn bylo postupováno stejnm způsobem jako v případech fosforylace peptidového substrátu solubilní Src kinázou (kapitola 4.1.1) (MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra neuvedena).

Na základě získaných přímrnch hodnot míry fosforylace byl sestaven graf závislosti procentuální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetick částice na čase (Graf 2).



**Graf 2** Závislost míry fosforylace peptidového substrátu na čase pro Src kinázu imobilizovanou na magnetick částice Sera-Mag Speed Beads a ProMag® HC 1 Series; přímrn hodnoty míry fosforylace peptidového substrátu ze tří opakování a příslušn smrodatn odchylky.

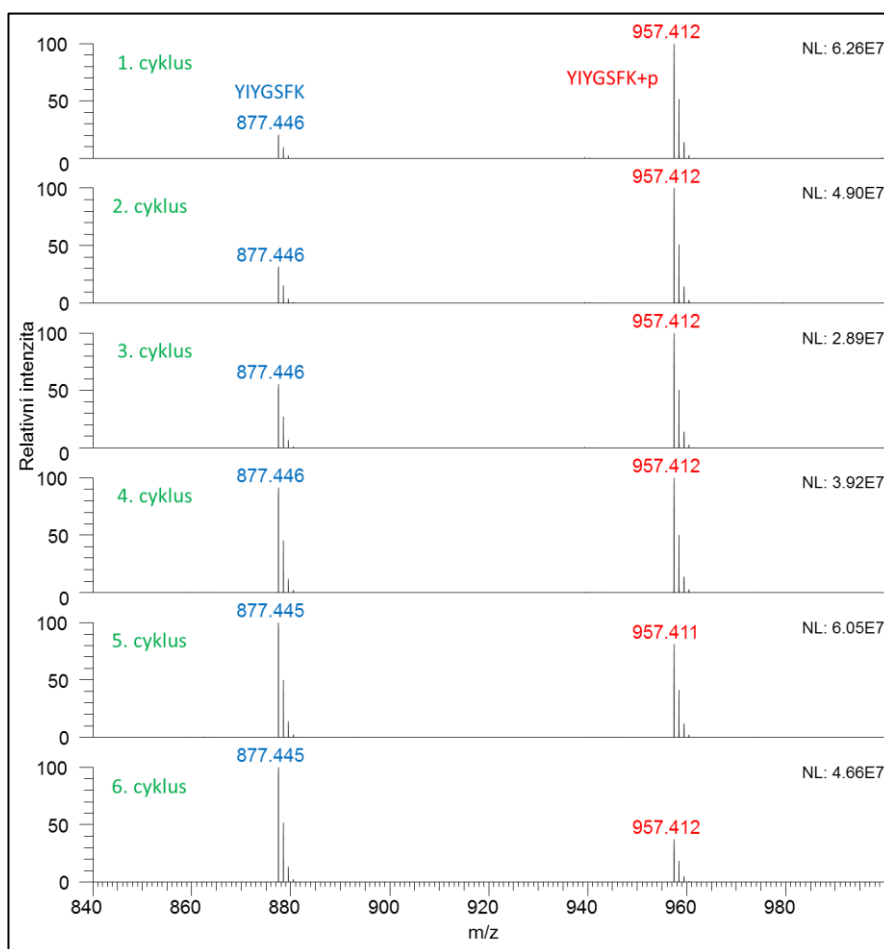
Z grafu 2 je zřejm, že v případech imobilizace Src kinázy na magnetick částice Sera-Mag Speed Beads měla míra fosforylace peptidového substrátu s narůstajícím časem vzestupn charakter. Po 24 hodinách byl v tomto případech peptidov substrát fosforylován ze 79,35 %. Ve srovnání s hodnotami míry fosforylace peptidového substrátu solubilní Src kinázou bylo v případech imobilizovan Src kinázy dosaženo vyšších hodnot. Z uvedených dat tedy vyplývá, že imobilizace Src kinázy na magnetick částice Sera-Mag vede k významnému zvyšn aktivity Src kinázy. Dále je z grafu zřejm, že v případech imobilizace Src kinázy na magnetick částice ProMag® HC 1 Series nebylo s narůstajícím časem dosaženo vzestupného

charakteru hodnot procentuální míry fosforylace peptidového substrátu. Z tohoto důvodu byly částice ProMag® HC 1 Series vyhodnoceny jako nevhodné pro imobilizaci Src kinázy.

#### 4.1.3 Stanovení operační stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič

U imobilizovaných enzymů se pro zjištění možnosti jejich opakovaného použití stanovuje takzvaná operační stabilita. Jedná se o metodu, při které se hodnotí změny aktivity imobilizovaného enzymu při jeho opakovaném použití v několika po sobě jdoucích cyklech.

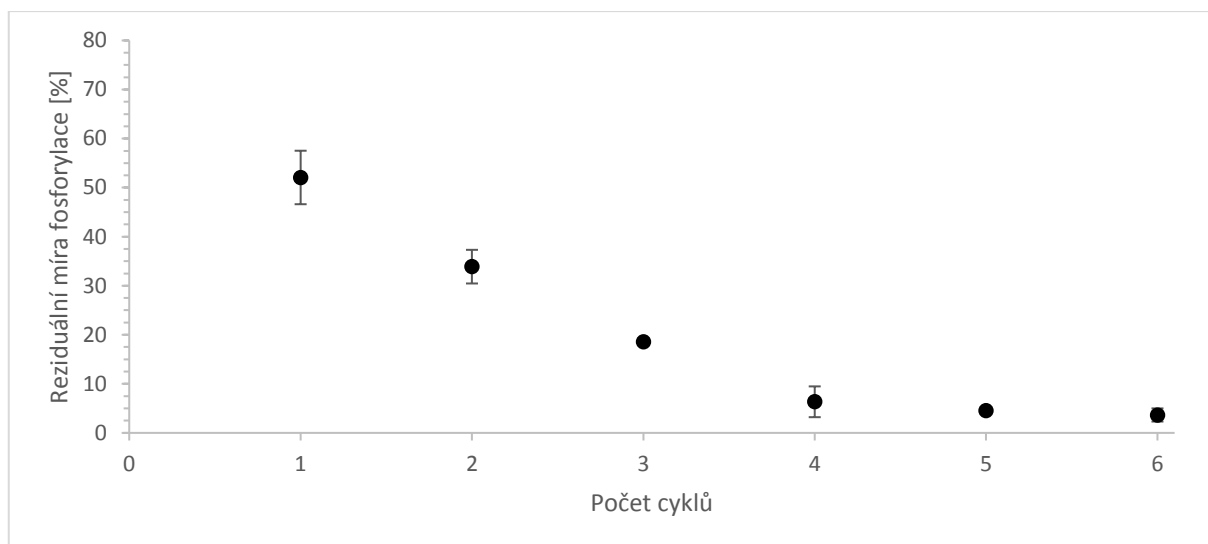
Cílem experimentu bylo sledovat operační stabilitu Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads dle kapitoly 3.3.3. Reakční směs byla tvořena 0,5  $\mu\text{g}$  Src kinázy imobilizované na 0,1 mg magnetických částic, reakčním pufrem, peptidovým substrátem a ATP v celkovém reakčním objemu 100  $\mu\text{l}$ . V šesti po sobě jdoucích cyklech, vždy po 24 hodinách byly odebrány frakce obsahující 1  $\mu\text{g}$  fosforylovaného peptidového substrátu. Frakce peptidů byly následně odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.10.3 a analyzovány MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrií (Obr. 14).



**Obr. 14** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu pro c-Src fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads, operační stabilita, matrice DHB; jsou uvedena hmotnostní spektra z druhého opakování experimentu.

Z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter (Obr. 14) byly odečteny relativní intenzity píků odpovídající fosforylované a nefosforylované formě peptidového substrátu. Získaná data byla vyhodnocena dle kapitoly 3.10.5.

Na základě získaných průměrných hodnot míry fosforylace byl sestaven graf závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu cyklů (Graf 3).



**Graf 3** Operační stabilita Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads znázorněna prostřednictvím závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu cyklů; průměrné hodnoty míry fosforylace peptidového substrátu ze dvou opakování a příslušné směrodatné odchylky.

Z grafu 3 je patrné, že při opakovaném používání značně klesá aktivita nosiče. Po šesti po sobě jdoucích opakováních došlo ke snížení reziduální míry fosforylace peptidového substrátu z původních 52,07 % na pouhých 3,65 %. V průběhu opakovaného používání došlo k poklesu aktivity o 92,99 %, z čehož vyplývá, že takto připravený nosič s imobilizovanou Src kinázou není vhodný pro opakovaná použití.

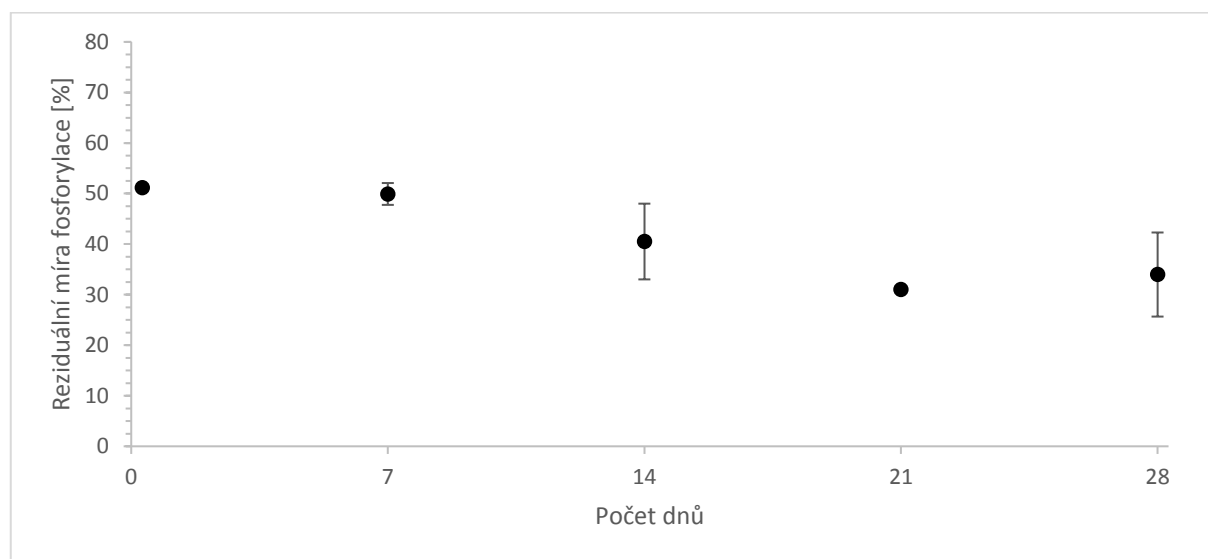
#### 4.1.4 Stanovení skladovací stability Src kinázy imobilizované na magnetický nosič

U imobilizovaných enzymů se stanovuje také takzvaná skladovací stabilita. Jedná se o metodu, při které se hodnotí změny aktivity nosiče při jeho použití v delších časových intervalech, přičemž v průběhu skladování je imobilizovaný enzym uchováván za vhodných podmínek.

Cílem experimentu bylo sledovat skladovací stabilitu Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads dle kapitoly 3.3.4. Reakční směs byla tvořena 0,5  $\mu$ g

Src kinázy imobilizované na 0,1 mg magnetických částic, reakčním pufrém, peptidovým substrátem a ATP v celkovém reakčním objemu 100  $\mu$ l. Po dobu pěti týdnů, vždy v týdenním intervalu, byly po 24 hodinách odebrány frakce obsahující 1  $\mu$ g fosforylovaného peptidového substrátu. Následně bylo postupováno stejným způsobem jako v případě stanovení operační stability (kapitola 4.1.3) (MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra neuvedena).

Ze získaných průměrných hodnot míry fosforylace peptidového substrátu byl sestaven graf závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu dnů (Graf 4).



**Graf 4** Skladovací stabilita Src kinázy imobilizované na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads znázorněna prostřednictvím závislosti reziduální míry fosforylace peptidového substrátu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice na počtu dnů; průměrné hodnoty míry fosforylace peptidového substrátu ze dvou opakování a příslušné směrodatné odchylky.

Z grafu 4 je zřejmé, že v průběhu skladování dochází k postupnému snižování aktivity nosiče. V den imobilizace Src kinázy na magnetické částice dosahovala míra fosforylace peptidového substrátu 51,18 %. V průběhu skladování částic po dobu čtyř týdnů došlo ke snížení reziduální míry fosforylace peptidového substrátu na 33,98 %. V průběhu skladování v 40 mM HEPES pufr, pH 7,2 při teplotě 4 °C tedy došlo ke snížení aktivity imobilizované Src kinázy o 33,61 %.

## 4.2 Fosforylace proteinů Src kinázou a jejich detekce

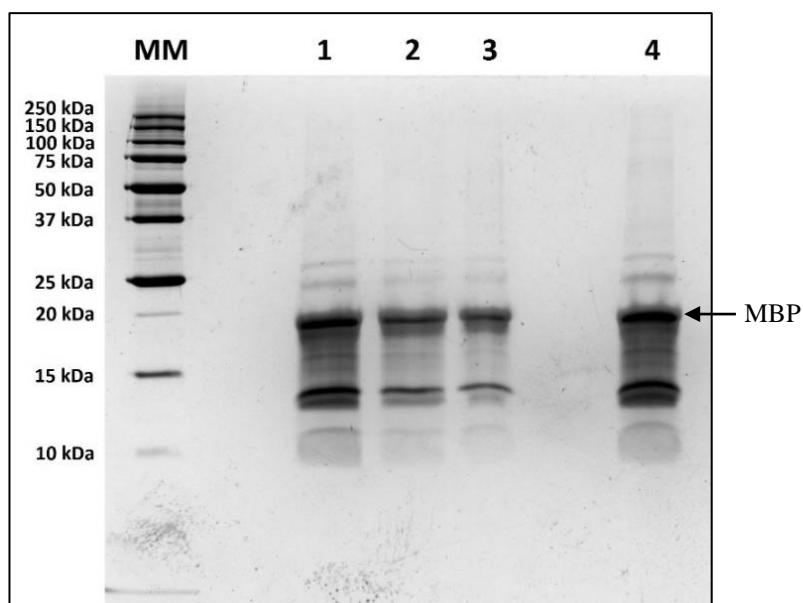
Fosforylace proteinů se přirozeně vyskytují na aminokyselinách serinu, threoninu a tyrosinu. Fosforylace serinu představují přibližně 90 % veškerých fosforylací, dalších 10 % připadá na fosforylace threoninu a pouhých 0,05 % veškerých fosforylací připadá na fosforylace tyrosinu. Stavby velice často spojené s hyperfosforylací proteinů mohou být jednou z příčin rozvoje neurodegenerativních onemocnění.

Pro fosforylaci tyrosinu Src kinázou byly vybrány dva modelové proteiny, a to hovězí myelinový bazický protein (MBP) a rekombinantní protein Tau-441 s DNA sekvencí kódující lidskou izoformu 2N4R. V obou případech se jedná o proteiny, které jsou velice často zmiňovány v souvislosti s neurodegenerativními chorobami. U modelových proteinů byla nejdříve analyzována jejich čistota a u MBP byla sledována přítomnost přirozených fosforylací. Poté byly proteiny fosforylovány solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads. Úspěšnost *in vitro* fosforylace obou proteinů byla sledována detekční metodou využívající dendrimer pIMAGO, metodou Western blot s následnou imunodetekcí a pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

### 4.2.1 Ověření přirozené fosforylace myelinového bazického proteinu

Cílem experimentu bylo ověřit čistotu hovězího MBP a analyzovat přítomnost přirozeně se vyskytujících fosforylací. Tyto fosforylace se mohou vyskytovat na aminokyselinách serinu, threoninu a tyrosinu.

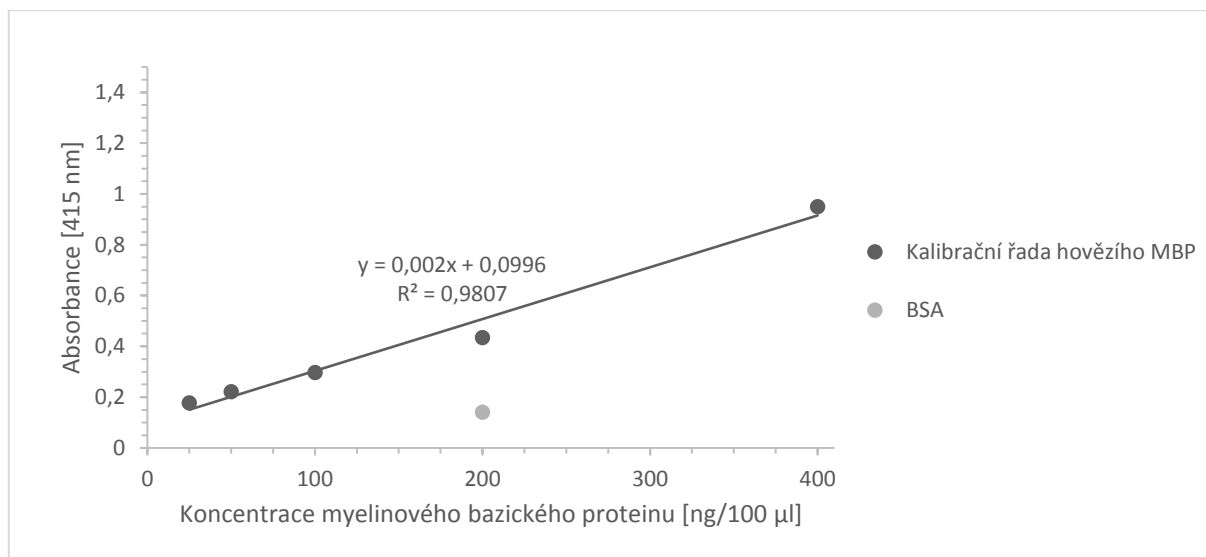
Čistota hovězího MBP byla ověřena metodou SDS-PAGE dle kapitoly 3.8 (Obr. 15). V separačních drahách 1 – 3 byl separován MBP v různých koncentracích. Z důvodu nutnosti zakoncentrování některých vzorků fosforylovaného MBP po fosforylaci byl v separační dráze 4 analyzován MBP, který byl před separací zakoncentrován (45 °C, 1400 rpm). Detekované proužky MBP odpovídají teoretické molekulové hmotnosti 18,4 kDa. Ze všech separačních drah je patrné, že MBP je zčásti fragmentován a tvoří oligomerní struktury. Dále je ze separační dráhy 4 zřejmé, že zakoncentrování MBP před elektroforetickou separací nemá na kvalitu MBP zásadní vliv.



**Obr. 15** SDS-PAGE analýza hovězího MBP. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Unstained Protein Standards, **1** – 2 µg MBP, **2** – 1 µg MBP, **3** – 0,5 µg MBP, **4** – 2 µg MBP zakoncentrován (45°C, 1400 rpm). 16,5% gel barven roztokem amoniakálního stříbra.

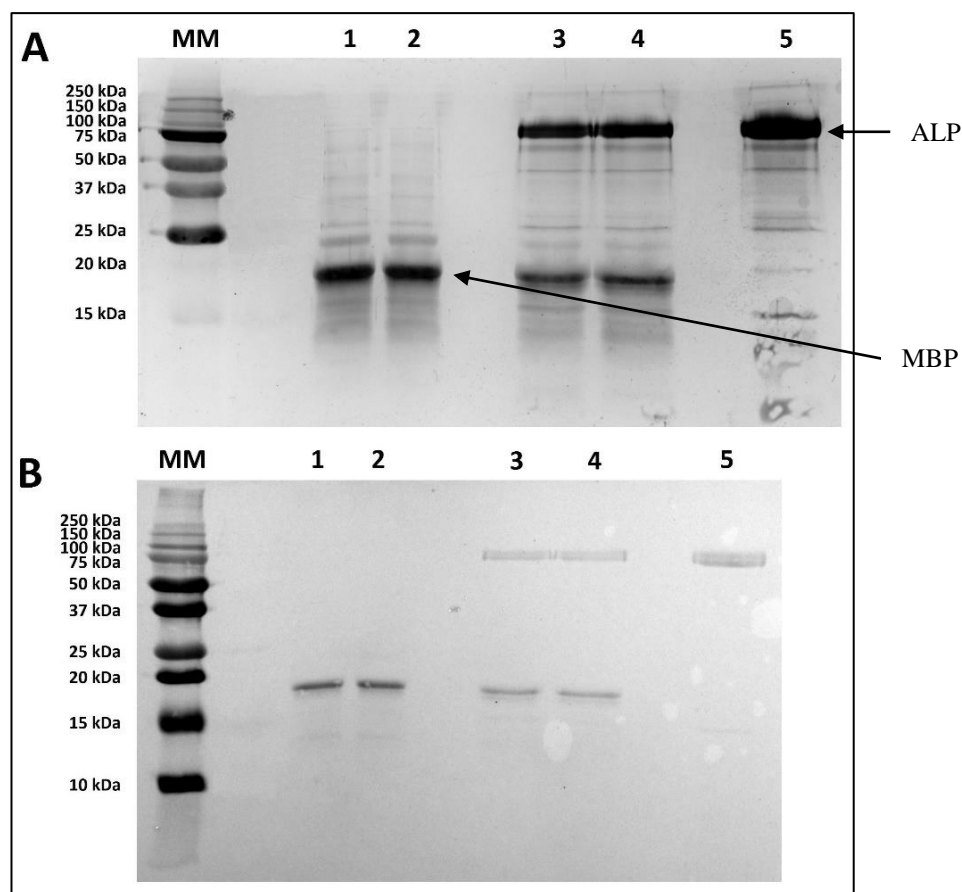
Detekce fosforylací proteinu byla provedena pomocí dendrimera pIMAGO-biotin. Tato metoda je založena na interakcích náboj-náboj, které vznikají mezi reaktivními skupinami  $Ti^{4+}$  iontů na povrchu dendrimera pIMAGO a fosfátovými skupinami fosfoproteinu. Povrch dendrimera pIMAGO je funkcionalizován také molekulami biotinu, které specificky interagují s konjugátem enzymu s avidinem, a právě vznik komplexu avidin-biotin umožňuje průkaz přítomnosti fosforylace.

Experiment byl proveden pomocí kitu pIMAGO v mikrotitrační destičce dle kapitoly 3.7. Na destičku byl MBP dávkován v koncentračním rozmezí 25 – 400 ng/100 µl a absorbance byla měřena při 415 nm proti slepému vzorku. Z průměrných hodnot naměřené absorbance ze tří opakování byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci MBP (Graf 5). Ze závislosti je patrná linearita v použitém rozsahu koncentrací. Pro srovnání byl v testu zařazen hovězí sérový albumin (BSA), jako negativní kontrola bez přirozené fosforylace. Z grafického zobrazení je možno předpokládat, že MBP je přirozeně fosforylován.



**Graf 5** Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, kalibrační řada MBP; průměrné hodnoty ze tří opakování.

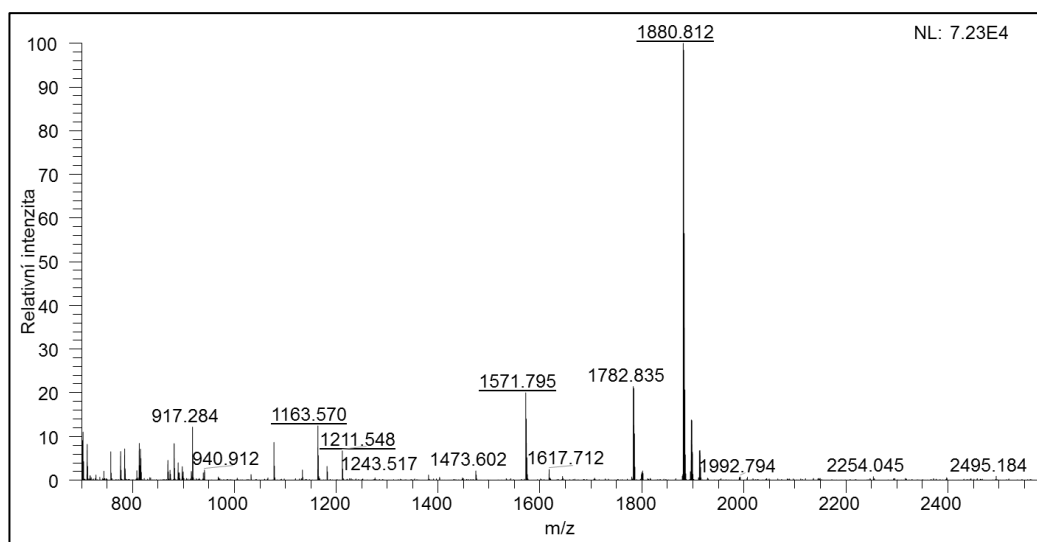
Hovězí MBP ve své aminokyselinové sekvenci obsahuje celkem čtyři tyrosiny, které mohou být fosforylovány Src kinázou, a to Tyr12, Tyr67, Tyr126 a Tyr133. U MBP byla provedena detekce přítomnosti přirozeně se vyskytující fosforylace tyrosinu pomocí anti-pTyr protilátek metodou Western blot. K tomuto účelu byla provedena separace MBP metodou SDS-PAGE dle kapitoly 3.8 s následným imunoblotem (Obr. 16). Do separačních drah 1 a 2 byl aplikován vzorek MBP v navážkách 2 µg a 1 µg a do separačních drah 3 a 4 byly aplikovány vzorky defosforylovaného MBP, které byly připraveny dle kapitoly 3.5. Po elektroforetické separaci byl proveden westernový přenos proteinů na membránu dle kapitoly 3.9.1 a membrána byla obarvena roztokem Ponceau S dle kapitoly 3.9.2. Po přenosu byl gel za účelem zviditelnění separovaných proteinů obarven roztokem amoniakálního stříbra dle kapitoly 3.8.2. Imunodetekce přítomnosti fosforylace tyrosinu na membráně byla provedena dle kapitoly 3.9.3 pomocí monoklonálních myších anti-pTyr protilátek a konjugátu polyklonálního kozího anti-myšího IgG s křenovou peroxidázou. Po provedení chemiluminiscenční detekce proteinů v membráně nebyly detekovány proteiny s fosforylací na tyrosinu (obrázek neuveden). V analýze nebyla použita pozitivní kontrola (protein s fosforylací na tyrosinu), nelze tedy s jistotou potvrdit, že se v molekule MBP nevyskytuje přirozená fosforylace tyrosinu.



**Obr. 16** Detekce přirozeně se vyskytující fosforylace tyrosinu u hovězího MBP. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotnosti Dual Color Protein Standards, **1** – 2 µg MBP, **2** – 1 µg MBP, **3, 4** – 2 µg MBP defosforylovaný alkalickou fosfatázou (ALP), **5** – 10 µg ALP. (A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 16,5% gel po přenosu barven roztokem amoniakálního stříbra, (B) NC membrána, barveno Ponceau S.

Přirozená fosforylace MBP na aminokyselinách serinu, threoninu a tyrosinu byla analyzována také citlivou metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie podle [159]. MBP byl naštěpen solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci dle kapitoly 3.10.1. Fosfopeptidy byly následně obohaceny na nosiči Titansphere™ TiO Bulk Material dle kapitoly 3.10.2. Vzorek byl poté odsolen na reverzní fázi dle kapitoly 3.10.3 a analyzován metodou hmotnostní spektrometrie. Data byla vyhodnocena dle kapitoly 3.10.5. Na Obr. 17 je znázorněno MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum analyzovaného MBP. Přítomnost přirozeně se vyskytujících fosforylací byla z MALDI-Orbitrap hmotnostního spektra potvrzena detekcí několika fosfopeptidů uvedených v Tab. 2.





**Obr. 17** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum hovězího MBP, matrice DHB; podtržené jsou zvýrazněny detekované fosfopeptidy.

**Tab. 2** Vyhodnocení přirozeně se vyskytujících fosforylací hovězího MBP lokalizovaných na serinu (S), threoninu (T) nebo tyrosinu (Y) metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba $\Delta$ ppm	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
881,264	881,262	1,32	2Fosfo	162	168	0	(R)SGSPMAR(R)
891,399	891,397	2,01	1Fosfo	97	104	0	(R)TPPPSQGK(G)
1163,570	1163,568	1,17	1Fosfo	1	9	1	(-)AAQKRPSQR(S)
1211,548	1211,546	1,50	1Fosfo	64	73	0	(R)TTHYGSLPQK(A)
1571,795	1571,794	0,77	1Fosfo	91	104	1	(K)NIVTPRTPPPSQGK(G)
1880,812	1880,812	0,44	1Fosfo	113	129	0	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)

Z výsledků MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie bylo zřejmé, že analyzované fosfopeptidy byly v průběhu analýzy dále fragmentovány ve zdroji hmotnostního spektrometru, kdy docházelo ke ztrátě fosfátové skupiny z detekovaných fosfopeptidů, což je jev běžně se vyskytující při analýze fosfopeptidů s fosforylací na serinu nebo threoninu. Přítomnost této fragmentace však není typická pro fosfopeptidy, u nichž je fosforylace lokalizována na tyrosinu. Navíc pouze ve dvou identifikovaných fosfopeptidech byl v sekvenci přítomen tyrosin. Tento poznatek tedy potvrzuje výsledky analýzy metodou Western blot s anti-pTyr protilátkami, kdy nebyla u MBP prokázána přítomnost fosforylace lokalizované na tyrosinu.

#### 4.2.2 Fosforylace myelinového bazického proteinu solubilní Src kinázou

Cílem experimentu bylo fosforylovat hovězí MBP solubilní Src kinázou a tuto fosforylaci detekovat metodami zavedenými v předchozích částech práce. Fosforylace MBP byla provedena za účelem optimalizace reakčních a detekčních podmínek celkem ve třech různých modifikacích.

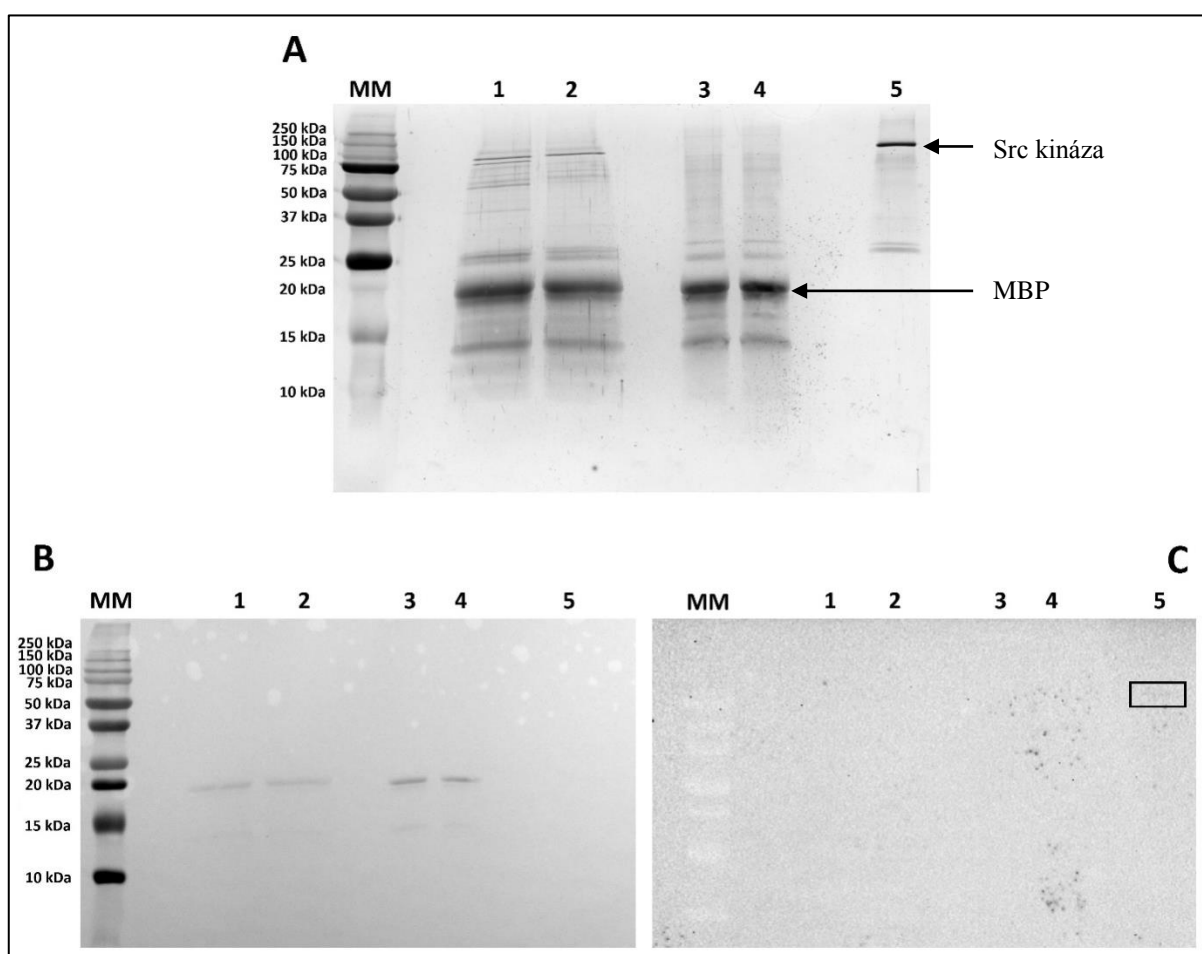
V případě první modifikace experimentu bylo fosforylováno 5  $\mu\text{g}$  MBP 1  $\mu\text{g}$  solubilní Src kinázy v přítomnosti 1 mM ATP v celkovém reakčním objemu 50  $\mu\text{l}$ . Reakční směs byla po fosforylaci rozdělena na alikvoty pro analýzu metodou Western blot s následnou imunodetekcí, metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie a pomocí kitu pIMAGO. Všechny alikvoty byly za účelem zastavení Src kinázové aktivity okyseleny přidavkem 5% TFA na hodnotu pH 3 – 4. V případě druhé modifikace experimentu bylo zvýšeno množství MBP pro fosforylaci (10  $\mu\text{g}$ ) 1  $\mu\text{g}$  solubilní Src kinázy v přítomnosti 1 mM ATP v celkovém reakčním objemu 50  $\mu\text{l}$ . Po fosforylaci byla pro zastavení Src kinázové aktivity celá reakční směs okyselená přidavkem 5% TFA na hodnotu pH 3 – 4. Po okyselení byl do reakční směsi přidán 20% acetonitril, za účelem uvolnění sorbovaných proteinů z povrchu reakční zkumavky. Následně byla reakční směs rozdělena na alikvoty pro výše zmíněné analýzy. V případě třetí modifikace experimentu bylo fosforylováno 10  $\mu\text{g}$  MBP 1  $\mu\text{g}$  solubilní Src kinázy v přítomnosti 1 mM ATP ve zvýšeném reakčním objemu 100  $\mu\text{l}$  dle kapitoly 3.4.1.

Vzorky fosforylovaného MBP určené k analýze metodou Western blot s následnou imunodetekcí byly analyzovány dle kapitoly 3.9. Jako pozitivní kontrola byla ve všech případech použita aktivní forma solubilní Src kinázy, která je přirozeně fosforylována na Tyr419.

V případě první modifikace experimentu bylo z SDS-PAGE analýzy (obrázek neuveden) zřejmé, že v průběhu inkubace dochází k poměrně velkým ztrátám jak MBP, tak Src kinázy, pravděpodobně v důsledku sorpce proteinů na plastový povrch zkumavky. Z tohoto důvodu byla v druhém experimentu navýšena koncentrace MBP vstupující do reakce, a navíc byl k reakční směsi po fosforylaci přidán 20% acetonitril, který měl uvolnit proteiny sorbované na povrch reakční zkumavky a tím snížit možné ztráty proteinů. Z SDS-PAGE analýzy vzorku druhé modifikace experimentu (obrázek neuveden) bylo zřejmé, že po přidavku acetonitrilu nedošlo ke zlepšení uvolnění proteinů po fosforylaci.

V případě třetí modifikace experimentu nebyl vzorek pro analýzu metodou Western blot okyselen 5% TFA a byl k němu přidán pouze 4 $\times$  Laemmli Sample Buffer s přidavkem

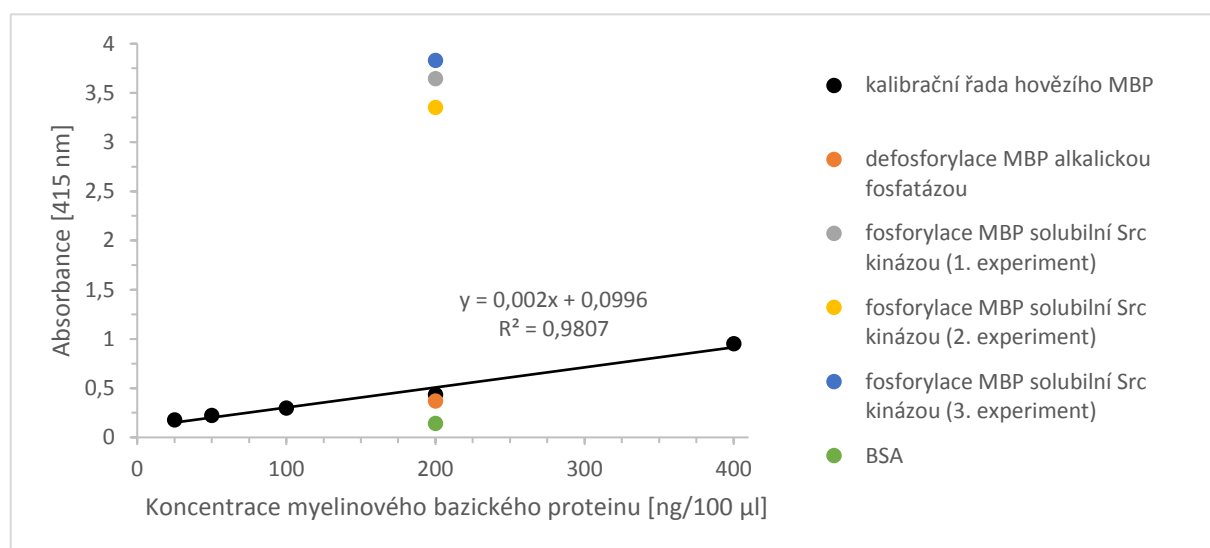
2-merkptoethanolu. Ze separačních drah 1 a 2 na Obr. 18A je patrné, že protein je již detekován a problém s jeho ztrátou byl vyřešen. Z Obr. 18A (dráha 1 a 2) je patrný mírný nárůst molekulové hmotnosti fosforylovaného MBP ve srovnání s MBP bez úpravy (dráha 3 a 4), který by mohl poukazovat na úspěšnou fosforylaci. Po obarvení membrány roztokem Ponceau S po přenosu (Obr. 18B) je v tomto případě zřetelně detekována přítomnost jak MBP bez úpravy (dráha 3 a 4), tak také MBP fosforylovaného solubilní Src kinázou (dráha 1 a 2). Po provedení imunodetekce přítomnosti fosforylace tyrosinu u MBP (Obr. 18C) nebyla detekována fosforylace na tyrosinu. Pozitivní výsledek byl detekován pouze v případě pozitivní kontroly (dráha 5, černý rámeček).



**Obr. 18** Detekce úspěšnosti fosforylace hovězího MBP solubilní Src kinázou, 3. modifikace experimentu. Separací dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Dual Color Protein Standards, **1, 2** – 2 µg MBP fosforylovaný 0,2 µg solubilní Src, **3, 4** – 1 µg MBP, **5** – 0,4 µg Src kinázy. (A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 16,5% gel po přenosu barven roztokem amoniakálního stříbra, (B) NC membrána, barveno Ponceau S, (C) NC membrána, značeno anti-pTyr.

MBP (200 ng) po fosforylaci solubilní Src kinázou a všemi modifikacemi byl analyzován kitem pIMAGO dle kapitoly 3.7. Jako slepé vzorky byly použity reakční směsi bez MBP a jako negativní kontrola byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Hodnoty absorbancí

byly vyneseny do grafu současně s kalibrační křivkou MBP a také hodnotou absorbance MBP po defosforylaci alkalickou fosfatázou dle kapitoly 3.5 (Graf 6). V případě vzorků ze všech modifikací experimentu fosforylace MBP solubilní Src kinázou došlo k nárůstu absorbancí na velmi vysoké hodnoty. U první modifikace experimentu dosáhla absorbance hodnoty 3,64, v případě druhé modifikace experimentu došlo k mírnému snížení absorbance na hodnotu 3,35, zatímco v případě třetí modifikace experimentu bylo dosaženo nejvyšší hodnoty absorbance, a to 3,83. Získaná data tedy prokazují úspěšnost fosforylace MBP solubilní Src kinázou v případě všech tří provedených modifikací experimentů. Z Grafu 6 je také zřejmé, že u vzorku defosforylovaného MBP došlo k poklesu absorbance na hodnotu 0,37, který ukazuje na úbytek fosforylací proteinu.

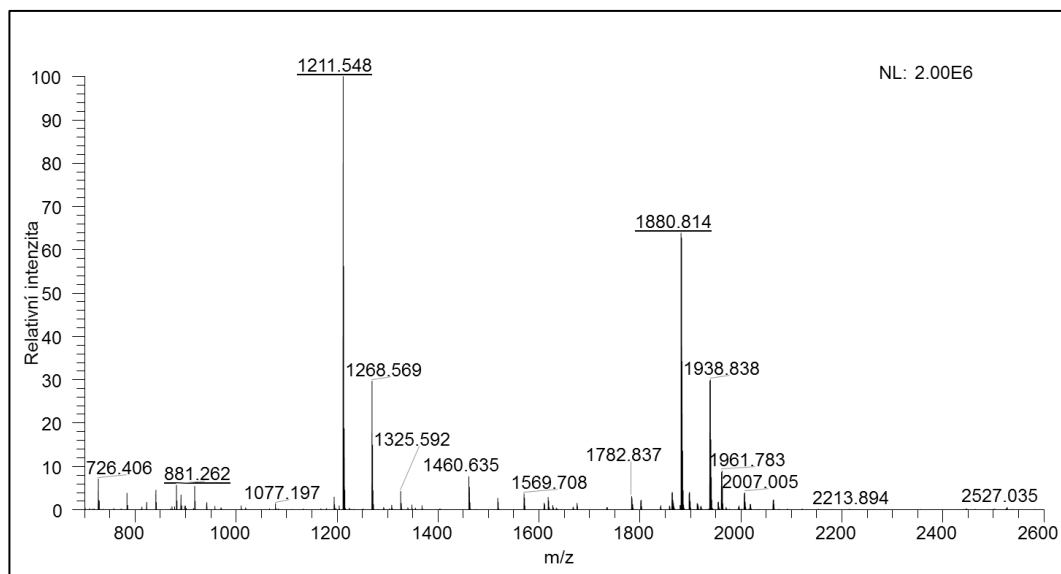


**Graf 6** Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace MBP solubilní Src kinázou; pro kalibrační křivku jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří opakování, pro fosforylací MBP solubilní Src kinázou a defosforylací MBP alkalickou fosfatázou je uvedena hodnota z jednoho opakování.

Vzorky všech modifikací experimentů fosforylace MBP solubilní Src kinázou pro analýzu metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie byly nejprve naštěpeny solubilním modifikovaným trypsinem pro sekvenaci dle kapitoly 3.10.1. Fosfopeptidy byly následně obohaceny na 0,25 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material dle kapitoly 3.10.2, odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.10.3 a analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie.

V případě první a druhé modifikace experimentu nebyly v MALDI-Orbitrap hmotnostních spektrech patrné žádné peptidy (MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra neuvedena). Negativní výsledek byl v tomto případě s největší pravděpodobností důsledkem velké ztráty proteinu v průběhu reakce, která byla potvrzena SDS-PAGE analýzami.

MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum vzorku ze třetí modifikace experimentu uvedené na Obr. 19 ukazuje na úspěšnou detekci fosfopeptidů.



**Obr. 19** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum hovězího MBP fosforylovaného solubilní Src kinázou, matrice DHB; podtržené jsou zvýrazněny detekované fosfopeptidy.

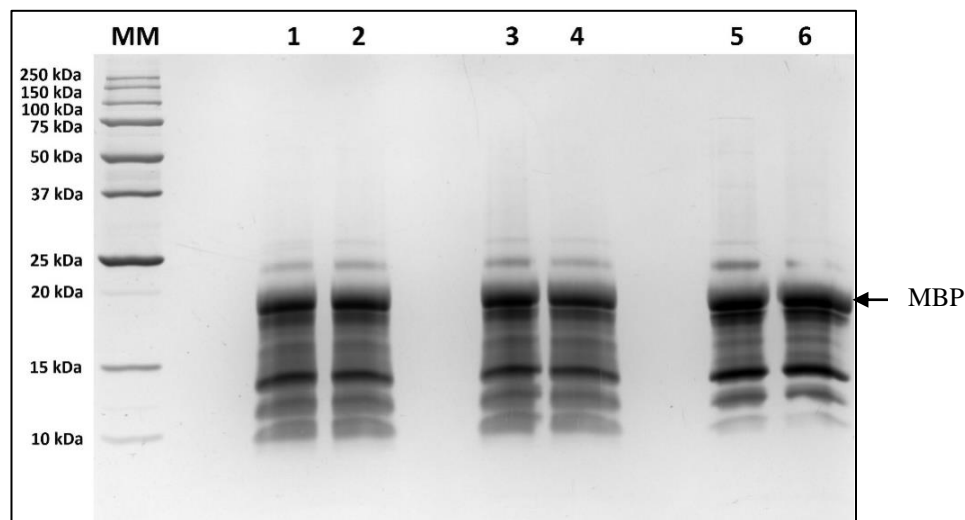
V tomto případě došlo k úspěšné detekci několika fosfopeptidů, které jsou uvedeny v Tab. 3. V porovnání s analýzou hmotnostní spektrometrie MBP (kapitola 4.2.1, Tab. 2) došlo k navýšení množství detekovaných fosforylací u fosfopeptidů, které ve své aminokyselinové sekvenci obsahují tyrosin. Porovnání těchto dvou analýz vedlo k závěru, že v případě fosforylace MBP solubilní Src kinázou došlo k fosforylaci dvou fosforylačních míst, a to Tyr67 a Tyr126.

**Tab. 3** Vyhodnocení fosforylace tyrosinu (Y) hovězího MBP solubilní Src kinázou pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba Δppm	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
881,262	881,262	-0,04	2Fosfo	162	168	0	(R)SGSPMAR(R)
1211,548	1211,546	1,55	1Fosfo	64	73	0	(R)TTHYGSLPQK(A)
<b>1291,514</b>	<b>1291,512</b>	<b>1,34</b>	<b>2Fosfo</b>	<b>64</b>	<b>73</b>	<b>0</b>	<b>(R)TTHYGSLPQK(A)</b>
1617,711	1617,709	0,86	1Fosfo	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1633,704	1633,704	0,19	1Fosfo	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1880,814	1880,812	1,09	1Fosfo	113	129	0	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)
<b>1960,779</b>	<b>1960,778</b>	<b>0,72</b>	<b>2Fosfo</b>	<b>113</b>	<b>129</b>	<b>0</b>	<b>(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)</b>
2525,039	2525,032	2,60	2Fosfo	113	134	1	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGRASDYK(S)

Z důvodu zvýšené ztráty MBP a Src kinázy v jednotlivých reakčních směsích, byla dále prověřena skutečnost, zda tyto ztráty nejsou způsobeny degradací proteinů v důsledku zastavení fosforylační reakce přidávkem 5% TFA. Pro účely ověření této skutečnosti byly

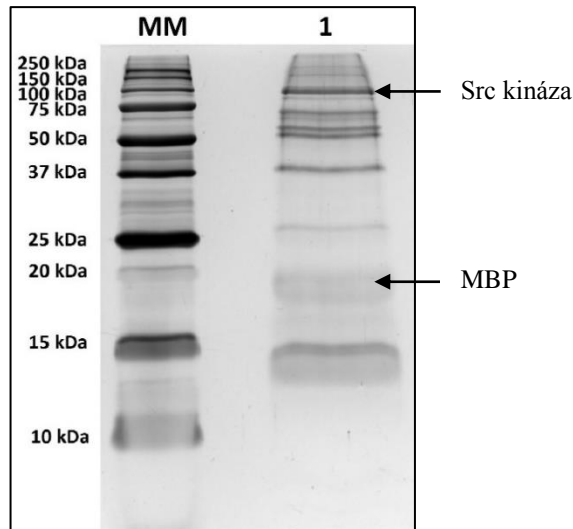
vzorky o obsahu 2  $\mu\text{g}$  MBP okyseleny 5% TFA na hodnotu pH 2 a takto byly inkubovány po dobu 5 minut a 20 hodin. Následně byly vzorky separovány metodou SDS-PAGE na 16,5% gelu (Obr. 20) dle kapitoly 3.8.



**Obr. 20** SDS-PAGE analýza hovězího MBP v prostředí TFA. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Unstained Protein Standards, **1, 2** – 2  $\mu\text{g}$  MBP okyseleno TFA na pH 2, inkubace 20 hodin, **3, 4** – 2  $\mu\text{g}$  MBP okyseleno TFA na pH 2, inkubace 5 minut, **5, 6** – 2  $\mu\text{g}$  MBP. 16,5% gel barven roztokem amoniakálního stříbra.

Z Obr. 20 je patrné, že v případě okyselených vzorků pravděpodobně dochází ke zvýšení fragmentace proteinu již po 5-ti minutové inkubaci v kyselém prostředí TFA (dráha 3 a 4). Ve srovnání s MBP bez úpravy (dráha 5 a 6) je zřejmý nárůst fragmentů v rozmezí molekulových hmotností 10 – 15 kDa. Bylo tedy prokázáno, že okyselení vzorků 5% TFA vede k mírnému zvýšení fragmentace proteinu, ale neukazuje přímo na velkou degradaci a následnou ztrátu proteinů z reakční směsi.

Na základě těchto poznatků byla ověřena sorpce proteinů na povrch reakční zkumavky. Za tímto účelem byly proteiny z povrchu reakční zkumavky ze druhé modifikace experimentu, u které došlo k nejvýraznějším ztrátám, uvolněny 50  $\mu\text{l}$  0,5% silného detergentu SDS. Zkumavka byla inkubována (5 minut, laboratorní teplota, 500 rpm). Obsah zkumavky byl poté zakoncentrován (45  $^{\circ}\text{C}$ , 1400 rpm) a analyzován metodou SDS-PAGE na 16,5% gelu dle kapitoly 3.8 (Obr. 21).



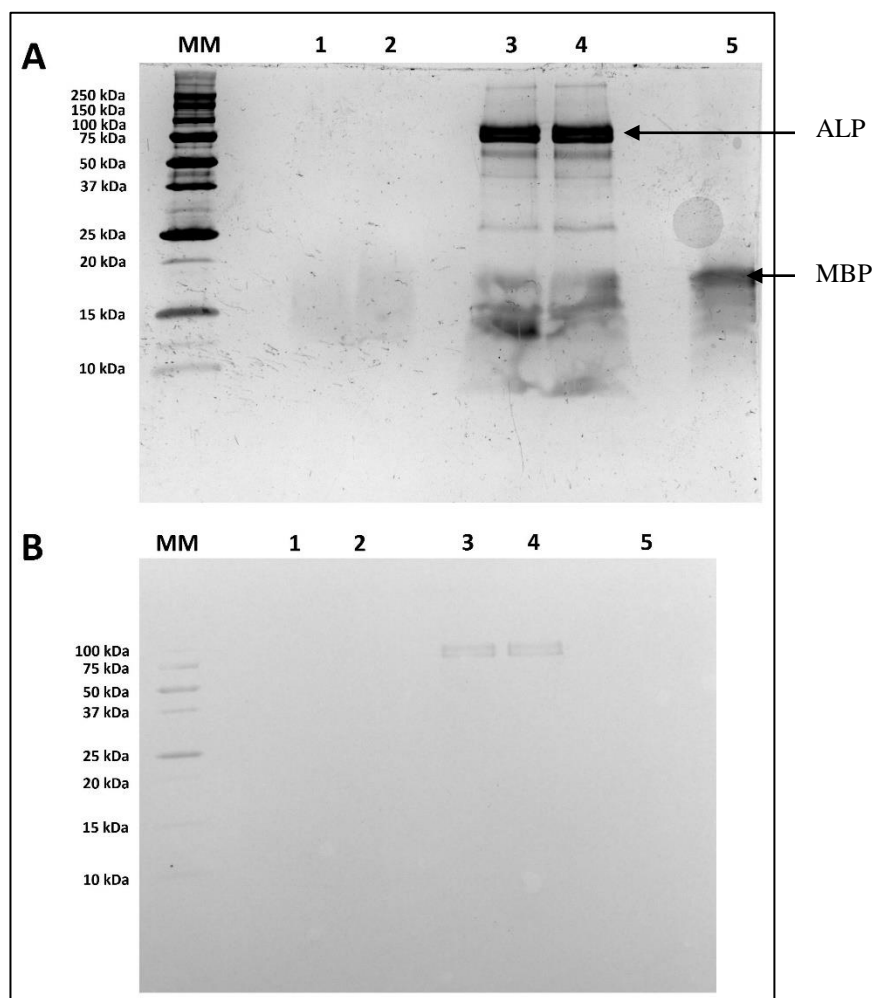
**Obr. 21** SDS-PAGE analýza proteinů uvolněných z povrchu reakční zkumavky s využitím 0,5% SDS. Separční dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Unstained Protein Standards, **1** – proteiny uvolněné z povrchu reakční zkumavky druhé modifikace experimentu. 16,5% gel barven roztokem amoniakálního stříbra.

Z Obr. 21 (dráha 1) je patrné, že použitím detergentu došlo k uvolnění značného množství sorbovaných proteinů. Na gelu je patrná přítomnost velkého množství Src kinázy a také MBP. Lze tedy říci, že v průběhu experimentu fosforylace MBP solubilní Src kinázou dochází k poměrně velkým ztrátám proteinů, které jsou způsobeny zvýšenou sorpcí proteinů na povrch reakčních zkumavek.

### 4.2.3 Fosforylace myelinového bazického proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič

Cílem experimentu bylo fosforylovat hovězí MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads a tuto fosforylaci detekovat metodami zavedenými v předchozích částech práce. Fosforylace MBP imobilizovanou Src kinázou byla provedena dle kapitoly 3.4.2.

Vzorek fosforylovaného MBP určený pro analýzu metodou Western blot byl analyzován dle kapitoly 3.9 (Obr. 22).



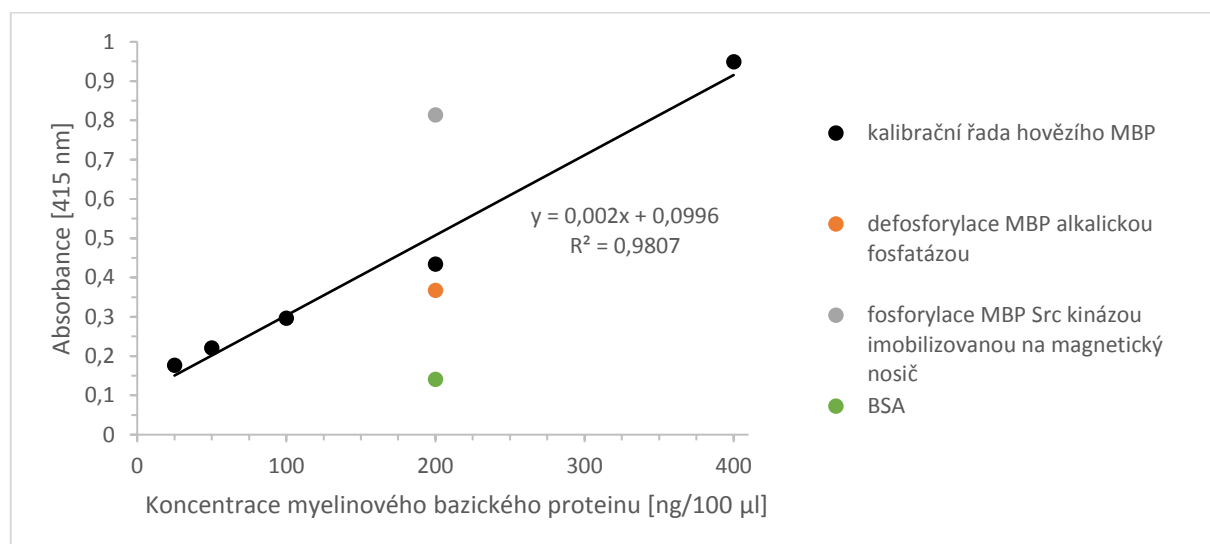
**Obr. 22** Detekce úspěšnosti fosforylace hovězího MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Dual Color Protein Standards, **1, 2** – 2  $\mu$ g MBP fosforylovaný 0,04  $\mu$ g magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou, **3, 4** – 2  $\mu$ g MBP defosforylovaný alkalickou fosfatázou, **5** – 2  $\mu$ g MBP. (A) SDS-PAGE v prostředí glycinu, 16,5% gel po přenosu barven roztokem amoniakálního stříbra, (B) NC membrána, barveno Ponceau S.

Ze separačních drah 1 a 2 v porovnání se separační dráhou 5 (Obr. 22A) je patrné, že v průběhu reakce došlo k výrazné ztrátě MBP. Z předchozí zkušenosti s fosforylací MBP solubilní Src kinázou je pravděpodobné, že ztráta proteinu byla způsobena zvýšenou sorpcí



proteinu na povrch reakční zkušavky, v tomto případě také sorpcí proteinu na povrch magnetických částic a také skutečností, že vzorek byl před analýzou okyselen 5% TFA. Po obarvení membrány roztokem Ponceau S po přenosu nebyla přítomnost MBP patrná vůbec (Obr. 22B, dráha 1 a 2). Po provedení imunodetekce přítomnosti fosforylace tyrosinu u MBP (obrázek neuveden) nebyla detekována fosforylace na tyrosinu. Negativní výsledek je v tomto případě s největší pravděpodobností důsledkem velké ztráty proteinu v průběhu reakce.

Vzorek MBP (200 ng) fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice byl analyzován pomocí kitu pIMAGO dle kapitoly 3.7. Jako negativní kontrola byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Ze závislosti absorbance na koncentraci MBP (Graf 7) je zřejmé, že v případě fosforylace MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič došlo ke zdatnému nárůstu absorbance oproti absorbanci MBP bez úpravy. V porovnání s experimenty se solubilní Src kinázou, kde absorbance fosforylovaných vzorků dosahovaly hodnot 3,35 – 3,83, došlo v tomto případě k nárůstu absorbance na hodnotu 0,814. Nižší hodnota absorbance může být v tomto případě způsobena velkou ztrátou MBP v průběhu reakce. Přes tuto skutečnost ukazuje nárůst absorbance vzorku fosforylovaného MBP ve srovnání s absorbancí vzorku MBP bez úpravy na úspěšnou fosforylaci MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič.



**Graf 7** Závislost absorbance na koncentraci hovězího MBP pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič; pro kalibrační křivku jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří opakování, pro fosforylaci MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič a defosforylaci MBP je uvedena hodnota z jednoho opakování.

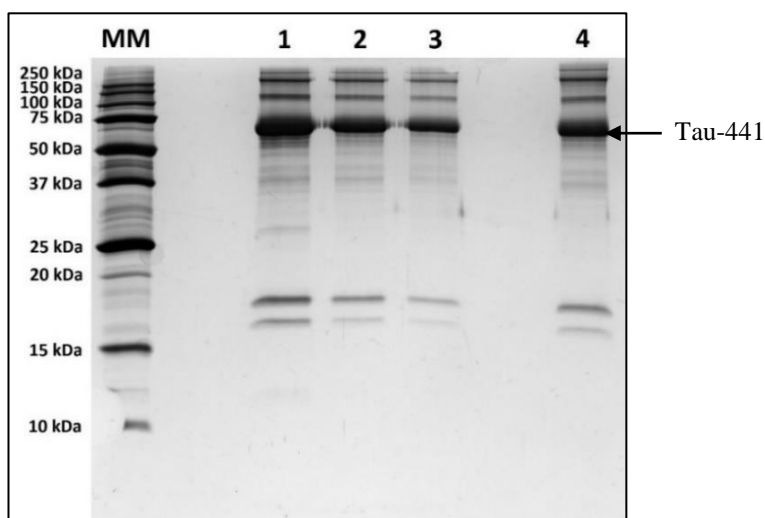
Vzorek MBP fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice pro analýzu MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrií byl zpracován a analyzován totožným způsobem jako v případě fosforylace MBP solubilní Src kinázou. V MALDI-Orbitrap

hmotnostním spektru v tomto případě nebyla patrná přítomnost žádného peptidu (MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum neuvedeno). Tuto skutečnost lze vysvětlit jako důsledek velké ztráty proteinu v průběhu fosforylační reakce. V průběhu fosforylace MBP Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice dochází k daleko výraznějším ztrátám proteinu ve srovnání s fosforylací MBP solubilní Src kinázou.

#### 4.2.4 Fosforylace rekombinantního proteinu Tau-441 Src kinázou

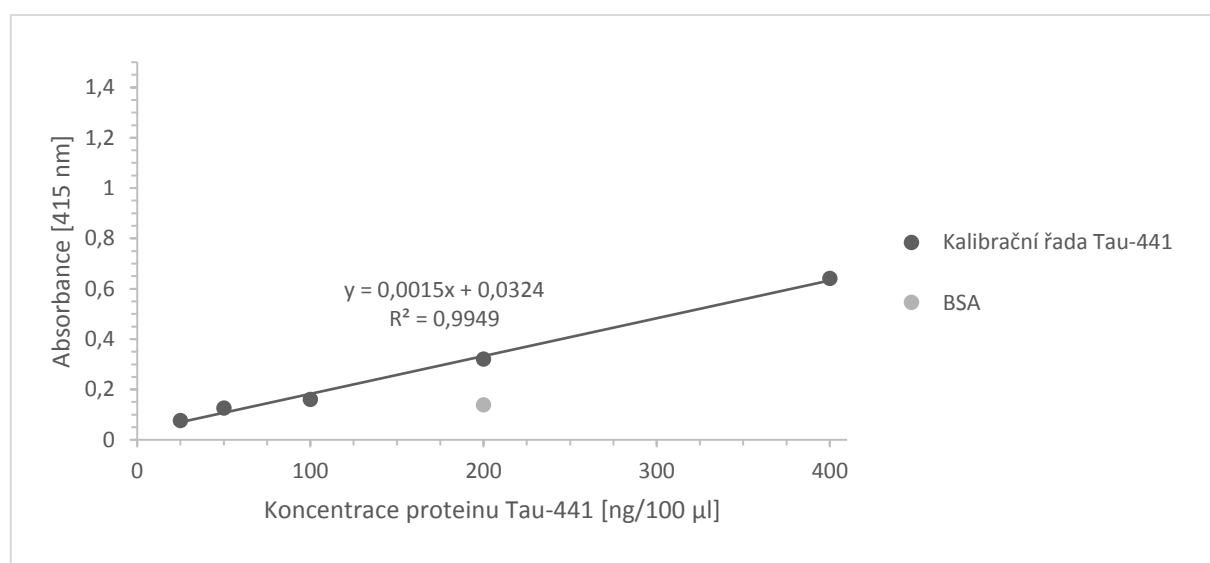
Druhým modelovým proteinem určeným pro *in vitro* fosforylaci byl rekombinantní protein Tau-441, který ve své aminokyselinové sekvenci obsahuje celkem pět tyrosinů, a to Tyr18, Tyr29, Tyr197, Tyr310 a Tyr394. Před zahájením experimentů byla ověřena čistota rekombinantního proteinu Tau-441.

Čistota proteinu Tau-441 byla ověřena metodou SDS-PAGE na 16,5% gelu dle kapitoly 3.8 (Obr. 23). V separačních drahách 1 – 3 byl separován protein Tau-441 v různých koncentracích. Z důvodu nutnosti zakoncentrování některých vzorků fosforylovaného proteinu Tau-441 po fosforylaci byl v separační dráze 4 separován protein Tau-441, který byl před separací zakoncentrován (45 °C, 1400 rpm). Jednotlivé proužky proteinu Tau-441 dosahují molekulové hmotnosti okolo 70 kDa, což nekoreluje s teoretickou molekulovou hmotností tohoto proteinu (45,9 kDa). Příčinou vyšší hodnoty molekulové hmotnosti je snížená mobilita proteinu v polyakrylamidovém gelu [199]. Ze všech separačních drah je patrné, že protein Tau-441 je zčásti fragmentován a tvoří dimerní struktury. Dále je ze separační dráhy 4 zřejmé, že zakoncentrování proteinu Tau-441 před elektroforetickou separací nemá na jeho kvalitu zásadní vliv a zároveň nedochází k výrazné ztrátě proteinu v důsledku zakoncentrování.



**Obr. 23** SDS-PAGE analýza rekombinantního proteinu Tau-441. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Unstained Protein Standards, **1** – 2 µg Tau-441, **2** – 1 µg Tau-441, **3** – 0,5 µg Tau-441, **4** – 2 µg Tau-441 zakoncentrován (45°C, 1400 rpm). 16,5% gel barven roztokem amoniakálního stříbra.

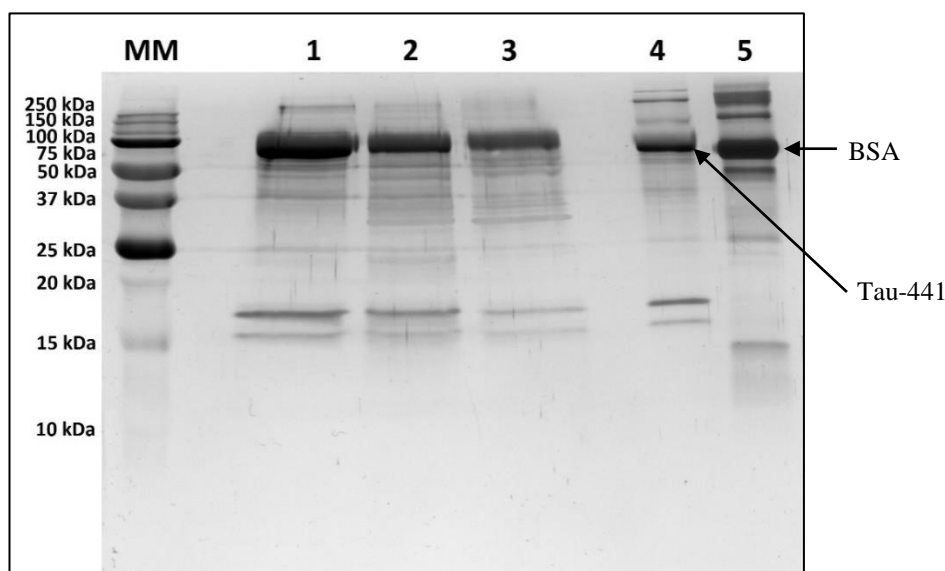
Struktura rekombinantního proteinu Tau-441 vzhledem ke svému původu neobsahuje žádnou eukaryotní posttranslační modifikaci, včetně fosforylace. Tato skutečnost byla ověřena pomocí kitu pIMAGO dle kapitoly 3.7. Na destičku byl protein Tau-441 dávkován v koncentračním rozmezí 25 – 400 ng/100 µl. Absorbance byla měřena při 415 nm. Z průměrných hodnot naměřené absorbance ze tří opakování byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 (Graf 8). Ze závislosti je patrná linearita v celém koncentračním rozsahu. Absorbance 200 ng negativní kontroly, hovězího sérového albuminu (BSA), dosahovala hodnoty 0,139. Hodnota absorbance 200 ng proteinu Tau-441 dosahovala hodnoty 0,321, tedy vyšší než negativní kontrola. Tato skutečnost může u proteinu Tau-441 ukazovat na nescifickou vazbu dendrimery pIMAGO. Na povrchu dendrimery pIMAGO jsou přítomny  $Ti^{4+}$  ionty, které se mohou mimo fosforylovaných zbytků nescificky vázat také na kyselé aminokyseliny a histidin. V důsledku vysokého zastoupení kyseliny asparagové (6,58 %), kyseliny glutamové (6,12 %) a histidinu (2,72 %) v aminokyselinové sekvenci proteinu Tau-441 došlo k nescifické vazbě dendrimery pIMAGO na tyto aminokyseliny a z tohoto důvodu k falešně pozitivní detekci fosforylace rekombinantního proteinu Tau-441.



**Graf 8** Závislost absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny; průměrné hodnoty ze tří opakování.

Cílem následujících experimentů bylo fosforylovat protein Tau-441 solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads. Fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou byla provedena dle kapitoly 3.6.1 s optimalizovaným postupem bez okyselení TFA. Reakční směs byla tvořena solubilní Src kinázou, proteinem Tau-441, reakčním pufrům a ATP v celkovém reakčním objemu 100  $\mu$ l. Pro fosforylaci proteinu Tau-441 imobilizovanou Src kinázou dle kapitoly 3.6.2 byly zvoleny dva typy nosičů. První nosič byl připraven dle kapitoly 3.2. V případě druhém byla imobilizace Src kinázy provedena v 50 mM MES pufr, pH 6,0 s přidavkem 0,05% BSA. Přidavek BSA vede k blokaci nespecifické sorpce proteinů na povrch magnetického nosiče v průběhu fosforylační reakce [199].

Vzorky fosforylovaného Tau-441 určené pro analýzu metodou Western blot byly analyzovány dle kapitoly 3.9 (Obr. 24).

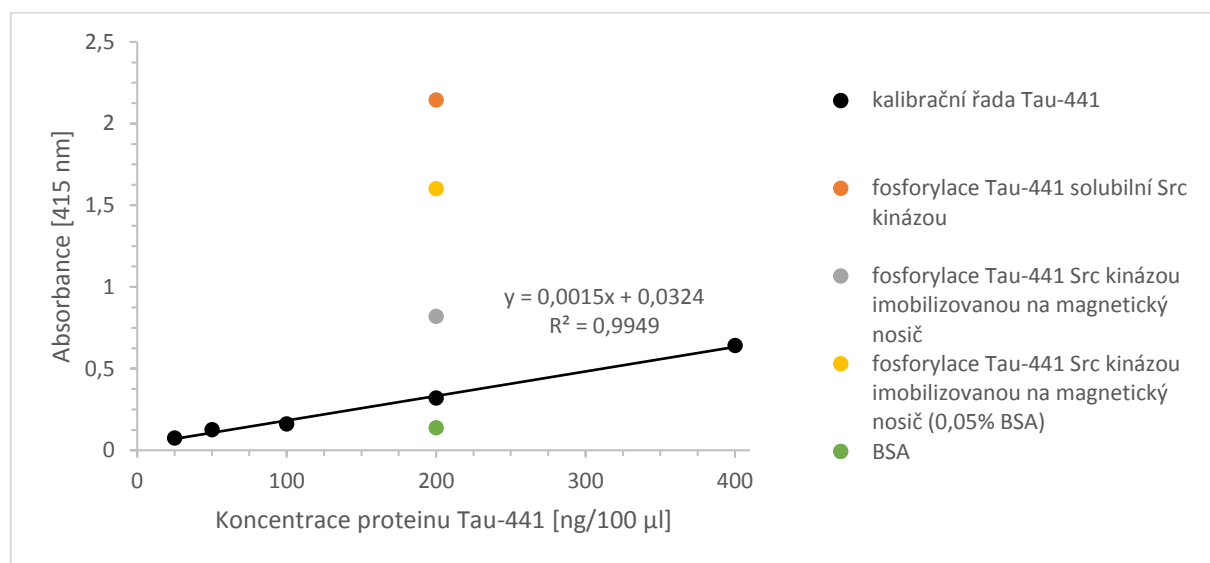


**Obr. 24** SDS-PAGE analýza detekce úspěšnosti fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice. Separační dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Dual Color Protein Standards, **1** – 2  $\mu$ g Tau-441 fosforylovaný 0,1  $\mu$ g solubilní Src kinázy, **2** - 2  $\mu$ g Tau-441 fosforylovaný 0,02 mg magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou, **3** – 2  $\mu$ g Tau-441 fosforylovaný 0,02 mg magnetických částic s imobilizovanou Src kinázou (blokace 0,05% BSA), **4** – 1  $\mu$ g Tau-441, **5** – 1  $\mu$ g BSA. 16,5% gel po přenosu barven roztokem amoniakálního stříbra.

V porovnání separačních drah 1,2 a 3 na Obr. 24 s proteinem Tau-441 bez úpravy (dráha 4) je v případě fosforylovaného proteinu Tau-441 patrný mírný nárůst molekulové hmotnosti, který může poukazovat na možnost úspěšné fosforylace. Ze separační dráhy 1 je patrné, že v případě fosforylace solubilní Src kinázou nedochází v průběhu reakce k zásadní ztrátě proteinu Tau-441. Ze separačních drah 2 a 3 je naopak zřejmé, že v případě fosforylace imobilizovanou Src kinázou došlo k úbytku proteinu Tau-441 v jednotlivých reakčních

směsích. Příčinou této ztráty je pravděpodobně zvýšená sorpce proteinu na povrch reakční zkušavky a na povrch magnetických částic. Ze separační dráhy 3 je však zřejmé, že blokace nespecifické sorpce pomocí BSA v průběhu imobilizace neměla na snížení sorpce proteinu v průběhu fosforylační reakce zásadní vliv. Naopak v tomto případě došlo k ztelnější ztrátě proteinu. Po provedení imunodetekce přítomnosti fosforylace tyrosinu dle kapitoly 3.9 nebyla přítomnost fosforylace prokázána (obrázek neuveden).

Vzorky fosforylovaného proteinu Tau-441 (200 ng) byly analyzovány pomocí kitu pIMAGO dle kapitoly 3.7. Jako negativní kontrola byl použit hovězí sérový albumin (BSA).



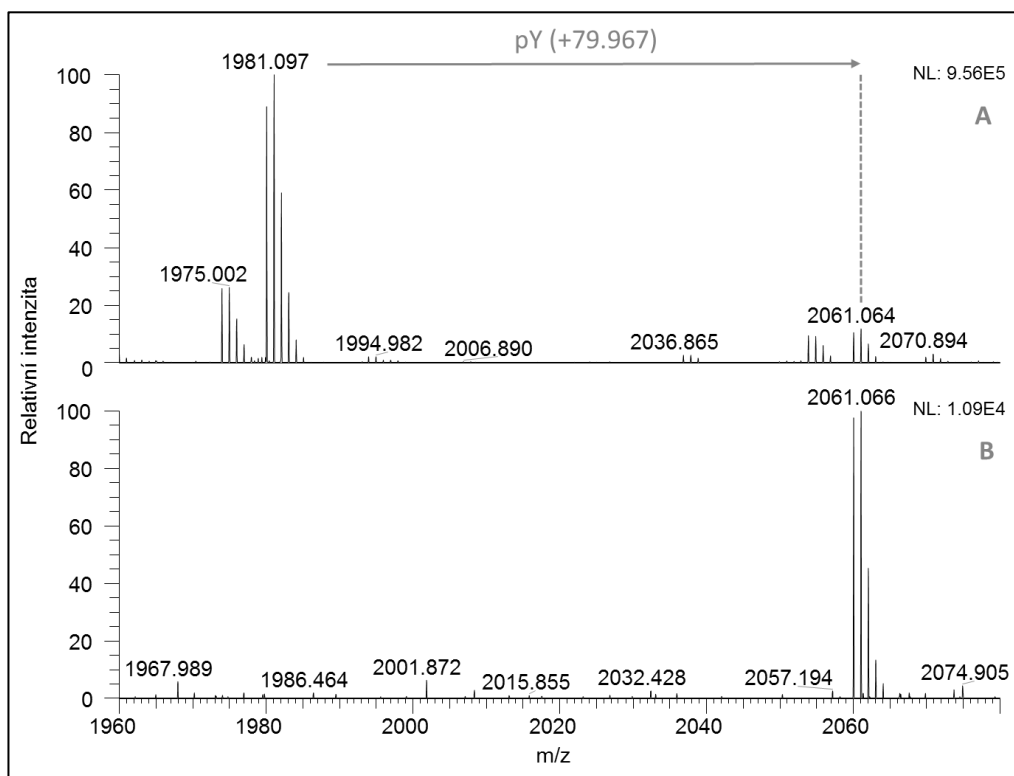
**Graf 9** Závislost absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 pomocí detekčního kitu pIMAGO pro fosfoproteiny, fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na magnetický nosič; pro kalibrační křivku jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří opakování, pro fosforylaci Tau-441 solubilní a imobilizovanou Src kinázou je uvedena hodnota z jednoho opakování.

Ze závislosti absorbance na koncentraci proteinu Tau-441 (Graf 9) je ve všech třech případech fosforylovaných vzorků znatelný nárůst absorbance oproti korelujícímu množství proteinu Tau-441 bez úpravy. K nejvyššímu nárůstu došlo v případě fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou, kdy absorbance dosahovala hodnoty 2,144. Nižších hodnot bylo dosaženo v případě fosforylace proteinu Tau-441 imobilizovanou Src kinázou. V případě fosforylace Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice bez blokace dosáhla absorbance hodnoty 0,821, zatímco v případě fosforylace Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice blokováné BSA vzrostla absorbance na hodnotu 1,601. Nižší hodnoty absorbancí u fosforylací imobilizovanou Src kinázou bez blokace mohou souviset s částečnou ztrátou proteinu v průběhu reakce. Nicméně nárůstem hodnot absorbancí jednotlivých vzorků

ve srovnání s absorbcí proteinu Tau-441 bez úpravy byla pomocí kitu pIMAGO prokázána úspěšná fosforylace proteinu Tau-441 jak solubilní, tak také imobilizovanou Src kinázou.

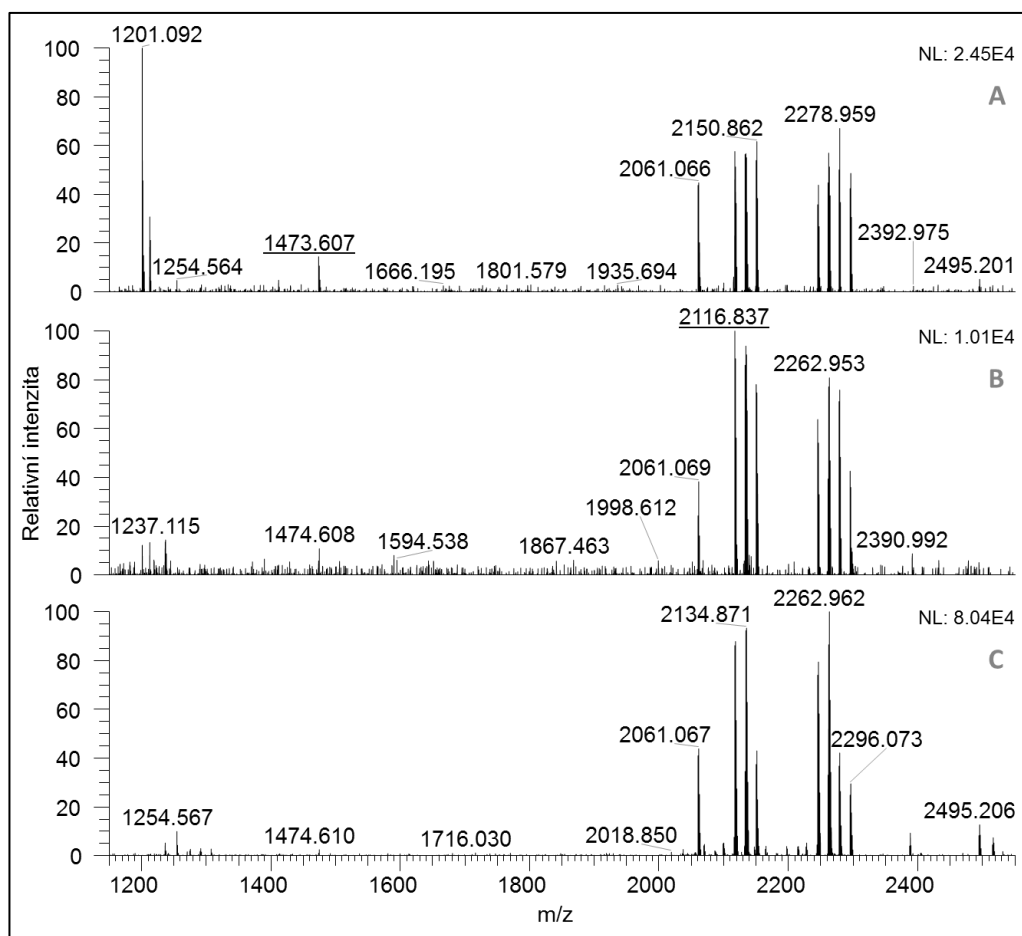
Pro potvrzení úspěšnosti fosforylace proteinu Tau-441 metodou MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie byly vzorky o obsahu 2  $\mu\text{g}$  fosforylovaného proteinu Tau-441 nejprve separovány metodou SDS-PAGE na 16,5% gelu dle kapitoly 3.8. Gel byl poté obarven Coomassie G-250 Stain dle kapitoly 3.8.1 (obrázek neuveden). Protein Tau-441 byl následně naštěpen modifikovaným trypsinem pro sekvenaci v polyakrylamidovém gelu dle kapitoly 3.10.1. Extrakty peptidů byly odsoleny na reverzní fázi dle kapitoly 3.10.3 a analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie. Úspěšná fosforylace proteinu Tau-441 byla ve všech třech případech fosforylací potvrzena detekcí několika fosfopeptidů (Obr. 25A).

V MALDI-Orbitrap hmotnostních spektrech bylo detekováno několik peptidů s velmi nízkou intenzitou (Obr. 25A,  $m/z$  2050 – 2075). Z tohoto důvodu byly supernatanty peptidů získané při štěpení proteinu Tau-441 v polyakrylamidovém gelu navíc obohaceny na 0,2 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material dle kapitoly 3.10.2 a poté analyzovány hmotnostní spektrometrií. Porovnání spekter neobohaceného a obohaceného vzorku spolu s posunem  $m/z$ , ke kterému dochází při fosforylaci jednoho tyrosinu (pY), je uvedeno na Obr. 25.



**Obr. 25** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum proteinu Tau-441 fosforylovaného Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice (blokace 0,05% BSA) (A) bez obohacení, (B) obohacení na 0,2 mg nosiče Titansphere™ TiO Bulk Material, matrice DHB.

Na Obr. 26 jsou znázorněna MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra vzorků obohacených na nosiči Titansphere™ TiO Bulk Material.



**Obr. 26** MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrum proteinu Tau-441 fosforylovaného (A) Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice (blokace 0,05% BSA), (B) Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice, (C) solubilní Src kinázou, matrice DHB; podtržené jsou zvýrazněny detekované fosfopeptidy.

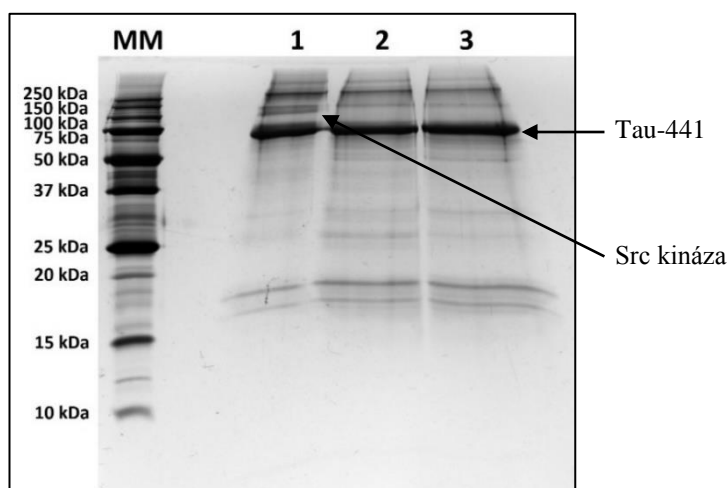
V Tab. 4 jsou uvedeny detekované fosfopeptidy ve vzorcích obohacených supernatantů. Z tabulky lze usoudit, že v případě fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou i Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice s/bez blokace BSA došlo k úspěšné fosforylaci na čtyřech možných fosforylačních místech, a to na Tyr18, Tyr197, Tyr310 a Tyr394. Úspěšnou fosforylací potvrzuje také skutečnost, že z MALDI-Orbitrap hmotnostních spekter bylo zřejmé, že analyzované fosfopeptidy nebyly v průběhu analýzy dále fragmentovány ve zdroji hmotnostního spektrometru a nedocházelo tedy ke ztrátě fosfátové skupiny z detekovaných fosfopeptidů.

**Tab. 4** Vyhodnocení fosforylace proteinu Tau-441 solubilní a imobilizovanou Src kinázou pomocí MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie.

Fosforylace proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou							
m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba $\Delta$ ppm	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
1473,6036	1473,6006	2,05	1Fosfo	195	209	0	(R)SGYSSPGSPGTPGSR(S)
2060,0644	2060,0576	3,27	1Fosfo	299	317	0	(K)HVPGGGSVQIVYKPVLSK(V)
2116,8391	2116,8318	3,46	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2132,8323	2132,8267	2,65	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2133,8623	2133,8583	1,84	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2149,8593	2149,8532	2,82	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2244,9343	2244,9267	3,35	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2260,9303	2260,9217	3,83	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2261,956	2261,9533	1,19	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2277,9567	2277,9482	3,73	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2295,0734	2295,0653	3,54	1Fosfo	386	406	1	(K)TDHGAEIVYKSPVSGDTSR(H)
2494,2063	2494,1974	3,6	1Fosfo	384	406	2	(K)AKTDHGAEIVYKSPVSGDTSR(H)
Fosforylace proteinu Tau-441 imobilizovanou Src kinázou							
m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba $\Delta$ ppm	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
1212,5312	1212,5296	1,32	1Fosfo	386	395	0	(K)TDHGAEIVYK(S)
1473,6116	1473,6006	7,5	1Fosfo	195	209	0	(R)SGYSSPGSPGTPGSR(S)
2060,0646	2060,0576	3,4	1Fosfo	299	317	0	(K)HVPGGGSVQIVYKPVLSK(V)
2116,8375	2116,8318	2,71	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2132,8359	2132,8267	4,3	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2133,8525	2133,8583	-2,74	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2149,859	2149,8532	2,69	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2244,9307	2244,9267	1,78	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2260,9401	2260,9217	8,17	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2261,9441	2261,9533	-4,06	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2277,957	2277,9482	3,87	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2295,0751	2295,0653	4,28	1Fosfo	386	406	1	(K)TDHGAEIVYKSPVSGDTSR(H)
2494,1892	2494,1974	-3,29	1Fosfo	384	406	2	(K)AKTDHGAEIVYKSPVSGDTSR(H)
Fosforylace proteinu Tau-441 imobilizovanou Src kinázou (blokace 0,05% BSA)							
m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba $\Delta$ ppm	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechaná místa štěpení	Aminokyselinová sekvence
1212,5346	1212,5296	4,08	1Fosfo	386	395	0	(K)TDHGAEIVYK(S)
1411,6622	1411,6617	0,358	1Fosfo	384	395	1	(K)AKTDHGAEIVYK(S)
1473,6078	1473,6006	4,89	1Fosfo	195	209	0	(R)SGYSSPGSPGTPGSR(S)
2060,0603	2060,0576	1,32	1Fosfo	299	317	0	(K)HVPGGGSVQIVYKPVLSK(V)
2116,8374	2116,8318	2,64	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2132,8337	2132,8267	3,3	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2133,849	2133,8583	-4,37	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2149,8585	2149,8532	2,46	1Fosfo	6	23	0	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDR(K)
2244,9293	2244,9267	1,14	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2260,9253	2260,9217	1,63	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2261,9494	2261,9533	-1,74	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2277,9521	2277,9482	1,7	1Fosfo	6	24	1	(R)QFEFVMDHAGTYGLGDRK(D)
2295,0722	2295,0653	3,01	1Fosfo	386	406	1	(K)TDHGAEIVYKSPVSGDTSR(H)



Z důvodu předešlé zkušenosti se zvýšenou sorpcí proteinů na povrch zkumavky v průběhu reakce byla i v případě fosforylace proteinu Tau-441 prověřena tato skutečnost. Za tímto účelem byly proteiny z povrchu reakční zkumavky ze všech tří experimentů uvolněny 50  $\mu$ l 0,5% detergentu SDS. Zkumavky byly inkubovány (5 minut, laboratorní teplota, 500 rpm). Obsah zkumavek byl poté zakoncentrován (45 °C, 1400 rpm) a separován metodou SDS-PAGE na 16,5% gelu dle kapitoly 3.8 (Obr. 27).



**Obr. 27** SDS-PAGE analýza proteinů uvolněných z povrchu reakčních zkumavek s využitím 0,5% SDS. Separční dráha: **MM** – marker molekulových hmotností Unstained Protein Standards, proteiny uvolněné z povrchu reakční zkumavky: **1** – fosforylace Tau-441 solubilní Src kinázou, **2** - fosforylace Tau-441 Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice, **3** - fosforylace Tau-441 Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice (blokace 0,05% BSA). 16,5% gel barven roztokem amoniakálního stříbra.

Z Obr. 27 je zřejmé, že jak při fosforylaci proteinu Tau-441 solubilní Src kinázou, tak Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice dochází k vysoké sorpci proteinů na povrch reakčních zkumavek. V separační dráze 1 je patrné uvolnění velkého množství Src kinázy a proteinu Tau-441. V separačních drahách 2 a 3 je naopak patrné uvolnění velkého množství pouze proteinu Tau-441. Lze tedy říci, že v průběhu fosforylace proteinu Tau-441 Src kinázou dochází také ke ztrátám proteinů, a to z důvodu zvýšené sorpce na povrch zkumavek.

## 5 ZÁVĚR

Pro imobilizaci Src kinázy na magnetické částice ProMag<sup>®</sup> HC 1 Series a Sera-Mag Speed Beads byla využita kovalentní metoda imobilizace prostřednictvím EDAC a Sulfo-NHS. Z výsledků dosažených aktivit s peptidovým substrátem pro c-Src byly pro imobilizaci zvoleny jako vhodnější částice Sera-Mag Speed Beads. Tato imobilizovaná Src kináza dosáhla významně vyšších aktivit také ve srovnání s aktivitou solubilní formy Src kinázy.

Na základě procentuální míry fosforylace peptidového substrátu stanovované po dobu čtyř týdnů byl prokázán pokles ve skladovací stabilitě Src kinázy imobilizované na částice Sera-Mag Speed Beads o 33,61 %. Dále bylo prokázáno, že operační stabilita imobilizované Src kinázy po šesti opakovaných použitích klesla o 92,99 %. Pro zlepšení operační stability imobilizované Src kinázy připadá v úvahu možnost využití jiného typu magnetického nosiče, případě použití jiné imobilizační techniky.

Solubilní a imobilizovaná forma Src kinázy byla použita k *in vitro* fosforylaci dvou modelových proteinů, a to hovězího myelinového bazického proteinu a rekombinantního proteinu Tau-441. Na zvýšení míry fosforylace hovězího myelinového bazického proteinu solubilní i imobilizovanou Src kinázou ukázaly výsledky získané pomocí kitu pIMAGO. Z výsledků metody MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie bylo možné za úspěšnou fosforylaci považovat pouze fosforylaci myelinového bazického proteinu solubilní Src kinázou, kdy byla úspěšně fosforylována dvě ze čtyř možných fosforylačních míst, a to Tyr67 a Tyr126.

V případě proteinu Tau-441 byl protein fosforylován solubilní Src kinázou a Src kinázou imobilizovanou na částice Sera-Mag Speed Beads. Pro fosforylaci byly použity magnetické částice s imobilizovanou Src kinázou jak neblokované, tak blokované hovězím sérovým albuminem proti nespecifické sorpci. Tato blokáce bohužel nevedla ke snížení ztrát proteinu v průběhu fosforylace. Ve všech případech byla úspěšná fosforylace prokázána pomocí kitu pIMAGO. Z výsledků metody MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrie bylo u všech způsobů fosforylaci proteinu Tau-441 možné usoudit, že došlo k úspěšné fosforylaci čtyř z pěti možných fosforylačních míst, a to Tyr18, Tyr197, Tyr310 a Tyr394.

V průběhu *in vitro* fosforylace hovězího myelinového bazického proteinu a rekombinantního proteinu Tau-441 dochází ke značným ztrátám proteinů, které jsou důsledkem zvýšené sorpce proteinů na plastový povrch reakčních zkumavek a zřejmě také na povrch magnetických částic s imobilizovanou kinázou. Optimalizace reakčních podmínek vedoucí ke snížení sorpce proteinů v průběhu reakce se může stát předmětem dalšího výzkumu.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NELSON, L.D. a M.M. COX. *Lehninger principles of biochemistry* (5<sup>th</sup> edition). New York: W.H. Freeman, 2008, 229-230 s. ISBN 1429224169.
- [2] WILKS, A. Structure and function of the protein tyrosine kinases. *Progress in Growth Factor Research*. 1990, **2**(2), 97-111.
- [3] HANKS, S., A. QUINN a T. HUNTER. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 1988, **241**(4861), 42-52.
- [4] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell* (4<sup>th</sup> edition). New York: Garland Science, 2002, 865 s. ISBN 0-8153-3218-1.
- [5] RADHA, V., S. NAMBIKIRAJAN a G. SWARUP. Association of Lyn Tyrosine Kinase with the Nuclear Matrix and Cell-Cycle-Dependent Changes in Matrix-Associated Tyrosine Kinase Activity. *European Journal of Biochemistry*. 1996, **236**(2), 352-359.
- [6] RUETTEN, H. a C. THIEMERMANN. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *British Journal of Pharmacology*. 1997, **122**(1), 59-70.
- [7] ROBINSON, D., Y.-M. WU a S.-F. LIN. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000, **19**(49), 5548-5557.
- [8] SCHLESSINGER, J. a A. ULLRICH. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 1992, **9**(3), 383-391.
- [9] HAMILTON, T. Protein Kinases. *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, 1998, 2028-2033 s. ISBN 9780122267659.
- [10] ROSKOSKI, R. Modulation of Enzyme Activity. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2007, 1-11 s. ISBN 9780080552323.
- [11] SCHOMBURG, D. a I. SCHOMBURG. *Springer handbook of enzymes* (2<sup>nd</sup> edition). Berlin: Springer, 2009, 341, 441 s. ISBN 9783540856962.
- [12] RODRIGUES, G. a M. PARK. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1994, **4**(1), 15-24.
- [13] LEMMON, M. a J. SCHLESSINGER. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010, **141**(7), 1117-1134.
- [14] BELL, C., J. TYNAN, K. HART, A. MEYER, S. ROBERTSON a D. DONOGHUE. Rotational Coupling of the Transmembrane and Kinase Domains of the Neu Receptor Tyrosine Kinase. *Molecular Biology of the Cell*. 2000, **11**(10), 3589-3599.
- [15] HUBBARD, S. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999, **71**(3-4), 343-358.
- [16] SÉGALINY, A., M. TELLEZ-GABRIEL, M.-F. HEYMANN a D. HEYMANN. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of Bone Oncology*. 2015, **4**(1), 1-12.
- [17] HOLLAND, S., E. PELES, T. PAWSON a J. SCHLESSINGER. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$ . *Current Opinion in Neurobiology*. 1998, **8**(1), 117-127.
- [18] LI, E. a K. HRISTOVA. Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in Cell Signaling and Human Pathologies. *Biochemistry*. 2006, **45**(20), 6241-6251.

- [19] FINGER, C., C. ESCHER a D. SCHNEIDER. The Single Transmembrane Domains of Human Receptor Tyrosine Kinases Encode Self-Interactions. *Science Signaling*. 2009, **2**(89), 56.
- [20] LI, E. a K. HRISTOVA. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhesion and Migration*. 2010, **4**(2), 249–254.
- [21] CASTERAN, N., P. DE SEPULVEDA, N. BESLU, M. AOUBALA, S. LETARD, E. LECOCQ, R. ROTTAPPEL a P. DUBREUIL. Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations. *Oncogene*. 2003, **22**(30), 4710-4722.
- [22] TAYLOR, S. a E. RADZIO-ANDZELM. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 1994, **2**(5), 345-355.
- [23] HUBBARD, S. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO Journal*. 1997, **16**(18), 5572-5581.
- [24] HUBBARD, S., L. WEI a W. HENDRICKSON. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994, **372**(6508), 746-754.
- [25] KOVACS, E., R. DAS, Q. WANG et al. Analysis of the Role of the C-Terminal Tail in the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 2015, **35**(17), 3083-3102.
- [26] HUBBARD, S. a J. TILL. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry*. 2000, **69**(1), 373-398.
- [27] OGISO, H., R. ISHITANI, O. NUREKI et al. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell*. 2002, **110**(6), 775-787.
- [28] HUBBARD, S. Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Frontiers in Bioscience*. 2002, **7**(4), 330-340.
- [29] LIU, Y. a L. ROHRSCHEIDER. The gift of Gab. *FEBS Letters*. 2002, **515**(1-3), 1-7.
- [30] WAN, H.T., D. MRUK, E. TANG, X. XIAO, Y.-H. CHENG, E. WONG, C. WONG a C. CHENG. Role of non-receptor protein tyrosine kinases in spermatid transport during spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014, **30**, 65-74.
- [31] KRAMER, I. Activating the Adaptive Immune System. *Signal Transduction*. Elsevier, 2016, 813-848 s. ISBN 9780123948038.
- [32] LEVIN, S. a A. WEISS. Non-Receptor Tyrosine Kinases in T Cell Antigen Receptor Function. *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, 2010, 507-516 s. ISBN 9780123741455.
- [33] SCHAFFHAUSEN, B. SH2 domain structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1995, **1242**(1), 61-75.
- [34] MUSACCHIO, A., M. WILMANNNS a M. SARASTER. Structure and function of the SH3 domain. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1994, **61**(3), 283-297.
- [35] GOCEK, E., A. MOULAS a G. STUDZINSKI. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2014, **51**(3), 125-137.

- [36] SHIUE, L., M. ZOLLER a J. BRUGE. Syk Is Activated by Phosphotyrosine-containing Peptides Representing the Tyrosine-based Activation Motifs of the High Affinity Receptor for IgE. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, **270**(18), 10498-10502.
- [37] MANNING, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*. 2002, **298**(5600), 1912-1934.
- [38] BOGGON, T. a M. ECK. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004, **23**(48), 7918-7927.
- [39] THOMAS, S. a J. BRUGGE. Cellular functions regulated by src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997, **13**(1), 513-609.
- [40] KRÄMER-ALBERS, E.-M. a R. WHITE. From axon–glial signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, **68**(12), 2003-2012.
- [41] GOLDSMITH, J., C. HALL a T.P. ATKINSON. Identification of an alternatively spliced isoform of the fyn tyrosine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, **298**(4), 501-504.
- [42] RESH, M. Fyn, a Src family tyrosine kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998, **30**(11), 1159-1162.
- [43] SUGAWARA, K., I. SUGAWARA, J. SUKEGAWA, T. AKATSUKA, T. YAMAMOTO, M. MORITA, S. MORI a K. TOYOSHIMA. Distribution of c-yes-1 gene product in various cells and tissues. *British Journal of Cancer*. 1991, **63**(4), 508-513.
- [44] VARRIN-DOYER, M., P. VINCENT, S. CAVAGNA et al. Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 2 on Tyr-479 Regulates CXCL12-induced T Lymphocyte Migration. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, **284**(19), 13265-13276.
- [45] MARTIN, N., P. MCANDREW, P. EVE a M. GARRETT. Phosphorylation of cyclin dependent kinase 4 on tyrosine 17 is mediated by Src family kinases. *FEBS Journal*. 2008, **275**(12), 3099-3109.
- [46] SERGEANT, S., K. WAITE, J. HERAVI a L. MCPHAIL. Phosphatidic Acid Regulates Tyrosine Phosphorylating Activity in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(7), 4737-4746.
- [47] INOUE, K., T. YAMAMOTO a K. TOYOSHIMA. Specific expression of human c-fgr in natural immunity effector cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1990, **10**(4), 1789-1792.
- [48] LOWELL, C. Src-family and Syk Kinases in Activating and Inhibitory Pathways in Innate Immune Cells: Signaling Cross Talk. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011, **3**(3), 2352-2352.
- [49] BOROWIEC, M., C. LIEW, R. THOMPSON et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and cell dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, **106**(34), 14460-14465.
- [50] AKERBLAD, P. a M. SIGVARDSSON. Early B cell factor is an activator of the B lymphoid kinase promoter in early B cell development. *Journal of Immunology*. 1999, **163**(10), 5453-5461.

- [51] BEWARDER, N., V. WEINRICH, P. BUDDE, D. HARTMANN, H. FLASWINKEL, M. RETH a J. FREY. In vivo and in vitro specificity of protein tyrosine kinases for immunoglobulin G receptor (FcγRII) phosphorylation. *Molecular and Cell Biology*. 1996, **16**(9), 4735-4743.
- [52] ZIEGLER, S., J. MARTH, D. LEWIS a R. PERLMUTTER. Novel protein-tyrosine kinase gene (hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Molecular and Cellular Biology*. 1987, **7**(6), 2276-2285.
- [53] WELCH, H. a I. MARIDONNEAU-PARINI. Hck Is Activated by Opsonized Zymosan and A23187 in Distinct Subcellular Fractions of Human Granulocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(1), 102-109.
- [54] POH, A., R. O'DONOGHUE a M. ERNST. Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget*. 2015, **6**(18), 15752-15771.
- [55] BARBER, E., J. DASGUPTA, S. SCHLOSSMAN, J. TREVILLYAN a C. RUDD. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, **86**(9), 3277-3281.
- [56] ROSSY, J., D. WILLIAMSON a K. GAUS. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Frontiers in Immunology*. 2012, **3**, 167.
- [57] YAMANASHI, Y., S. MORI, M. YOSHIDA, T. KISHIMOTO, K. INOUE, T. YAMAMOTO a K. TOYOSHIMA. Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, **86**(17), 6538-6542.
- [58] UMEMORI, H., A. WANAKA, H. KATO, M. TAKEUCHI, M. TOHYAMA a T. YAMAMOTO. Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Molecular Brain Research*. 1992, **16**(3-4), 303-310.
- [59] YAMANASHI, Y., S. FUKUSHIGE, K. SEMBA, J. SUKEGAWA, N. MIYAJIMA, K. MATSUBARA, T. YAMAMOTO a K. TOYOSHIMA. The yes-related cellular gene lyn encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck. *Molecular and Cellular Biology*. 1987, **7**(1), 237-243.
- [60] HARDER, K., L. PARSONS, J. ARMES et al. Gain- and Loss-of-Function Lyn Mutant Mice Define a Critical Inhibitory Role for Lyn in the Myeloid Lineage. *Immunity*. 2001, **15**(4), 603-615.
- [61] MULLER, G., S. WIED a W. FRICK. Cross Talk of pp125FAK and pp59Lyn Non-Receptor Tyrosine Kinases to Insulin-Mimetic Signaling in Adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, **20**(13), 4708-4723.
- [62] GRINGERI, E., A. CARRARO, E. TIBALDI et al. Lyn-mediated mitochondrial tyrosine phosphorylation is required to preserve mitochondrial integrity in early liver regeneration. *Biochemical Journal*. 2010, **425**(2), 401-412.
- [63] CANCE, W.G., R.J. CRAVEN, M. BERGMAN, L. XU, K. ALITALO a E.T. LIU. Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells. *Cell Growth Differ*. 1994, **5**(12), 1347-1355.

- [64] YIM, E.-K., G. PENG, H. DAI et al. Rak Functions as a Tumor Suppressor by Regulating PTEN Protein Stability and Function. *Cancer Cell*. 2009, **15**(4), 304-314.
- [65] KAWACHI, Y., H. NAKAUCHI a F. OTSUKA. Isolation of a cDNA encoding a tyrosine kinase expressed in murine skin. *Experimental Dermatology*. 1997, **6**(3), 140-146.
- [66] PETRO, B.J., R.C. TAN, A.L. TYNER, M.W. LINGEN a K. WATANABE. Differential expression of the non-receptor tyrosine kinase BRK in oral squamous cell carcinoma and normal oral epithelium. *Oral Oncology*. 2004, **40**(10), 1040-1047.
- [67] DERRY, J., G. PRINS, V. RAY a A. TYNER. Altered localization and activity of the intracellular tyrosine kinase BRK/Sik in prostate tumor cells. *Oncogene*. 2003, **22**(27), 4212-4220.
- [68] BROWN, M. a J. COOPER. Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1996, **1287**(2-3), 121-149.
- [69] ROUS, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1911, **13**(4), 397-411.
- [70] STEHELIN, D., H. VARMUS, J. BISHOP a P. VOGT. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 1976, **260**(5547), 170-173.
- [71] ROSKOSKI, R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*. 2015, **94**, 9-25.
- [72] PATWARDHAN, P. a M. RESH. Myristoylation and Membrane Binding Regulate c-Src Stability and Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 2010, **30**(17), 4094-4107.
- [73] SCHULTZ, A., L. HENDERSON, S. OROSZLAN, E. GARBER a H. HANAFUSA. Amino terminal myristylation of the protein kinase p60src, a retroviral transforming protein. *Science*. 1985, **227**(4685), 427-429.
- [74] ADZHUBEI, A., M. STERNBERG a A. MAKAROV. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *Journal of Molecular Biology*. 2013, **425**(12), 2100-2132.
- [75] LIU, B., B. ENGELMANN a P. NASH. The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. *FEBS Letters*. 2012, **586**(17), 2597-2605.
- [76] WAKSMAN, G. a J. KURIYAN. Structure and specificity of the SH2 domain. *Cell*. 2004, **116**(2), 45-51.
- [77] TAYLOR, S., M. KESHWANI, J. STEICHEN a A. KORNEV. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012, **367**(1602), 2517-2528.
- [78] KNIGHTON, D., J. ZHENG, L. TEN EYCK, V. ASHFORD, N. XUONG, S. TAYLOR a J. SOWADSKI. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 1991, **253**(5018), 407-414.
- [79] HUSE, M. a J. KURIYAN. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell*. 2002, **109**(3), 275-282.
- [80] XU, W., A. DOSHI, M. LEI, M. ECK a S. HARRISON. Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism. *Molecular Cell*. 1999, **3**(5), 629-638.

- [81] ZHENG, X.-M., R. RESNICK a D. SHALLOWAY. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTP $\alpha$ . *The EMBO Journal*. 2000, **19**(5), 964-978.
- [82] OKADA, M. Regulation of the Src Family Kinases by Csk. *International Journal of Biological Sciences*. 2012, **8**(10), 1385-1397.
- [83] HARRISON, S. Variation on an Src-like Theme. *Cell*. 2003, **112**(6), 737-740.
- [84] COOPER, J., K. GOULD, C. CARTWRIGHT a T. HUNTER. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science*. 1986, **231**(4744), 1431-1434.
- [85] ROSKOSKI, R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, **331**(1), 1-14.
- [86] SUN, G., L. RAMDAS, W. WANG, J. VINCI, J. MCMURRAY a R. BUDDE. Effect of Autophosphorylation on the Catalytic and Regulatory Properties of Protein Tyrosine Kinase Src. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002, **397**(1), 11-17.
- [87] PALMER, A., M. ZIMMER, K. ERDMANN, V. EULENBURG, A. PORTHIN, R. HEUMANN, U. DEUTSCH a R. KLEIN. EphrinB Phosphorylation and Reverse Signaling. *Molecular Cell*. 2002, **9**(4), 725-737.
- [88] OKADA, M. a H. NAKAGAWA. A protein tyrosine kinase involved in regulation of p60c-src function. *Journal of Biological Chemistry*. 1989, **264**(35), 20886-20893.
- [89] ARMSTRONG, R., H. KONDO, J. GRANOT, E. KAISER a A. MILDVAN. Magnetic resonance and kinetic studies of the manganese(II) ion and substrate complexes of the catalytic subunit of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. *Biochemistry*. 2002, **18**(7), 1230-1238.
- [90] JACOBSEN, D., Z.-Q. BAO, P. O'BRIEN, C. BROOKS a M. YOUNG. Price To Be Paid for Two-Metal Catalysis: Magnesium Ions That Accelerate Chemistry Unavoidably Limit Product Release from a Protein Kinase. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, **134**(37), 15357-15370.
- [91] PARAST, C., B. MROCZKOWSKI, C. PINKO, S. MISIALEK, G. KHAMBATTA a K. APPELT. Characterization and Kinetic Mechanism of Catalytic Domain of Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase (VEGFR2 TK), a Key Enzyme in Angiogenesis. *Biochemistry*. 1998, **37**(47), 16788-16801.
- [92] BASTIDAS, A., M. DEAL, J. STEICHEN, Y. GUO, J. WU a S. TAYLOR. Phosphoryl Transfer by Protein Kinase A Is Captured in a Crystal Lattice. *Journal of the American Chemical Society*. 2013, **135**(12), 4788-4798.
- [93] SEFTON, B.M. a T. HUNTER. From c-src to v-src, or the case of the missing C terminus. *Cancer Surveys*. 1986, **5**(2), 159-172.
- [94] YEATMAN, T. A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer*. 2004, **4**(6), 470-480.
- [95] BJORGE, J., A. JAKYMIW a D. FUJITA. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*. 2000, **19**(49), 5620-5635.
- [96] MITRA, S. a D. SCHLAEPFER. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006, **18**(5), 516-523.
- [97] GUARINO, M. Src signaling in cancer invasion. *Journal of Cellular Physiology*. 2009, **223**(1), 14-26.
- [98] ALESHIN, A. a R. FINN. SRC: A Century of Science Brought to the Clinic. *Neoplasia*. 2010, **12**(8), 599-607.



- [99] PRATHAPAM, T., S. TEGEN, T. OSKARSSON, A. TRUMPP a G. MARTIN. Activated Src abrogates the Myc requirement for the G0/G1 transition but not for the G1/S transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(8), 2695-2700.
- [100] ROCHE, S., S. FUMAGALLI a S. COURTNEIDGE. Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science*. 1995, **269**(5230), 1567-1569.
- [101] KANDA, S., Y. MIYATA, H. KANETAKE a T. SMITHGALL. Non-receptor protein-tyrosine kinases as molecular targets for antiangiogenic therapy. *International Journal of Molecular Medicine*. 2007, **20**(1), 113-121.
- [102] LOWE, C., T. YONEDA, B. BOYCE, H. CHEN, G. MUNDY a P. SORIANO. Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, **90**(10), 4485-4489.
- [103] MIYAZAKI, T., S. TANAKA, A. SANJAY a R. BARON. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Modern Rheumatology*. 2006, **16**(2), 68-74.
- [104] PAGE, T., M. SMOLINSKA, J. GILLESPIE, A. URBANIAK a B. FOXWELL. Tyrosine Kinases and Inflammatory Signalling. *Current Molecular Medicine*. 2009, **9**(1), 69-85.
- [105] TANG, C.-H., C.-J. HSU, W.-H. YANG a Y.-C. FONG. Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKC $\delta$  and c-Src dependent pathways. *Biochemical Pharmacology*. 2010, **79**(11), 1648-1657.
- [106] YAMASHITA, M., S. CHATTOPADHYAY, V. FENSTERL, Y. ZHANG a G. SEN. A TRIF-Independent Branch of TLR3 Signaling. *The Journal of Immunology*. 2012, **188**(6), 2825-2833.
- [107] CHEN, Y.-J., M.-Y. HSIEH, M. CHANG, H.-C. CHEN, M.-S. JAN, M.-C. MAA a T.-H. LEU. Eps8 Protein Facilitates Phagocytosis by Increasing TLR4-MyD88 Protein Interaction in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, **287**(22), 18806-18819.
- [108] HEBERT-CHATELAIN, E. Src kinases are important regulators of mitochondrial functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013, **45**(1), 90-98.
- [109] LOHMAN, A., N. WEILINGER, S. SANTOS, J. BIALECKI, A. WERNER, C. ANDERSON a R. THOMPSON. Regulation of pannexin channels in the central nervous system by Src family kinases. *Neuroscience Letters*. 2019, **695**, 65-70.
- [110] VOGT, P. Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nature Reviews Cancer*. 2012, **12**(9), 639-648.
- [111] HUNTER, T. a B. SEFTON. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980, **77**(3), 1311-1315.
- [112] SCHALLER, M., A. BOUTON, D. FLYNN a J. PARSONS. Identification and Characterization of Novel Substrates for Protein Tyrosine Kinases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1993, **44**, 205-227.
- [113] KAMPS, M.P. a B.M. SEFTON. Identification of multiple novel polypeptide substrates of the v-src, v-yes, v-fps, v-ros, and v-erb-B oncogenic tyrosine protein kinases utilizing antisera against phosphotyrosine. *Oncogene*. 1988, **2**(4), 305-315.

- [114] KANNER, S., A. REYNOLDS a J.T. PARSONS. Immunoaffinity purification of tyrosine-phosphorylated cellular proteins. *Journal of Immunological Methods*. 1989, **120**(1), 115-124.
- [115] REYNOLDS, A., S. KANNER, A. BOUTON, M. SCHALLER, S. WEED, D. FLYNN a J. PARSONS. SRChing for the substrates of Src. *Oncogene*. 2014, **33**(37), 4537-4547.
- [116] WU, H. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *The Journal of Cell Biology*. 1993, **120**(6), 1417-1426.
- [117] ZHAN, X., X. HU, R. FRIESEL a T. MACIAG. Long term growth factor exposure and differential tyrosine phosphorylation are required for DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, **268**(13), 9611-9620.
- [118] NOJIMA, Y., N. MORINO, T. MIMURA et al. Integrin-mediated Cell Adhesion Promotes Tyrosine Phosphorylation of p130, a Src Homology 3-containing Molecule Having Multiple Src Homology 2-binding Motifs. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, **270**(25), 15398-15402.
- [119] REYNOLDS, A.B., D.J. ROESEL, S.B. KANNER a J.T. PARSONS. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Molecular and Cell Biology*. 1989, **9**(2), 629-638.
- [120] CHENG, H.C., H. NISHIO, O. HATASE, S. RALPH a J.H. WANG. A synthetic peptide derived from p34cdc2 is a specific and efficient substrate of src-family tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, **267**(13), 9248-9256.
- [121] KAMATH, J.R., R. LIU, A.M. ENSTROM, Q. LOU a K.S. LAM. Development and characterization of potent and specific peptide inhibitors of p60c-src protein tyrosine kinase using pseudosubstrate-based inhibitor design approach. *Journal of Peptide Research*. 2003, **62**(6), 260-268.
- [122] JOHNSON, D., P. AKAMINE, E. RADZIO-ANDZELM a S. TAYLOR. Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chemical Reviews*. 2001, **101**(8), 2243-2270.
- [123] ROSKOSKI, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 2012, **66**(2), 105-143.
- [124] GETLIK, M., C. GRÜTTER, J. SIMARD, S. KLÜTER, M. RABILLER, H. RODE, A. ROBUBI a D. RAUH. Hybrid Compound Design To Overcome the Gatekeeper T338M Mutation in cSrc. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, **52**(13), 3915-3926.
- [125] DAUD, A., S. KRISHNAMURTHI, M. SALEH et al. Phase I Study of Bosutinib, a Src/Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, Administered to Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2012, **18**(4), 1092-1100.
- [126] KEATING, G. Dasatinib : A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph+ Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*. 2017, **77**(1), 85-96.
- [127] CORTES, J.E., D.-W. KIM, J. PINILLA-IBARZ et al. A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *New England Journal of Medicine*. 2013, **369**(19), 1783-1796.
- [128] PULS, L., M. EADENS a W. MESSERSMITH. Current Status of Src Inhibitors in Solid Tumor Malignancies. *The Oncologist*. 2011, **16**(5), 566-578.

- [129] SIM, M. a M. COHEN. The discovery and development of vandetanib for the treatment of thyroid cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2013, **9**(1), 105-114.
- [130] NASROLAHI SHIRAZI, A., R. TIWARI, A. BROWN, D. MANDAL, G. SUN a K. PARANG. Cyclic peptides containing tryptophan and arginine as Src kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, **23**(11), 3230-3234.
- [131] HOMA EI, A., R. SARIRI, F. VIANELLO a R. STEVANATO. Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*. 2013, **6**(4), 185-205.
- [132] NAGEL, B., H. DELLWEG a L. GIERASCH. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry*. 1992, **64**(1), 143-168.
- [133] BURTIS, C. a T. GEARY. Glossary of bioanalytical nomenclature - Part 1: General terminology, body fluids, enzymology, immunology (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*. 1994, **66**(12), 2587-2604.
- [134] DEERE, J., E. MAGNER, J. WALL a B. HODNETT. Mechanistic and Structural Features of Protein Adsorption onto Mesoporous Silicates. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, **106**(29), 7340-7347.
- [135] SUBBA RAO, C., T. SATHISH, P. RAVICHANDRA a R.S. PRAKASHAM. Characterization of thermo and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*. 2009, **44**(3), 262-268.
- [136] OVSEJEVI, K., C. MANTA a F. BATISTA-VIERA. Reversible Covalent Immobilization of Enzymes via Disulfide Bonds. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2013, **1051**, 89-116.
- [137] HUTSELL, S., R. KIMPLE, D. SIDEROVSKI, F. WILLARD a A. KIMPLE. High-Affinity Immobilization of Proteins Using Biotin- and GST-Based Coupling Strategies. *Surface Plasmon Resonance*. 2010, **627**, 75-90.
- [138] CHATTOPADHAYA, S., F. ABU BAKAR a S. YAO. Expanding the Chemical Biologists Tool Kit: Chemical Labelling Strategies and Its Applications. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**(34), 4527-4543.
- [139] CANG-RONG, J. a G. PASTORIN. The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. *Nanotechnology*. 2009, **20**(25), 255102.
- [140] HAKALA, T., T. LIITIÄ a A. SUURNÄKKI. Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **93**(1), 102-108.
- [141] SOLDATKIN, O.O., I.S. KUCHERENKO, V.M. PYESHKOVA, A.L. KUKLA, N. JAFFREZIC-RENAULT, A.V. EL'SKAYA, S.V. DZYADEVYCH a A.P. SOLDATKIN. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions. *Bioelectrochemistry*. 2012, **83**, 25-30.
- [142] APETREI, I.M., M.L. RODRIGUEZ-MENDEZ, C. APETREI a J.A. DE SAJA. Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt(II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, **177**, 138-144.
- [143] SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2007, **349**(8-9), 1289-1307.

- [144] SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*. 2007, **35**(6), 1583-1587.
- [145] LOURENÇO, N., H. PINHEIRO a M. BAKKER. Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2003, **344**(8), 815-835.
- [146] TRIPATHI, A., H. SAMI, S. JAIN, M. VILORIA-COLS, N. ZHURAVLEVA, G. NILSSON, H. JUNGVID a A. KUMAR. Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, **47**(1-2), 44-51.
- [147] HUDSON, S., J. COONEY a E. MAGNER. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008, **47**(45), 8582-8594.
- [148] DAVID, A., N. WANG, V. YANG a A. YANG. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of Biotechnology*. 2006, **125**(3), 395-407.
- [149] KATCHALSKI-KATZIR, E. a D. KRAEMER. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000, **10**(1-3), 157-176.
- [150] CHOW, D., M. JOHANNES, W.-K. LEE, R. CLARK, S. ZAUSCHER a A. CHILKOTI. Nanofabrication with biomolecules. *Materials Today*. 2005, **8**(12), 30-39.
- [151] DANIEL, M.C. a D. ASTRUC. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*. 2004, **104**(1), 293-346.
- [152] SELVAN, S., T. HAYAKAWA, M. NOGAMI, Y. KOBAYASHI, L. LIZ-MARZÁN, Y. HAMANAKA a A. NAKAMURA. Sol-Gel Derived Gold Nanoclusters in Silica Glass Possessing Large Optical Nonlinearities. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, **106**(39), 10157-10162.
- [153] KLUCHOVA, K., R. ZBORIL, J. TUCEK et al. Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomaterials*. 2009, **30**(15), 2855-2863.
- [154] SIMBERG, D., T. DUZA, J. PARK et al. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(3), 932-936.
- [155] CASTRO, L., F. SILVA, A. CARMONA-RIBEIRO, M. KAPPL a D. PETRI. Immobilization of Hexokinase onto Chitosan Decorated Particles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, **111**(29), 8520-8526.
- [156] NARWAL, V. a C.S. PUNDIR. Fabrication of glycerol biosensor based on co-immobilization of enzyme nanoparticles onto pencil graphite electrode. *Analytical Biochemistry*. 2018, **555**, 94-103.
- [157] KUCHERENKO, I.S., D. KUCHERENKO, O.O. SOLDATKIN, F. LAGARDE, S.V. DZYADEVYCH a A.P. SOLDATKIN. A novel conductometric biosensor based on hexokinase for determination of adenosine triphosphate. *Talanta*. 2016, **150**, 469-475.

- [158] CHAUHAN, N., J. NARANG a C.S. PUNDIR. Covalent immobilization of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase & horseradish peroxidase onto plasticized polyvinyl chloride (PVC) strip & its application in serum triglyceride determination. *Indian Journal of Medical Research*. 2014, **139**(4), 603-9.
- [159] HROMÁDKOVÁ, L., R. KUPČÍK, M. VAJRYCHOVÁ et al. Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *The Analyst*. 2018, **143**(2), 466-474.
- [160] NISHI, H., K. HASHIMOTO a A.R. PANCHENKO. Phosphorylation in Protein-Protein Binding: Effect on Stability and Function. *Structure*. 2011, **19**(12), 1807-1815.
- [161] HALDA, P. Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy. *Chemické Listy*. 2005, **99**, 922929.
- [162] PEARLMAN, S.M., Z. SERBER a J.E. FERRELL. A Mechanism for the Evolution of Phosphorylation Sites. *Cell*. 2011, **147**(4), 934-946.
- [163] CONDINA, M., M. KLINGLER-HOFFMANN a P. HOFFMANN. Tyrosine Phosphorylation Enrichment and Subsequent Analysis by MALDI-TOF/TOF MS/MS and LC-ESI-IT-MS/MS. *Current Protocols in Protein Science*. 2010, **62**(1), 13111-131126.
- [164] JOHNSON, H. a F. WHITE. Toward quantitative phosphotyrosine profiling in vivo. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2012, **23**(8), 854-862.
- [165] OVERTON, T. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014, **19**(5), 590-601.
- [166] ARENDT, T., J. STIELER a M. HOLZER. Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*. 2016, **126**(3), 238-292.
- [167] HANGER, D., B. ANDERTON a W. NOBLE. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2009, **15**(3), 112-119.
- [168] BUÉE, L., T. BUSSIÈRE, V. BUÉE-SCHERRER, A. DELACOURTE a P. HOF. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 2000, **33**(1), 95-130.
- [169] BENIAC, D., M. LUCKEVICH, G. CZARNOTA, T. TOMPKINS, R. RIDSDALE, F. OTTENSMEYER, M. MOSCARELLO a G. HARAUZ. Three-dimensional Structure of Myelin Basic Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(7), 4261-4268.
- [170] BOGGS, J. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006, **63**(17), 1945-1961.
- [171] BOGGS, J., P. YIP, G. RANGARAJ a E. JO. Effect of Posttranslational Modifications to Myelin Basic Protein on Its Ability to Aggregate Acidic Lipid Vesicles. *Biochemistry*. 1997, **36**(16), 5065-5071.
- [172] RIDSDALE, R., D. BENIAC, T. TOMPKINS, M. MOSCARELLO a G. HARAUZ. Three-dimensional Structure of Myelin Basic Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(7), 4269-4275.
- [173] CHOU, F.C., C. CHOU, R. SHAPIRA a R.F. KIBLER. Basis of microheterogeneity of myelin basic protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1976, **251**(9), 2671-2679.

- [174] ATKINS, C., M. YON, N. GROOME a J. SWEATT. Regulation of Myelin Basic Protein Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase During Increased Action Potential Firing in the Hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 1999, **73**(3), 1090-1097.
- [175] KIM, M., D.-S. SHIN, J. KIM a Y.-S. LEE. Substrate screening of protein kinases: Detection methods and combinatorial peptide libraries. *Biopolymers*. 2010, **94**(6), 753-762.
- [176] HSIN-YI, W. a L. PAO-CHI. Analysis of Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry. *Chang Gung Medical Journal*. 2008, **31**, 217-227.
- [177] LIZCANO, J., M. DEAK, N. MORRICE et al. Molecular Basis for the Substrate Specificity of NIMA-related Kinase-6 (NEK6). *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(31), 27839-27849.
- [178] ROSS, A., D. BALTIMORE a H. EISEN. Phosphotyrosine-containing proteins isolated by affinity chromatography with antibodies to a synthetic hapten. *Nature*. 1981, **294**(5842), 654-656.
- [179] JCZERNIK, A., J.-A. GIRAULT, A. NAIRN, J. CHEN, G. SNYDER, J. KEBABIAN a P. GREENGARD. Production of phosphorylation state-specific antibodies. *Protein Phosphorylation Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, and Protein Phosphatases*. 1991, **201**, 264-283.
- [180] ILIUK, A. a W. TAO. Universal Non-Antibody Detection of Protein Phosphorylation Using pIMAGO. *Protocols in Chemical Biology*. 2009, **7**(1), 17-25.
- [181] KINOSHITA, E., E. KINOSHITA-KIKUTA, K. TAKIYAMA a T. KOIKE. Phosphate-binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006, **5**(4), 749-757.
- [182] LARSEN, M., T. THINGHOLM, O. JENSEN, P. ROEPSTORFF a T. JØRGENSEN. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005, **4**(7), 873-886.
- [183] GARCIA, B., J. SHABANOWITZ a D. HUNT. Analysis of protein phosphorylation by mass spectrometry. *Methods*. 2005, **35**(3), 256-264.
- [184] DUNN, J., G. REID a M. BRUENING. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2009, **29**(1), 29-54.
- [185] LIAO, P.C., J. LEYKAM, P.C. ANDREWS, D.A. GAGE a J. ALLISON. An Approach to Locate Phosphorylation Sites in a Phosphoprotein: Mass Mapping by Combining Specific Enzymatic Degradation with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 1994, **219**(1), 9-20.
- [186] CARR, S., M. HUDDLESTON a R. ANNAN. Selective Detection and Sequencing of Phosphopeptides at the Femtomole Level by Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 1996, **239**(2), 180-192.
- [187] GRUHLER, A., J. OLSEN, S. MOHAMMED, P. MORTENSEN, N. FÆRGEMAN, M. MANN a O. JENSEN. Quantitative Phosphoproteomics Applied to the Yeast Pheromone Signaling Pathway. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005, **4**(3), 310-327.
- [188] BELTRAN, L. a P. CUTILLAS. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids*. 2012, **43**(3), 1009-1024.

- [189] DUNN, J., G. REID a M. BRUENING. Techniques for Phosphopeptide Enrichment Prior to Analysis by Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010, **29**(1), 29-54.
- [190] GABERC-POREKAR, V. a V. MENART. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001, **49**(1-3), 335-360.
- [191] PORATH, J., J. CARLSSON, I. OLSSON a G. BELFRAGE. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 1975, **258**(5536), 598-599.
- [192] BLACKWELL, J.A. a P.W. CARR. Study of the fluoride adsorption characteristics of porous microparticulate zirconium oxide. *Journal of Chromatography A*. 1991, **549**, 43-57.
- [193] HAN, G., M. YE a H. ZOU. Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis. *The Analyst*. 2008, **133**(9), 1128–1138.
- [194] MCNULTY, D. a R. ANNAN. Hydrophilic Interaction Chromatography Reduces the Complexity of the Phosphoproteome and Improves Global Phosphopeptide Isolation and Detection. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008, **7**(5), 971-980.
- [195] KINOSHITA, E., A. YAMADA, H. TAKEDA, E. KINOSHITA-KIKUTA a T. KOIKE. Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *Journal of Separation Science*. 2005, **28**(2), 155-162.
- [196] XIA, Q., D. CHENG, D. DUONG, M. GEARING, J. LAH, A. LEVEY a J. PENG. Phosphoproteomic Analysis of Human Brain by Calcium Phosphate Precipitation and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2008, **7**(7), 2845-2851.
- [197] KEMP, B., E. BENJAMINI, D. GRAVES a E. KREBS. Role of Multiple Basic Residues in Determining Substrate-Specificity of Cyclic Amp-Dependent Protein-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1977, **252**(14), 4888-4894.
- [198] BOWLEY, E., E. MULVIHILL, J.C. HOWARD, B.J. PAK, B.S. GAN, D.B. O'GORMAN. A novel mass spectrometry-based assay for GSK-3 $\beta$  activity. *BMC Biochemistry* 2005, 6:29.
- [199] ŠŤOVÍČKOVÁ, E. *Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními a imobilizovanými kinázami*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.