

Electrochemical Detection of Enzyme Activity of Kinases Immobilized on Magnetic Particles (Elektrochemická Detekce Enzymové Aktivity Kináz Imobilizovaných na Magnetické Částice)

Lucie Korecká, Marcela Slováková, Michaela Šislerová and Zuzana Bílková
Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail:
lucie.korecka@upce.cz

Abstract

Protein kinases are enzymes providing one of the most important protein post-translational modifications, phosphorylation. Phosphorylation regulates not only physiological cell processes but also is involved in such pathological reactions associated with many diseases. Therefore, it is important to monitor the activity of kinase and inhibitors which is highlighted in the development of therapeutic targets. Protein kinase A was immobilized covalently on magnetic particles. For determination of enzyme activity, low-molecular-mass substrate Kemtide has been phosphorylated in presence of adenosine-thio triphosphate (ATP-S). Thiophosphorylated peptide subsequently spontaneously reacted with colloidal gold nanoparticles (AuNPs) followed by square-wave cathodic stripping voltammetric analysis on screen-printed carbon electrodes. Generated signal of $[\text{AuCl}_4]^-$ corresponds to the level of phosphorylation and thus the activity of the enzyme.

Keywords: Protein kinase A, Enzyme activity, Square-wave cathodic stripping voltammetry, Phosphorylation, Screen-printed electrode

Úvod

Fosforylace proteinů je jednou z nejčastějších a zároveň nejdůležitějších post-translačních modifikací proteinů, představující základ nejen řady buněčných procesů, ale také mnoha patologických stavů^{1,2}. Během fosforylace je fosfátová skupina molekuly ATP, lokalizovaná v poloze γ , přenesena na specifické serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky proteinu³. Fosforylace proteinů je zajišťována enzymaticky protein kinázami⁴. Abnormální fosforylace a nadměrná exprese kináz je spojována s rozvojem některých onemocnění, jako rakovina, diabetes, Alzheimerova choroba⁵, či v poslední době také COVID-19⁶.

Nejen pro diagnostiku onemocnění a s tím souvisejícím vývojem nových léčiv založených na inhibici abnormální fosforylace je důležité monitorování enzymové aktivity². Metody, které jsou běžně využívány pro stanovení aktivity kináz, zahrnují inkorporaci radioaktivně nebo fluorescenčně značeného ATP do molekuly proteinových nebo peptidových substrátů⁷, hmotnostní spektrometrii^{8,9}, fluorescenční imunoanalýzu¹⁰, průtokovou cytometrii¹¹ nebo povrchovou plasmonovou rezonanci s využitím fosfo-specifických protilátek¹². Přes vysokou citlivost je hlavní nevýhodou těchto metod časová a přístrojová náročnost. V literatuře již byly popsány možnosti elektrochemického stanovení kinázové aktivity s využitím imobilizace inhibitorů⁶, receptorů¹ nebo proteinových substrátů² na povrch elektrody. Elektrochemické metody jsou levné, časově nenáročné, robustní, miniaturizovatelné a reprodukovatelné.

Zejména v oblasti vývoje léčiv je výhodná imobilizace enzymu na magnetické částice. Výhodou imobilizovaných enzymů je dlouhodobá stabilita a možnost opakovaného použití a snadná kontrolovatelnost enzymatické reakce⁹. Pro imobilizaci je důležité stanovit aktivitu enzymu, aby bylo ověřeno, že proces imobilizace negativně neovlivnil jeho schopnost

katalyzovat fosforylační reakci.

Protein kináza A (PKA) byla kovalentně imobilizována na magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami karbodiimidovou metodou. Pro ověření aktivity enzymu byl využit nízkomolekulární substrát, který byl fosforylován v přítomnosti adenosin-thio trifosfátu (ATP-S), který spontánně interaguje s nanočásticemi koloidního zlata přes thiolové skupiny ATP-S. Ty jsou analyzovány katodickou rozpouštěcí square-wave voltametrie na tištěných uhlíkových elektrodách (SPCE). Výsledný signál je úměrný stupni fosforylace a tedy aktivitě imobilizované kinázy.

Experimentální část

Chemikálie

Proteinkináza A (PKA) myši (rekombinantní, 15000000 U/mg, Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo), biotin-Kemptide (biotin-LRRASLG, Abbexa Ltd, Cambridge, UK), tetralitná sůl Adenosin 5'-[γ -thio]trifosfátu (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo), Sera-Mag Speed Beads (0,816 μ m, -COOH, Metachem Diagnostics Ltd, Piddington Northampton, UK), Dynabeads™ MyOnes™ Streptavidin C1 (1 μ m, Thermo Fisher Scientific, USA), koloidní zlaté nanočástice (10 nm, stabilizované v citrátovém pufru), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid, N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sigma-Aldrich, Kalifornie, USA), ostatní chemikálie čistoty p.a. (Penta, Chrudim, ČR).

Přístroje a pomůcky

Pro elektrochemická měření byl používán kompaktní potenciostat PalmSens2 se software PStace5 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko). Měření probíhalo na tištěných tříelektrodových senzorech s uhlíkovou pracovní, Ag/AgCl referentní a uhlíkovou pomocnou elektrodou (SPCE) (C110 Metrohm, Herrisau, Švýcarsko; OHT-000, Orion HiTech, Španělsko).

Imobilizace PKA na magnetické částice a stanovení enzymové aktivity

Na 1,2 mg magnetických částic bylo imobilizováno 6 μ g PKA, reakční objem byl 1,2 ml. Částice byly promyty 5x 50 mM MES pufrům pH 6,0. Pro aktivaci bylo přidáno 9 mg EDAC a 1,5 mg sulfo-NHS v MES pufru. Po inkubaci 30 min při laboratorní teplotě byl odstraněn supernatant a k magnetickým částicím byl přidán roztok PKA v MES pufru. Takto připravená směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Po imobilizaci byly částice promyty 5x MES pufrům a 5x 40 mM HEPES pufrům pH 7,2. Nosič s imobilizovanou PKA je skladován v MES pufru 6,0 při 4 °C. Pro stanovení aktivity byl nosič 2x promyt HEPES pufrům a bylo odebráno takové množství magnetických částic s imobilizovaným enzymem, které odpovídalo 2 μ g PKA. K částicím bylo přidáno 94 μ l reakčního pufru (40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl₂, pH 7,2), 10 μ g substrátu biotin-Kemptid a 5 μ l ATP-S (0,5 mM v reakční směsi). Reakční směs byla inkubována 5 h při 30 °C na rotátoru. Fosforylovaný substrát byl izolován od nezareagovaných složek pomocí magnetických částic Dynabeads™ MyOnes™ Streptavidin C1 (0,3 mg, v PBS pufru pH 7,4, 20 min inkubace na rotátoru). Po inkubaci byl supernatant odstraněn a k magnetickým částicím bylo přidáno 20 μ l 10 nm AuNPs a 80 μ l citranového pufru pH 3,0. Směs byla inkubována 20 min. Po inkubaci byly částice promyty 1x citranovým pufrům a bylo přidáno 100 μ l 0,1 M HCl a následovala inkubace 3 minuty na rotátoru. Supernatant byl analyzován pomocí SWCSV.

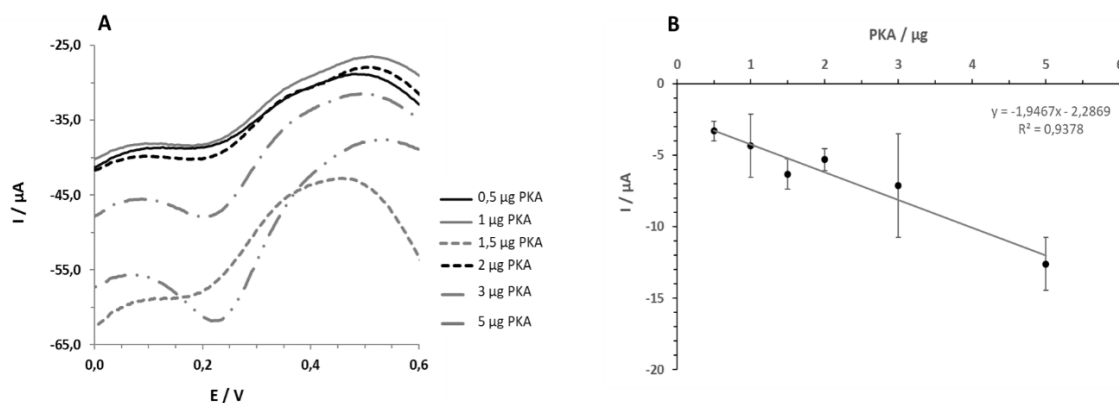
Podmínky elektrochemické detekce

Byla měřena proudová odezva Au(III) iontů po kyselé disoluci AuNPs pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV) za následujících podmínek: E_{cond} 0,15 V po dobu 120 s, E_{dep} 1,2 V po 180 s, rozsah potenciálu od 1,2 V do 0 V, E_{step} 0,003 V, amplituda 0,02805 V, frekvence 25 Hz.

Výsledky a diskuse

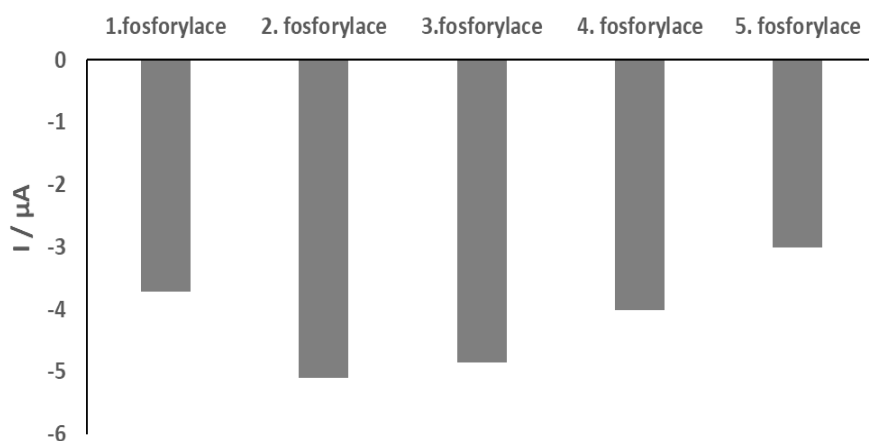
Cílem práce bylo zavést metodu elektrochemického stanovení aktivity solubilní a imobilizované proteinkinázy A (PKA) jako jednoduchou a rychlou metodu jako alternativu k dosud využívané hmotnostní spektrometrii (MALDI-LTQOrbitrap/MS). Při MS analýze je ve spektru pozorován posun m/z v důsledku přenosu fosfátové skupiny během fosforylace nízkomolekulárního substrátu Kemptide (LRRASLG). Tato metoda poskytuje informaci o proběhlé fosforylaci, nicméně neposkytuje informace, které charakterizují imobilizovaný enzym z pohledu změny enzymové aktivity po imobilizaci či kinetických parametrů imobilizované kinázy. Pro elektrochemické stanovení bylo třeba do reakce zavést elektroaktivní složku, která poskytovala výsledný signál, který koreluje s množstvím PKA v reakční směsi a její aktivitou. Podle literatury mohou být využity ferrocenem značené substráty¹, redoxní mediátory⁶ nebo elektroaktivní zlaté nanočástice⁴. Nanočástice koloidního zlata byly zvoleny v této práci pro elektrochemické stanovení aktivity solubilní a imobilizované PKA. Biosenzor využíval vlastnosti nanočástic koloidního zlata spontánně reagovat vazbou Au-S s thiolovými funkčními skupinami. Ty poskytoval adenosin 5'-[γ -thio]trifosfát (ATP-S), který byl přidán jako ko-substrát pro fosforylační reakci. Jako specifický nízkomolekulární substrát pro PKA byl navíc použit biotinylovaný Kemptide (biotin- LRRASLG). Ten byl použit s ohledem na nutnost oddělení nezreagovaných složek před square-wave voltametrickou analýzou.

Účinnost fosforylace solubilní kinázou a stanovení fosforylovaných peptidů pomocí MS byla již potvrzena v rámci naší předešlé práce [9]. Vzhledem k záměně reagentů potřebných pro elektrochemickou detekci, byla v prvních experimentech porovnána účinnost fosforylace biotinylovaného a nebiotinylovaného substrátu a v přítomnosti ATP či ATP-S a byly testovány reakční časy od 1 do 24 hodin. MALDI-LTQOrbitrap/MS analýza potvrdila téměř 90% účinnost fosforylace obou substrátů, pouze v přítomnosti ATP-S bylo nezbytné prodloužit reakční čas na 3 hodiny, zatímco pro ATP byla dostačující 1 hodina. Pro imobilizaci PKA kinázy byly testovány dva typy magnetických částic, Dynabeads© MyOne™ o velikosti částic 1 μm a Sera-Mag Speed Beads o velikosti 0,816 μm , které vykazovaly vyšší účinnost imobilizace PKA. Imobilizace byla provedena standardní dvoukrokovou karbodiimidovou metodou a bylo optimalizováno množství enzymu, které bylo použito pro vazbu. Jako optimální množství bylo stanoveno 6 μg PKA/1,2 mg částic. Pro ověření aktivity byl pro fosforylaci použit substrát biotin-kemptide v přítomnosti ATP-S. Fosforylace probíhala v reakčním prostředí 40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl_2 (pH 7,2), po dobu 5 hodin při 30°C. Pro kalibrační závislost byla použita solubilní PKA kináza v rozmezí 0,5 – 5 μg . Množství navázaného enzymu bylo vypočítáno ze získané kalibrační závislosti (viz obr. 1) a odpovídalo 1,5 μg PKA.



Obr. 1. Kalibrační řada PKA. **A** - SWCSV voltamogram, **B** - kalibrační závislost proudové odezvy na koncentraci PKA, $n=3$, použité elektrody - SPCE.

Pro sestavení kalibrační závislosti i stanovení množství imobilizované PKA byla použita metoda elektrochemické detekce. Pro její zavedení byly nejprve vytipovány nejvhodnější nanočástice koloidního zlata (AuNPs), byly testovány částice o velikostech 5, 10, 20 a 50 nm. Měření probíhalo pomocí SWCSV na uhlíkových tištěných elektrodách a nejvyšší proudové odezvy byly dosaženy při použití AuNPs o velikosti 10 nm, které byly následně používány ve všech experimentech. Pro oddělení nezreagovaných složek po fosforylaci, které by mohly ovlivňovat výsledný signál, bylo využito biotinylace substrátu použitého pro fosforylaci. Byly zkoušeny dva způsoby oddělení, a to s využitím komerčních tištěných uhlíkových elektrod s pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (DRP-11STR, Metrohm, Švýcarsko) a streptavidinem modifikovaných magnetických částic (Dynabeads™ MyOnes™ Streptavidin C1, Thermofisher Scientific, USA). Tištěné elektrody vykazovaly velice nízkou účinnost vazby biotinylovaného substrátu a z dalších experimentů byly vyřazeny. Naopak izolace pomocí streptavidinem modifikovaných částic byla účinná a reprodukovatelná. Reakční směs po fosforylaci byla s částicemi inkubována po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. V posledním kroku byly přidány detekční zlaté nanočástice, po promytí následovala disoluce v kyselém prostředí 0,1 M HCl a elektrochemická detekce square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na uhlíkových tištěných elektrodách (OHT-000, Orion HiTechnologies, Španělsko).



Obr. 2. Operační stabilita imobilizované PKA. SWCSV analýza na tištěných uhlíkových elektrodách (SPCE).

Magnetický nosič s imobilizovanou PKA kinázou byl charakterizován z pohledu operační stability, kdy bylo prokázáno, že nosič lze použít minimálně 4x bez výraznější ztráty enzymové aktivity (viz obr. 2).

Závěr

Byl zavedena metoda elektrochemického stanovení aktivity solubilní a imobilizované PKA kinázy pomocí square-wave voltametrie s využitím tištěných uhlíkových elektrod jako alternativa k náročnější MS analýze. Pomocí elektrochemické detekce byla pro imobilizovanou PKA stanovena operační stabilita, v současné době jsou sledovány kinetické parametry imobilizované PKA.

Acknowledgements

The OP RDE project „Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms“, reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421 and the project of the Czech Science Foundation (No. 20-01589S) are gratefully acknowledged.

References

1. Shin I-S., Chand R., Lee S. W., Rhee H-W., Kim Y-S., Hong J-I.: *Anal. Chem.* 86 (2014) 10992.
2. Kerman K., Song H., Duncan J. S., Litchfield D. W., Kraatz H-B.: *Anal. Chem.* 80 (2008) 9395
3. Kerman K., Kraatz H-B.: *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1484.
4. Kerman K., Kraatz H-B.: *Chem. Commun.* (2007) 5019.
5. Ou L., Chen Y., Xia N.: *Int. J. Electrochem. Sci* 16 (2021) ID210740
6. Cho H., Lee Ch-S., Kim T. H.: *Biomedicines* 9 (2021) 423.
7. Hastie C. J., Mclauchlan H. J., Cohen P.: *Nat. Protoc.* 1 (2006) 968.
8. Deng Z., Ye M., Bian Y., Liu Z., Liu F., Wang C., Qin H., Zou H.: *Chem. Commun.* 50 (2014) 13960.
9. Hromadkova L., Kupcik R., Vajrychova M., Prikryl P., Charvatova A., Jankovicova B., Ripova D., Bilkova Z., Slovakova M.: *Analyst* 143 (2018) 466
10. Jia C., Bai J., Liu Z., Gao S., Han Y., Yan H.: *Anal. Chim. Acta* 1128 (2020) 99.
11. Ren W., Liu C., Lian S., Li Z.: *Anal. Chem.* 85 (2013) 10956.
12. Sun L., Liu D., Wang Z.: *Anal. Chem.* 79 (2007) 773.