

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Detekce enzymové aktivity Src kinázy imobilizované na magnetických částicích

Bc. Šárka Bednářová

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Šárka Bednářová**
Osobní číslo: **C21443**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Detekce enzymové aktivity Src kinázy imobilizované na magnetických částicích**
Téma práce anglicky: **Detection of Enzymatic Activity of Src Kinase Immobilized on Magnetic Particles**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Tyrosin proteinkináza src.

Proteinkinázy a Parkinsonova choroba – jaké PTM modifikace α -synucleinu mohou souviset s neurodegenerativními patologiemi – fosforylace, oxidace, nitrace, aj. Modifikace dalších proteinů – MBP, tau protein

Fosforylace proteinů *in vitro* a metody její detekce

Imobilizované kinázy

Experimentální část:

1. Zavedení a optimalizace metod pro detekci fosforylace proteinů (Western blot, plmago blot, MALDI MS)
2. Fosforylace peptidového substrátu, proteinů MBP a α -synucleinu, volnou a imobilizovanou Src kinázou
3. Stabilita Src kinázy imobilizované na magnetické částice

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

Seznam doporučené literatury:

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

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Detekce enzymové aktivity Src kinázy imobilizované na magnetických částicích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 4.5.2023

Šárka Bednářová v.r.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, ochotu, trpělivost při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Ondrovi Morávkovi za velkou ochotu, pomoc a cenné rady při práci na experimentální části a za pomoc při analýze vzorků a vyhodnocování dat.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá imobilizací proteinkinázy na magnetický nosič, fosforylací proteinů na tyrosinu a její detekcí. Fosforylace byla provedena u dvou proteinů - alfa-synukleinu a myelinovém bazickém proteinu pomocí volné i imobilizované Src kinázy. Detekce byla provedena metodami Western blotu pomocí dendrimeru pIMAGO a specifických protilátek proti fosforylovanému tyrosinu a hmotnostní spektrometrie. Stabilita imobilizované Src kinázy byla sledována pomocí Src peptidu s analýzou hmotnostní spektrometrií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fosforylace, fosfoproteiny, Src kináza, imobilizace enzymu, alfa-synuklein, myelinový bazický protein, tau protein

TITLE

Detection of Enzymatic Activity of Src Kinase Immobilized on Magnetic Particles

ANNOTATION

The thesis deals with the immobilization of protein kinase on a magnetic carrier, the phosphorylation of proteins on tyrosine and its detection. Phosphorylation was performed on two proteins - alpha-synuclein and myelin basic protein using both soluble and immobilized Src kinase. Detection was performed by Western blot methods using pIMAGO dendrimer and specific antibodies against phosphorylated tyrosine and mass spectrometry. The stability of immobilized Src kinase was monitored using Src peptide and mass spectrometry analysis.

KEYWORDS

Phosphorylation, phosphoproteins, Src kinase, enzyme immobilization, alpha-synuclein, myelin basic protein, tau protein

OBSAH

ÚVOD	14
1. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	15
2. TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1. Proteinkinázy	16
2.1.1. Patogeneze fosforylace	17
2.1.2. Dělení proteinkináz	17
2.1.3. Specifičnost fosforylace	18
2.2. Tyrosinkinázy	19
2.2.1. Receptorové tyrosin kinázy	19
2.2.2. Nereceptorové tyrosin kinázy	20
2.3. Src kinázy	21
2.3.1. Struktura Src proteinkinázy	21
2.3.2. Aktivita Src kináz	23
2.4. Alfa-synuklein	25
2.4.1. Agregace a toxicita alfa-synukleinu	26
2.4.2. Posttranslační modifikace alfa-synukleinu	27
2.4.3. Parkinsonova choroba	29
2.5. Myelinový bazický protein MBP	33
2.5.1. Roztroušená skleróza	33
2.6. Tau protein	35
2.6.1. Posttranslační modifikace tau proteinu	36
2.6.2. Alzheimerova choroba	37
2.7. Imobilizované kinázy	39
2.7.1. Metody imobilizace	40
2.7.2. Nosiče	41
2.7.3. Využití imobilizovaných enzymů	42
2.8. Metody detekce fosforylace	43
2.8.1. Western blot s následnou imunodetekcí fosfoproteinů na membráně	43
2.8.2. pIMAGO	43
2.8.3. Hmotnostní spektrometrie	44
2.8.4. Radioaktivní detekce fosfoproteinu	45
2.9. Multifosforylované peptidy	47
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
3.1. Potřebné vybavení	48
3.2. Imobilizace enzymu na magnetické částice	49
3.2.1. Imobilizace trypsinu na magnetické částice	49

3.2.2.	Stanovení aktivity trypsinu pomocí substrátu BAPNA.....	50
3.2.3.	Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič	52
3.3.	Fosforylace substrátu Src kinázou <i>in-vitro</i>	53
3.3.1.	Fosforylace peptidového substrátu v čase volnou kinázou	54
3.3.2.	Fosforylace peptidového substrátu v čase imobilizovanou Src kinázou	54
3.3.3.	Fosforylace proteinu volnou Src kinázou.....	54
3.3.4.	Fosforylace proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice.....	55
3.4.	SDS-PAGE elektroforéza	55
3.4.1.	Barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie G-250 Stain	58
3.4.2.	Barvení proteinů roztokem AgNO ₃	59
3.5.	Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí	60
3.5.1.	Westernový přenos proteinů na membránu.....	60
3.5.2.	Detekce proteinů na nitrocelulózkové membráně pomocí Ponceau S	61
3.5.3.	Detekce fosforylace na proteinech pomocí specifických protilátek.....	61
3.6.	Detekce fosfoproteinů v membráně pomocí kitu pIMAGO	63
3.7.	Příprava vzorku proteinu pro analýzu hmotnostní spektrometrií	64
3.7.1.	Proteolytické štěpení proteinu volným sekvenčně modifikovaným trypsinem.....	64
3.7.2.	Obohacení fosfopeptidů na nosiči Titansphere TM TiO Bulk Material	65
3.7.3.	Odsolení vzorku proteinů na pevné fázi OLIGO	66
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	69
4.1.	Optimalizace metod pro detekci fosforylace proteinů na tyrosinu v membráně	70
4.2.	Imobilizovaná Src kináza	76
4.2.1.	Imobilizace trypsinu na magnetické částice.....	76
4.2.2.	Imobilizace Src kinázy na magnetické částice	79
4.2.3.	Skladovací stabilita imobilizované Src	81
4.3.	Fosforylace MBP Src kinázou <i>in-vitro</i> a její detekce	83
4.3.1.	Detekce fosforylace MBP metodou Western blotu s imunodetekcí.....	83
4.3.2.	Detekce fosforylace MBP metodou Western blotu s pIMAGO	85
4.3.3.	Analýza fosforylace MBP hmotnostní spektrometrií.....	86
4.4.	Fosforylace alfa-synukleinu Src kinázou <i>in-vitro</i> a její detekce	88
4.4.1.	Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blotu s pIMAGO	88
4.4.2.	Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blotu s imunodetekcí	90
4.4.3.	Analýza fosforylace alfa-synukleinu hmotnostní spektrometrií	92
5.	ZÁVĚR	94
6.	ZDROJE	95

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Interakce enzymu a substrátu	18
Obrázek 2 Struktura Src proteinkinázy	22
Obrázek 3 Struktura Src kinázy	23
Obrázek 4 Změna konformace Src kinázy po aktivaci.....	23
Obrázek 5 Rozmístění domén a AMK sekvence alfa-synukleinu.....	26
Obrázek 6 Posttranslační modifikace alfa-synukleinu.	27
Obrázek 7 Lewyho tělíska v nervové tkáni	31
Obrázek 8 Detekce přirozené fosforylace u vzorků IgG.	71
Obrázek 9 Detekce přirozené fosforylace u vzorků MBP, IgG a BSA.	72
Obrázek 10 Detekce přirozené fosforylace u vzorku lidského IgG, α -kaseinu a β -kaseinu. ..	73
Obrázek 11 Detekce fosforylace proteinů na membráně pomocí pIMAGO.....	74
Obrázek 12 Detekce fosforylace u lidského IgG.....	75
Obrázek 13 Ověření molekuly MBP z nového alikvotu.	84
Obrázek 14 Detekce fosforylace MBP pomocí imunodetekce.....	85
Obrázek 15 AMK sekvence nativního hovězího MBP	86
Obrázek 16 Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blot s pIMAGO detekcí	89
Obrázek 17 Detekce fosforylace alfa-synukleinu pomocí imunodetekce.	90
Obrázek 18 Detekce fosforylace alfa-synukleinu na Tyr39 na NC membráně.....	92
Obrázek 19 Sekvence AMK rekombinantního alfa-synukleinu.....	92

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kalibrační řada trypsinu.	51
Tabulka 2: Příprava gelů	57
Tabulka 3 Aktivita imobilizovaného trypsinu.	77
Tabulka 4 Intenzita píků fosforylovaného a nefosforylovaného peptidového substrátu a míra fosforylace s volnou Src kinázouí.....	80
Tabulka 5 Srovnání míry fosforylace volné a imobilizované kinázy.....	80
Tabulka 6 Srovnání míry fosforylace imobilizovanou kinázou bez přídavku a s přídavkem BSA.....	81
Tabulka 7 MS detekce fosforylací u molekuly MBP po fosforylaci imobilizovanou a volnou Src kinázou.	87

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka trypsinu.	77
Graf 2 Operační stabilita trypsinu imobilizovaného na magnetické částice s BSA a bez něj .	78
Graf 3 Operačně-skladovací stabilita trypsinu imobilizovaného na částice.	78
Graf 4 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu fosforylovaného volnou Src kinázou.	79
Graf 5 Skladovací stabilita imobilizované Src kinázy s přídavkem BSA.	82

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
BARK1	beta-adrenergní receptor kináza
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHIP	E3 ubikvitin-protein ligáza
CKI, CKII	kaseináza I a II
CNS	centrální nervová soustava
Csk	tyrosin proteinkináza Csk
DHB	dihydroxybenzoová kyselina
DTT	dithiotreitol
FYN	Fyn tyrosin kináza
ECD	extracelulární doména, z angl. Extracellular Domain
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EGTA	ethylenglykol-bis-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza, z angl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GRK5	G protein vázaná receptor kináza 5
GSH	glutathion
GTS	glutathion-S-transferáza
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. High Performance Liquid Chromatography
HRP	křenová peroxidáza
IAA	jodacetamid
LA	kyselina mléčná
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, z angl. Liquid Chromatography with Mass Spectrometry
MALDI	laserová desorpce za účasti matrice
MAPK11, 12, 14	mitogenem aktivovaná proteinkináza 11, 12 a 14
MBP	myelinový bazický protein

MINK1	deformovaná kináza 1
MPP	multifosforylované peptidy
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. Mass Spectrometry
MSA	mnohotná systémová atrofie
NBIA	akumulace železa v mozku typu I.
NC	nitrocelulózová membrána
nMBP	nativní MBP
Nedd4	E3 ubikvitin-protein ligáza
nRTK	nereceptorová tyrosin kináza
PAF	autonomní selhání
p-alfa-synuklein	fosforylovaný alfa-synuklein
PLK2	serin/threonin proteinkináza
pMBP	fosforylované MBP
PTM	posttranslační modifikace
pTyr	fosforylovaný tyrosin
RTK	receptorové tyrosin kinázy
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
SH1, 2 a 3	Src-homology 1, 2 a 3
SIAH	E3 ubikvitin-protein ligáza
SNCA	gen pro alfa-synuklein, též NACP, PARK1
SPR	povrchová plazmová resonance, z angl. Surface Plasmon Resonance
TAOK2	serin/threonin proteinkináza TAOK2
TFA	trifluoroctová kyselina
TOM20	translokáza vnější membrány u mitochondrií
VDAC	napětově závislý aniontový kanál
VRK2	serin/threonin proteinkináza VRK2

ÚVOD

Fosforylace je jednou z posttranslačních úprav, která má vliv na výslednou strukturu i funkci proteinů. Studium fosforylace na proteinech *in-vitro* může pomoci objasnit patogeneze mnoha chorob. K detekci fosforylace je třeba citlivých metod. Nejčastěji se dnes používá hmotnostní spektrometrie (MS), která umožňuje do několika minut získat velké množství výsledků, které je následně potřeba srovnat se spektry v databázích a určit, jestli jsou dané proteinové fragmenty fosforylovány. Dalšími metodami detekce jsou například pomocí radioaktivního značení izotopem fosforu nebo pomocí různých chelatačních látek, jako jsou Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ti^{4+} a Ca^{2+} , které selektivně vážou fosforylaci na proteinu. Častá je i detekce fosforylace pomocí specifických protilátek nebo pomocí dendrimeru pIMAGO. Výhodou těchto detekcí oproti MS detekci je, že není potřeba drahého vybavení.

Diplomová práce se zabývá optimalizací metod detekce fosforylace na proteinech, a to metodami Western blot s imunodetekcí a s dendrimerem pIMAGO. Metoda imunodetekce je založená na specifické reakci protilátky s cílovou strukturou – fosforylaci na aminokyselině tyrosinu. Metodou Western blotu s dendrimerem pIMAGO lze specificky prokázat cílovou strukturu na proteinech, nezávisle na aminokyselině, na které je fosfátová skupina navázána.

Dále se práce zabývá imobilizací Src kinázy na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads s modifikovaným karboxylovým povrchem a ověřením její skladovací stability. Takto připravená kináza bude použita k fosforylaci vybraných proteinů (myelinového bazického proteinu a alfa-synukleinu). K detekci její aktivity budou použity optimalizované metody – Western blot s dendrimerem pIMAGO a imunodetekcí. Pro potvrzení fosforylací bude použita hmotnostní spektrometrie, která má možnosti potvrdit i konkrétní místa fosforylace v proteinu. Analyzován v tomto případě není celý protein, ale jeho fragmenty, protože nejprve dochází k jeho rozštěpení na peptidy. Díky tomu jsme po porovnání výsledků s databází schopni určit, na kterém peptidu a na kterém místě v aminokyselinové sekvenci je protein fosforylován.

Fosforylace proteinů zejména na tyrosinu má vztah k některým neurodegenerativním chorobám, zejména k Parkinsonově chorobě a Alzheimerově chorobě. O některých fosfoproteinech specificky se vyskytujících u těchto chorob se uvažuje jako o možných diagnostických markerech. Proto je detekce proteinové fosforylace předmětem mnoha výzkumů.

1. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zavedení a optimalizace metod k detekci enzymové aktivity Src kinázy. Vybranými metodami byl Western blot s imunodetekcí s anti-fosfotyrosinovými protilátkami, Western blot s dendrimerem pIMAGO a MALDI-Orbitrap MS. Fosforylace proteinů byla provedena volnou a imobilizovanou Src kinázou. Dílčím cílem u imobilizované Src kinázy bylo ověření aktivity a skladovací stability pomocí fosforylace Src peptidu a metody detekce hmotnostní spektrometrie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Proteinkinázy

Proteinkinázy jsou proteiny spadající do skupiny molekul s přísně organizovanou strukturou [1]. Představují unikátní a přesně definovaný systém, který reguluje velkou řadu procesů ve všech eukaryotických buňkách [1]. Existují i tyrosin proteinkinázy vylučované mimo buňku, takže informace nemusí být předávána pouze uvnitř buňky, ale i mimo ni [2].

Jsou to enzymy ze skupiny transferáz, které katalyzují fosforylaci. Tento proces je znám již od 50. let minulého století [1]. Mají opačnou funkci než fosfatázy, které v proteinech odstraňují fosfátovou skupinu. V dnešní době je existuje několik skupin proteinkináz. Velikost a rozmanitost rodiny kináz byla odhalena teprve až po osekvenování celého genomu [1]. V lidském organismu můžeme najít přes 500 různých kináz [3]. Řada z nich může při poruše způsobit závažná onemocnění. Proto je identifikace kináz, jejich substrátů a potenciálních inhibitorů nezbytná pro pochopení základních procesů, diagnostiku a objevování nových léků [4]. Na velkou část kináz se v poslední době zaměřuje i protinádorová léčba [3].

I když je rodina proteinkináz poměrně rozmanitá a každá kináza vykazuje jedinečné variace proteinkinázové reakce, strukturu mají všechny podobnou [5]. Skládají se z N-terminálního laloku, který má strukturu β -skládaného listu a slouží převážně k vazbě ATP, a z C-terminálního konce, který má strukturu α -helixu a je zodpovědný za spojení kinázy s peptidovým substrátem [6].

Úlohou proteinkináz v buňce je přenos fosfátové skupiny z ATP (většinou) na specifickou aminokyselinu v proteinu. Jedná se o vratnou reakci, protože fosfátová skupina může být hydrolyticky odštěpena za katalýzy enzymem fosfatázou [7]. Fosforylace je jednou z nejčastějších posttranslačních modifikací proteinů u eukaryot [3]. Ovlivňuje asi 1/3 proteinů a její studování *in-vitro* může pomoci pochopit normální i patologické stavy organismu [8]. I když je totiž proces fosforylace v buňce velmi striktně kontrolován a regulován, občas se dostane mimo kontrolu. Následná hyper- nebo hypofosforylace může vést k rozvoji onemocnění. Nejčastěji je pozorována u nádorových onemocnění a neurodegenerativních chorob. Eukaryotické proteinkinázy jsou regulovány přesně danými působky, například pomocí hormonů, neurotransmiterů nebo i pomocí nedostatku živin a jinými druhy stresu [1]. Tento způsob regulace většinou zajišťuje přestavbu molekuly a následnou aktivaci nebo inaktivaci enzymu, případně spuštění celé kaskády dějů [1]. Může jít například o otevření kanálu nebo zahájení transkripce.

Fosforylace není jedinou posttranslační úpravou proteinů. Dalšími modifikacemi jsou glykosylace, acylace nebo methylace [7]. I když tyto reakce nejsou tak časté, jsou také velmi důležité pro strukturu a funkci výsledných proteinů [9].

2.1.1. Patogeneze fosforylace

Nadměrná nebo nedostatečná fosforylace proteinů představuje poměrně velký problém. Vede ke ztrátě funkce proteinů a jejich následnému hromadění v buňkách. Za normálních okolností jsou nefunkční proteiny likvidovány v proteazomu uvnitř buňky pomocí ubikvitinu. Pokud je ale proteinů příliš vysoká hladina a je překročena kapacita proteazomů, nadbytečné proteiny agregují. To vede k vyvolání apoptózy, v některých případech i nekrózy buňky. Dále může dojít k aktivaci imunitního systému, nejrůznějším zánětům, likvidaci buněk v mozku a u pacienta dochází k mentálním změnám. Buňky dále nejsou obnovovány, protože i přes poměrně dobré prokrvení má nervová tkáň velmi špatnou regenerativní schopnost. Postupem času dochází k progresi onemocnění. Mezi nemoci, u kterých se vyskytuje hyperfosforylace proteinů, se řadí amyloidóza, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Jakobova choroba a také Parkinsonova choroba, které se budu v práci dále věnovat. Proces fosforylace je tedy velmi důležitý pro správnou strukturu, ale i funkci proteinů.

2.1.2. Dělení proteinkináz

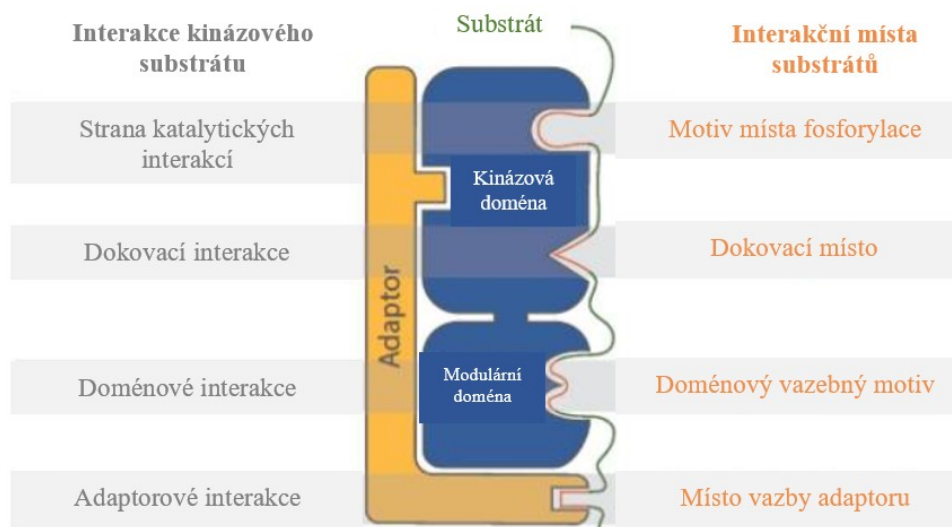
Proteinkinázy se od sebe odlišují způsobem regulace a také substráty, které fosforylují [3]. Podle toho, který postranní řetězec aminokyseliny kinázy fosforylují, je můžeme rozdělit na serin, threonin a tyrosin kinázy. Přičemž serin a threonin kinázy jsou často řazeny do jedné společné skupiny tzv. serin/threonin kináz [7]. Dále existuje malá skupina tzv. dual specifických kináz, které mohou fosforylovat serin/threonin nebo tyrosinové substráty [10]. Kromě těchto skupin existují ještě kinázy, které fosforylují histidin. Ty ale u eukaryot nenajdeme, vyskytují pouze u bakterií.

První skupina, serin/threonin kinázy, katalyzuje přenos fosfátu na serinové nebo threoninové zbytky. Do této velké skupiny řadíme celou řadu významných kináz, například cAMP-dependentní proteinkináza, proteinkináza A, proteinkináza B [7; 10]. Najdeme zde asi 400 různých kináz [6]. Tyrosin kinázy tvoří druhou, výrazně menší skupinu. Dnes je známo asi 90 různých kináz specifických pro rezidua tyrosinu [6]. Jejich úkolem je fosforylace tyrosinu na O-fosfotyrosin. Druhé skupině – tyrosin kinázám se budu podrobněji věnovat dále.

2.1.3. Specifičnost fosforylace

Místa pro fosforylaci na proteinech mohou být rozpoznána více kinázami, přičemž každá může ovlivnit funkci nebo strukturu výsledného proteinu jinak [7]. Specifičnost fosforylace je zajištěna několika způsoby.

Proteinkinázy selektivně cílí na substráty pomocí několika typů fyzikálních interakcí, často přes vodíkové můstky. Substrát (fosforylovaný aminokyselinový zbytek) musí přechodně interagovat s aktivním místem kinázy. K dalšímu zajištění specifičnosti přispívají široké štěrbiny proteinkináz, které interagují s místy lemující oblast fosforylace [3]. Představa interakce kinázy se substrátem je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1 Interakce enzymu a substrátu. Převzato a upraveno [3].

Regulace fosforylace je poměrně složitá pomocí hormonů a dalších působků. Někdy je uspořádání fosforylace hierarchické v podobě různých kaskád. V takových případech jsou signály často směřovány z extracelulárního prostoru, přes membránu až do jádra buňky prostřednictvím různých drah. Výsledkem může být inhibice nebo stimulace dějů, jakými může být například transkripce a podobně [7].

2.2. Tyrosinkinázy

V dnešní době je známo asi 518 různých proteinkináz. Z toho je více než 90 tyrosinkináz [11]. Tyto enzymy kovalentně modifikují hydroxylové zbytky na tyrosinech v proteinových substrátech přenosem γ -fosfátové skupiny z ATP [12]. Ovlivňují tím buněčný růst a dělení, diferenciaci, regulují apoptózu, přenos signálu do buňky [13]. Známo je sice zatím jen necelých 100 tyrosin kináz, ve skutečnosti jich může existovat daleko víc. Můžeme je rozdělit na receptorové a nereceptorové kinázy [14; 15].

Kinázy v organismu zajišťují fosforylaci různých proteinů a tím ovlivňují jejich aktivitu a funkci. Bylo zjištěno, že různé chyby ve fosforylaci proteinů výrazně ovlivní jejich vlastnosti a strukturu a mohou pak způsobovat různé patologické stavy. Z posledních studií vyplývá, že se tyrosinová fosforylace proteinů podílí na patogenezi některých onemocnění daleko více, než se předpokládalo [16]. Díky nástupu nových analytických metod – zejména díky sekvenování nové generace, byly osekvenovány nádorové linie a odhaleny mutace v genech kódující tyrosin kinázy, které mohou způsobit nádorovou transformaci buňky [17]. Právě nádorovým onemocněním bylo v posledních 30 letech věnováno velké množství pozornosti [11]. Byl zaznamenán i negativní vliv Src kinázy na mitochondrie [18]. Mutace v genech pro kinázy mohou vést i k rozvoji neurodegenerativních chorob. Také proto má studium fosforylace *in-vitro* velký význam.

2.2.1. Receptorové tyrosin kinázy

Do skupiny receptorových tyrosin kináz (RTKs) můžeme zařadit tyrosin kinázy, které mají transmembránovou doménu, takže se vyskytují pouze v cytoplazmatické membráně. Dále mají extracelulární doménu (ECD), která je schopna vázat specifický ligand. Právě díky rozmanitosti ECD jsou receptory schopny specificky rozpoznat odlišné proteinové ligandy, které pak vyvolávají jedinečnou odezvu. Většina kináz ale může být aktivována více než jedním ligandem [19]. RTKs obsahují ještě intracelulární doménu, která váže a fosforyluje příslušné substráty. Intracelulární doména se skládá z regulační oblasti, tyrosinkinázové domény a C-terminální [17]. Fungují podobně jako ostatní enzymy. Po navázání ligandu do extracelulární části enzymu dochází ke konformačním změnám molekuly. Ligandem může být rozpustný nebo membránový protein [19]. Ta umožňuje autofosforylaci v tyrosinkinázové doméně a tím dochází k aktivaci enzymu [17]. Po této aktivaci je možná vazba enzymu a ATP do intracelulární části enzymu a může proběhnout fosforylace. Tento proces může spustit kaskádu dějů, která končí až v jádře.

Do této skupiny patří celkem 58 tyrosin kináz [11]. Tyto tyrosin kinázy jsou dále rozdělené do 20 podskupin [15].

2.2.2. Nereceptorové tyrosin kinázy

Nereceptorové tyrosin kinázy (nRTKs) nemají transmembránovou doménu, nacházejí se například v cytosolu, nebo jádře buňky. Tvoří menší skupinu než receptorové, v lidském organismu jich najdeme celkem 32 [20]. Ty jsou dále rozdělené do 10 rodin – Alb, Ack, Csk, Fak, Fes, Frk, Jak, Src, Tec, Syk [12].

Dále bude pozornost věnována nejvíce rodině Src. Typickým zástupcem je Src tyrosinová kináza, která je důležitá pro správnou proliferaci, migraci, invazi a přežití buněk [21]. Tato skupina je v poslední době hojně studována, protože sem dále řadíme kinázy Brk, které jsou důležitým onkogenem, objevují se hlavně u nádorů prsu [21; 22]. Podrobněji budou Src kinázy rozebrány v následující kapitole.

Tyrosin kinázy mají vztah i k rozvoji neurodegenerativních onemocnění. V posledních 20 letech byly hojně studovány posttranslační modifikace (PTM) u tau proteinu, z nich hlavně fosforylace, a jejich vztah k Alzheimerově chorobě. Bylo zjištěno, že fosforylace na některých specifických místech ovlivňuje vlastnosti tau proteinu [16]. A to hlavně jeho rozpustnost. Kinázy rodiny Src a Alb se zase podílejí na patogenezi Parkinsonovy choroby [16].

2.3. Src kinázy

Proteinkinázy patřící do Src skupiny jsou již dlouhá léta předmětem výzkumů. Tyrosinová kináza Src byla mezi prvními popsány onkogeny [18]. Existují 2 typy. První pochází z viru Rousova sarkomu, který způsobuje nádorové onemocnění kuřat. Byl objeven již v roce 1911 a probíhala na něm už celá řada studií [5]. Dále ještě existuje její normální buněčný homolog, kódovaný fyziologickým genem vyskytující se u zvířat a lidí [20]. Jedná se o první proto-onkogen [5]. Zkoumána je jak lidská Src kináza, tak i kuřecí Src. Oba proteiny si jsou velmi podobné, vykazují 99,6 % identitu. Kuřecí virový protein Src se od ní mírně odlišuje [5].

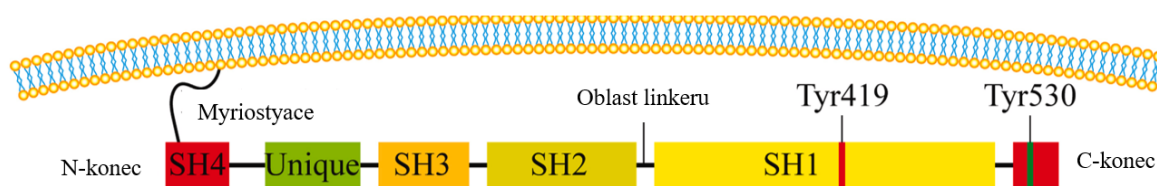
Celkem do této rodiny spadá 11 kináz. Dle příbuznosti je lze rozdělit do 3 podskupin. Do první skupiny se řadí enzymy Src, Fyn, Yes a Fgr. Do druhé skupiny patří enzymy Blk, Hck, Lck a Lyn. Do poslední, třetí skupiny pak patří Brk, Frk a Srm. Enzymy ve třetí skupině jsou velmi vzdáleně příbuzné enzymům v I. a II. skupině [5; 20]. Odlišuje se od nich strukturou. Sice mají, podobně jako předchozí 2 skupiny, domény (SH1, SH2, SH3), ale nemají myristoylovou skupinu na N-konci a C-terminální regulační konec [5].

V organismu se vyskytují prakticky všude a mají důležitou roli. Fungují jako proto-onkogeny a mají vliv na morfologii buněk, pohyblivost, proliferaci a přežití [20]. Hlavní význam mají Src kinázy při proliferaci buněk. Může být aktivována při simulaci receptoru epidermálního růstového faktoru, která vede k proliferaci buněk. Také je aktivována při přechodu buněk z G2 do M fáze buněčného cyklu. Nejspíš se ale kinázy účastní i jiných procesů než jen buněčného dělení, protože jsou přítomny i v bezjaderných buňkách (trombocytech) a to dokonce v 5-200krát vyšší hladině než u většiny ostatních buněk. Je také přítomna v neuronech [20].

2.3.1. Struktura Src proteinkinázy

Pro Src kinázu, stejně jako pro ostatní proteiny platí, že pro správnou funkci musí být posttranslačně modifikována. Tento děj je nutný pro fungování kináz v buňce. Ve své struktuře nemají tyto kinázy domény typické pro receptorové kinázy – extracelulární část vázající ligand a intracelulární část schopnou vázat substrát a ATP. Nicméně i tyto kinázy mohou být v některých případech zakotveny v membráně, a to díky modifikaci na N-konci. Src kinázy mají ve své struktuře (Obrázek 2) myristoylovaný konec, oblast kladně nabitých aminokyselin, SH2 a SH3 domény, tyrosin kinázovou katalytickou doménu a koncovou C-oblast [20].

Na N-konci molekuly je místo methioninu na glycinu navázána 14-uhlíkatá myristoylová skupina. Dochází k tomu po reakci s myristoyl-CoA [5]. To zajišťuje kinázám lepší zakotvení do cytoplazmatické membrány, proto je tato posttranslační modifikace nutná [20]. Nicméně pouze myristoylace nestačí k zakotvení kinázy do membrány [5]. Src kinázy mají ve své molekule několik domén – SH4 (myristoylová skupina), SH3, SH2, SH1 (doména protein-tyrosin kinázy), dále jedinečnou doménu, linker SH2-kinázy a regulační segment na C-terminálním konci [23].

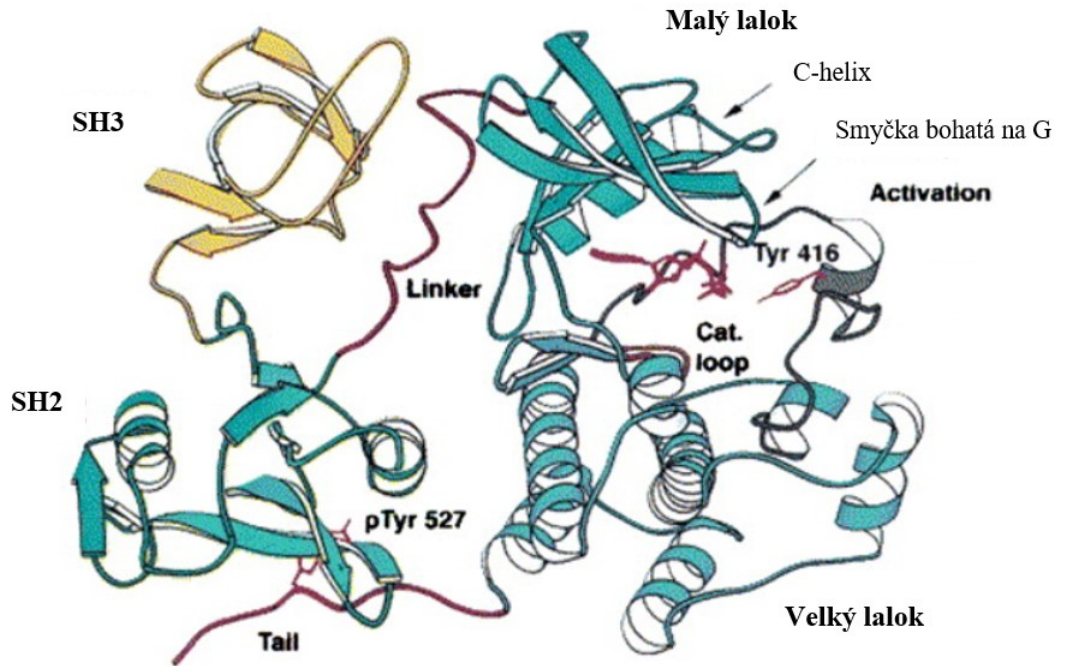


Obrázek 2 Struktura Src proteinkinázy. Převzato a upraveno z [23].

Doménu SH3 tvoří asi 60 aminokyselinových zbytků. Je složena z 5 antiparalelních β -pramenů, 2 smyček zvaných RT a n-Src smyčky. Smyčky ležící na obou koncích povrchu složeného z aromatických a hydrofobních zbytků tvoří rozpoznávací místo proteinových sekvencí (hlavně polyprolin). Proliny interagují s aromatickými zbytky v doméně SH3 [5].

Doménu SH2 tvoří asi 100 aminokyselinových zbytků a vážou se na fosfotyrosin na C-terminálním konci. Je složena z centrálního, třívláknového β -skládaného listu, z každé strany obaleného jedním helixem ($\alpha 1$, $\alpha 2$). Jsou zde 2 kapsy, jedna pro vazbu fosfotyrosinu, druhá pro vazbu C-terminálních konců [5].

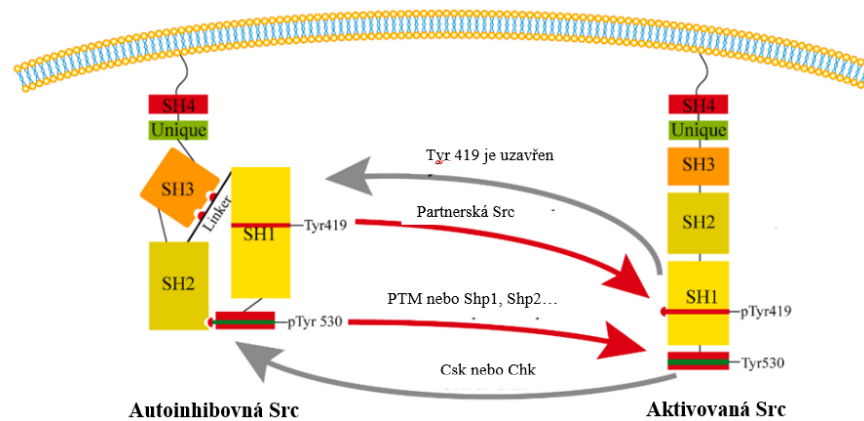
Domény SH2 a SH3 jsou velmi důležité pro intramolekulární a intermolekulární interakce, které regulují lokalizaci, nábor substrátu a katalytickou aktivitu [13]. Vyskytují se na zadní straně kinázové domény, mimo aktivní místo [20]. Prostřednictvím intramolekulárních kontaktů omezují aktivitu enzymu. Po přemístění intramolekulárních domén mohou proteiny aktivovat Src kinázu. Proteiny, které obsahují ligandy těchto domén, mohou na domény vázat a přitahovat je do specifických míst buněk [20; 23]. 3D struktura molekuly kinázy je znázorněna na Obrázku 3.



Obrázek 3 Struktura Src kinázy. Převzato a upraveno z [20].

2.3.2. Aktivita Src kináz

Aktivita kináz v buňce je velmi přísně kontrolována. Aby byla zajištěna rychlá odpověď, a hlavně specifická aktivita kináz, nachází se jich většina v neaktivním stavu. K aktivaci dochází po kontaktu s aktivační molekulou [24]. Aktivita Src proteinkináz je regulována tyrosinovou fosforylací. Díky tomu dochází ke změně konformace molekuly (Obrázek 4) a kináza se stává aktivní.



Obrázek 4 Změna konformace Src kinázy po aktivaci. Převzato a upraveno z [23].

Mezi hlavní fosforylační místa lidského Src patří tyrosin 419, na kterém může dojít k fosforylaci sousední molekulou Src (trans-autofosforylace), popřípadě jinou kinázou. Nachází se v aktivační smyčce katalytické domény. Jeho fosforylace podporuje aktivitu

enzymu [5]. Druhým důležitým místem je tyrosin 530, na kterém dochází k fosforylaci za pomoci jiných proteinkináz. Většinou díky C-terminální Src kináze nebo Csk homologní kináze. Toto místo se nachází mimo aktivační smyčku, jeho fosforylaci dochází k inhibici fosforylace [5; 20]. Virový onkogenní protein Rousova sarkomu se na svém C-terminálním konci výrazně liší od lidského nebo kuřecího Src. Nenajdeme u něj ekvivalent Tyr530, který by fungoval jako autoinhibitor, proto má tento enzym zvýšenou bazální aktivitu [5].

Pokud je enzym neaktivní, obsahuje ve své molekule nějaký zlom, ohyb, který katalytickou aktivitu vylučuje. Při aktivaci dochází vlivem elektrostatických změn ke změně struktury, lámání, vytvářejí se jiné vodíkové vazby a molekula je tak připravena pro fosforylaci proteinu [5]. Aby dále mohla proběhnout fosforylace proteinu je nutná přítomnost 2 iontů Mg^{2+} . Obecně je pro činnost proteinkináz potřeba iont Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Uvnitř buněk je ale vyšší koncentrace Mg^{2+} , proto se bere jako důležitější. Funkcí má Mg^{2+} hned několik. Je součástí substrátu Mg-ATP, interaguje s komplexem enzym/kov-nukleotid, aby se zvýšila katalytická účinnost [5]. Funkce Mg^{2+} a dalších dvojmocných kationtů v reakcích zprostředkovaných proteinkinázami jsou složité. Byly zkoumány jak na receptorových, tak i na nereceptorových kinázách. Zatím nebyla zcela objasněna [5].

Za normálních podmínek je většina (cca 90 %) Src kinázy fosforylována na Tyr530. Fosfotyrosin 530 v C-terminálním konci se tak následně může navázat na doménu SH2 a stabilizovat celou molekulu neaktivního enzymu [20]. Vytváří zde západku, která stabilizuje připojení domény SH2 k velkému laloku [5]. Stabilizační funkci má i doména SH3. Nejrůznější mutace v SH2 doméně se ukázaly jako možné příčiny změny aktivity kinázy, která následně vedla k rozvoji nádorových onemocnění. Mutace totiž může ovlivnit funkčně důležité aminokyseliny, které se podílejí na vazbě ligandu, nebo zprostředkovávají interakce s katalytickou doménou. To následně vede k jejich nedostatečné nebo nadměrné aktivitě [24].

V průběhu let bylo vyvinuto mnoho úsilí a bylo vedeno nemálo klinických studií pro identifikaci inhibitorů Src proteinkináz, které by mohly pomoci v léčbě solidních nádorů především prsu a plic [25]. Jsou to například přípravky desatinib a ponatinib, které vytvářejí vodíkové vazby a propojují tak malé a velké kinázové laloky. Díky tomu je molekula udržována v neaktivní formě [5]. Snad bude časem podobného pokroku v léčbě dosaženo i u neurodegenerativních chorob.

2.4. Alfa-synuklein

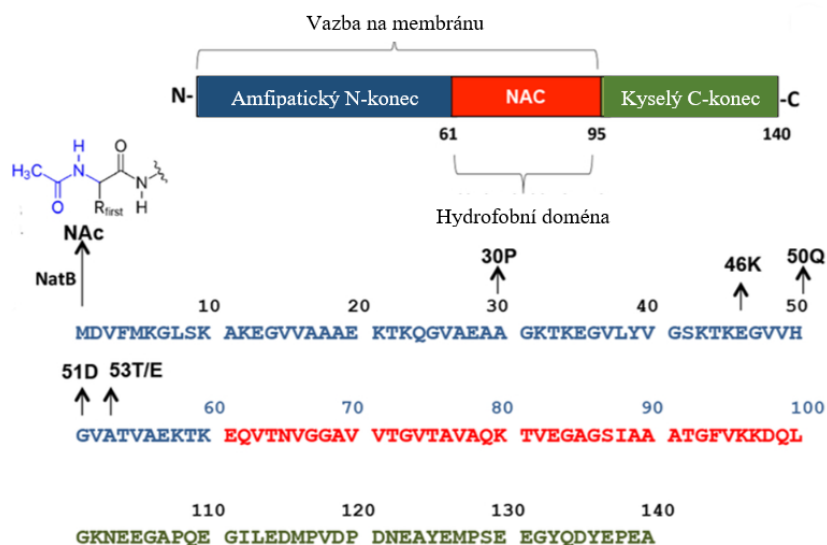
Alfa-synuklein je neuronální protein, který spolu s beta- a gama-synukleinem patří do skupiny synukleinových proteinů. Všechny se za fyziologických podmínek vyskytují na presynaptických terminálech a mozku [26; 27]. Fyziologická funkce je zatím jen málo pochopena. Podílejí se na stabilitě membrány neuronů, ovlivňují presynaptickou signalizaci [27]. Alfa-synuklein nejspíše může působit také jako molekulární chaperon a pomáhat při opětovném skládání SNARE proteinů. Alfa-synuklein se přímo váže na synaptobrevin-2 SNARE proteinu a podporuje tvorbu SNARE komplexu [28]. Roli hraje i v regulaci dopaminové neurotransmise a to tak, že se spojuje s dopaminovým neurotransportérem a moduluje jeho aktivitu [29].

Genetické změny SNCA vedou k několika patologiím (synukleinopatiím). Fibrilární agregáty synukleinu tvoří hlavní složku amyloidních plaků u Alzheimerovy choroby, jsou hlavní složkou Lewyho tělísek a nacházejí se také uvnitř neuronů v agregátech podobných Lewyho tělískům, gliových inkluzí. Byl sice popsány patologie, které byly způsobeny mutacemi beta nebo gama-synukleinu, nejsou ale příliš rozšířené [26]. Již v roce 1997 bylo zjištěno že má alfa-synuklein význam pro neurodegenerativní onemocnění [30]. Byl nalezen vztah mezi bodovou mutací v genu kódující synuklein a Parkinsonovou chorobou [26]. Kromě Parkinsonovy choroby se alfa-synuklein vyskytuje také u jiných synukleinopatií – mnohotná systémová atrofie (MSA), mnoho případů Alzheimerovy choroby, neurodegenerace s akumulací železa v mozku typu I (NBIA) nebo čisté autonomní selhání (PAF) [26; 31]. Objasnění mechanismů, které vedou k agregaci alfa-synukleinu je nezbytné pro vývoj účinné strategie pro diagnostiku, léčbu a prevenci Parkinsonovy choroby [28].

Alfa-synuklein je kódován genem SNCA (synonyma NACP, PARK1) na chromozomu 4 a je tvořen 140 aminokyselinami. Velikost nativně rozloženého monomeru alfa-synukleinu je 14 kDa [32]. Často je ale za nedenačních podmínek izolován z mozkové tkáně jako tetramer s velikostí 58 kDa [32]. Kromě monomerů a tetramerů může tvořit i dimery [28]. Za fyziologických podmínek se vytváří rovnováha mezi rozpustnými tetramery, monomery a membránově vázanými multimery [33].

O tom, jestli bude alfa-synuklein tvořit monomer nebo tetramer nejspíše rozhodují posttranslační modifikace. Fyziologická je pro něj struktura α -helixu, u patologií většinou zaujímá strukturu β -skládaného listu [33]. Synuklein se skládá ze 3 odlišných domén (Obrázek 5) [29]. První část na N konci je tvořena 1-60 aminokyselinové zbytky. Druhá, prostřední část je tvořena 61-95 zbytky a je známá jako neamyloidní složka. Tato část

je důležitá pro agregaci. Třetí část, C-koncová složka, tvořená rezidui 96-140 je hlavním fosforylačním místem [28].



Obrázek 5 Rozmístění domén a AMK sekvence alfa-synukleinu. Převzato a upraveno z [34].

Ačkoli je alfa-synukleín hlavně intracelulární protein (cytoplazmatická membrána, cytoplazma, jádro), můžeme ho najít i v tělních tekutinách, a to v krvi, likvoru a plazmě nebo na synapsi [27]. Je zvažován jako jeden z možných diagnostických markerů v časném stádiu Parkinsonovy choroby [27]. Nicméně jeho použití je potřeba ještě prověřit.

2.4.1. Agregace a toxicita alfa-synukleinu

Agregáty alfa-synukleinu je možné detekovat v různých typech buněk a intracelulárních prostorech [33]. Vytváří se ve 3 krocích. V prvním kroku dochází k omezení rychlosti, kterou měly být rozpustné nestrukturní proteiny přeměněny na částečně rozpustné oligomery. Následně oligomery agregují do nerozpustných fibril. Nakonec jsou formovány amyloidní fibrilární agregáty. Bylo zjištěno, že tyto agregáty jsou odolné vůči detergentům a částečně vůči působení proteinázy K [28].

Fibrily i oligomery vykazují značnou cytotoxicitu. Jsou zodpovědné za mitochondriální dysfunkci, endoplazmatický retikulární stres, dysfunkci proteazomového systému, fagocytózu a zánětlivou odpověď v mikroglíích, poškození membrány a synaptickou dysfunkci [28].

Dopaminergní neurony mají vysoké energetické nároky a vyšší oxidační stres, proto jsou velmi náchylné k nedostatečné mitochondriální funkci. Pro správnou funkci mitochondrií je důležitá translokáza vnější membrány (TOM20). Alfa-synukleín se váže

na TOM20 a inhibuje tak proteinový transport. Kromě toho ovlivňuje alfa-synuklein i hlavní kanál mitochondriální membrány, napětově závislý aniontový kanál VDAC, který je zodpovědný za tok většiny metabolitů. Oligomery synukleinu způsobují fragmentaci mitochondrií a apoptózu dopaminergních neuronů [28].

U endoplazmatického retikula dochází při akumulaci oligomerů alfa-synukleinu k indukcii chronického stresu. Oligomery inhibují i proteazomální systém. Mohou se přímo vázat na proteazom 20S a inhibovat proteazomální aktivitu proteolytického systému.

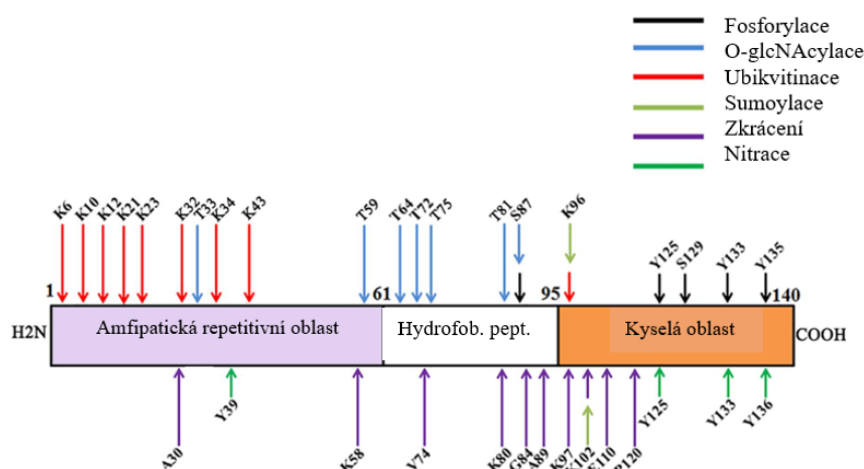
Alfa-synuklein také velmi ovlivňuje mikroglie a tím i fagocytózu. Mikroglie jsou malé buňky v centrálním nervovém systému podobné makrofágům, které jsou schopny fagocytózy, podílejí se na chemotaxi a produkují různé cytokiny. Extracelulární monomerní alfa-synuklein může podpořit a zvýšit fagocytózu mikroglíí. Pokud je ale alfa-synuklein agregován, dochází k její inhibici [28].

Také může, mimo jiné, způsobovat synaptickou dysfunkci, která je typickým jevem doprovázejícím Parkinsonovu chorobu. Jeho oligomery inhibují tvorbu SNARE komplexu. Dále inhibují mikrotubuly, které jsou důležité pro udržení neuronální homeostázy [28].

Agregáty tedy působí toxicky na buňky, vedou k jejich dysfunkci a degeneraci. Také mají schopnost šířit se do jiných oblastí mozku prostřednictvím přenosu z buňky na buňku prionovým způsobem [33]. To znamená, že podobně jako priony mohou v mozku šířit přes propojené neurony [35].

2.4.2. Posttranslační modifikace alfa-synukleinu

Protein může být posttranslačně modifikován několika způsoby – fosforylací, nitrosilací, oxidací, ubikvitinací, glykosylací, popřípadě glykací (Obrázek 6).



Obrázek 6 Posttranslační modifikace alfa-synukleinu. Převzato a upraveno z [28]. Zmiňované tyrosiny jsou označeny jako Y125, Y133, Y136 a Y39.

Nejvíce studována z těchto modifikací je fosforylace [29]. Posttranslační modifikace mohou výrazně ovlivnit agregaci a toxicitu alfa-synukleinu. Proto jejich zkoumání může pomoci objasnit patofyziologické rysy synukleinopatií.

Ne všechny posttranslační modifikace ale vedou k vyšší toxicitě. Některé vykazují ochranné účinky přerušením agregace nebo snížením buněčné toxicity [33]. Takovou PTM může být acetylace na methioninu (Met-1). Tento krok je nutný a velmi důležitý pro správné skládání proteinu [29; 31]. Studie, při které byl použit rekombinantní alfa-synuklein, zjistila, že při acetylaci dochází k rozšíření jeho α -šroubovicového vinutí a tím je zabráněno jeho agregaci [33]. Při této studii byl použit rekombinantní alfa-synuklein připravený v *E. coli* a purifikovaný na his tagu [36]. Výsledky byly porovnávány s alfa-synukleinem, který byl izolován z lidských erytrocytů, který tuto PTM již měl [37]. Dle nedávného výzkumu se na procesu agregace podílejí i kovové ionty a 3,4-dihydroxyfenylaldehyd [38; 34]. Vliv iontů byl hojně studován v souvislosti s rozvojem neurodegenerativních chorob, protože mnoho amylogenních proteinů je schopno vázat ionty kovů a s neurodegenerativními poruchami je často spojována systémová i tkáňová nerovnováha hladin iontů kovů [38]. U Parkinsonovy choroby byly studovány hlavně vlivy iontů Cu^{2+} a Fe^{3+} na agregaci alfa-synukleinu. Bylo zjištěno, že výrazně závisí na tom, jestli je acetylován nebo ne. V případě acetylce byl prokázán protektivní účinek Fe^{3+} iontů [38]. Kromě acetylce by mohla mít protektivní vliv i glykace.

Fosforylované jsou převážně serinové zbytky, a to v pozici 87 a 129. Kinázy zodpovědné za fosforylaci na Ser-129 jsou beta-adrenergní receptor kináza 1 (BARK1), serin/threonin proteinkináza (PLK2), G protein vázaná receptor kináza 5 (GRK5), kaseináza I a II (CKI, CKII) [29]. Právě fosforylace na Ser-129 je poměrně rozsáhlá u synukleinopatií a při *in-vitro* fosforylaci na serinu podporovala tvorbu nerozpustných fibril [29]. Pokud se při imunohistochemii použijí značené protilátky pro S129-fosforylovaný alfa-synuklein, jsou zvýrazněna Lewyho tělíska. Znamená to, že hyperfosforylace alfa-synukleinu by mohla přispívat k tvorbě těchto útvarů [26]. U některých buněčných modelů byla zaznamenána zvýšená tvorba fibril po fosforylaci Ser-129 pomocí CKII. U modelu *Drosophilla* se ukázala fosforylace Ser-129 pomocí GRK2 také jako toxická. Při studiích prováděných na transgenních myších byla ověřena neuroprotektivní role PLK2, která se váže přímo na alfa-synuklein a zajišťuje selektivní odklizení prostřednictvím lysozom-autofágní degradace. Proces je závislý na ATP [28]. Bylo tedy zjištěno, že stejná modifikace provedená jiným enzymem, má jiný účinek.

Alfa-synuklein může být fosforylován i na tyrosinu, a to v pozicích 39, 125, 133 a 136 [28; 39]. Za fosforylaci na Tyr-125 je zodpovědná převážně Fyn tyrosin kináza (FYN) [29]. Řada kináz, zprostředkovávající fosforylaci na Tyr-125 je ale zatím stále neznámá. Zároveň se stále nepodařilo prokázat, zda má fosforylace na tyrosinu 133 a 135 vliv na agregaci alfa-synukleinu. Fosforylace na Tyr-125 vliv na agregaci nemá [28]. Řada výzkumů ale prokázala, že právě hyperfosforylace na tyrosinu 39 má na tvorbě agregátů velký vliv [39; 40; 41].

Residua tyrosinu mohou být také modifikována nitrací. Dochází k ní při působení kyslíku a oxidu dusného na rezidua tyrosinu. Všechna 4 rezidua v alfa-synukleinu jsou náchylná na nitraci [28]. Může také dojít k zesíťování tyrosinu na stabilní oligomery [29]. Tyto procesy rovněž přispívají k tvorbě charakteristických lézí u synukleinopatií [29].

Bylo zjištěno, že alfa-synuklein, který je součástí Lewyho tělísek je velmi často ubikvitován. Jeho všudypřítomná, převažující struktura je diubikvitinovaná [29]. Nicméně se předpokládá zapojení ubikvitinace i do patologického procesu. Do ubikvitinace alfa-synukleinu jsou zapojeny 3 ubikvitin-protein ligázy CHIP, SIAH a Nedd4 [28].

Posttranslačních modifikací ovlivňujících vlastnosti alfa-synukleinu je tedy celá řada. Jejich přítomnost výrazně ovlivňuje jeho agregaci a toxicitu. Výzkum posttranslačních modifikací nám může pomoci pochopit příčiny některých neurodegenerativních chorob a zároveň přispět k vývoji nových terapeutických přístupů. Je ale třeba myslet na to, že dosavadní experimenty byly většinou prováděny *in-vitro*, takže zjištěné poznatky by nemusely platit *in-vivo*. Dalším problémem je, že většina proteinů je přirozeně multifosforylovaných a pokud je chceme nechat fosforylovat *in-vitro* pomocí kináz, můžeme se setkat s tím, že kinázy budou interagovat mezi sebou a ovlivňovat svoji aktivitu. Tato problematika zůstává do budoucna výzvou.

2.4.3. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je dnes poměrně běžná chronická progresivní neurodegenerativní choroba postihující převážně starší osoby [42]. Obvykle se objevuje po dosažení věku 50 let, ale jsou známy i formy, které začínají v mladším věku a většinou se tyto formy projevují atypicky [29]. Jedná se o druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění [43]. V roce 2016 bylo na světě přibližně 6,1 milionu osob s touto nemocí. Během posledních 20 let se výskyt a prevalence tohoto onemocnění v populaci rychle zvýšily. Z dat vyplývá, že by Parkinsonova choroba mohla být nejrychleji rostoucím neurodegenerativním onemocněním na světě [44]. Zatím však nejsou známy přesné příčiny tohoto nárůstu [44]. Většina případů je sporadická,

nejspíše tedy bude příčina rozvoje multifaktoriální a vliv budou mít enviromentální i genetické faktory [29].

Jednou z diskutovaných příčin nárůstu je stárnutí populace, nicméně rozvoj nemoci nejspíše nesouvisí pouze se stářím. Dalšími diskutovanými příčinami jsou genetické predispozice či znečištění životního prostředí pesticidy nebo jinými chemikáliemi [44]. Některé formy Parkinsonovy choroby mohou být dědičné [44]. Je známo, že onemocnění je způsobeno variantami ovlivňující gen PARK1 a PARK4 a jde o autozomálně dominantní chorobu [29]. Tato choroba také častěji postihuje muže, traumatické poranění také zvyšuje pravděpodobnost výskytu. Nicméně není žádný ukazatel, který by pomohl vyjasnit přesnou příčinu jejího rozvoje [45].

Tato komplexní neurodegenerativní porucha je charakterizována bradykinezi, klidovým třesem, svalovou rigiditou, posturální nestabilitou dále dystonickými křečemi nebo demencí. V ojedinělých případech se mohou přidat halucinace nebo paranoia [29; 46]. Onemocnění je doprovázeno ztrátou dopaminergních neuronů v *substantia nigra pars compacta* [43]. Kvůli tomu je poté nedostatek dopaminu na synapsích a dochází k poruše šíření vzruchu. Jedná se tedy o presynaptické postižení. K urychlené smrti a vymizení těchto neuronů přispívá nejspíše souhra několika faktorů [44]. Typicky se u této nemoci objevuje alfa-synuklein, což je presynaptický protein, který by mohl přispívat k patogenezi několika způsoby [26]. Typicky ale dochází vlivem hyperfosforylace k hromadění nefunkčního proteinu. Protože funkčního proteinu je málo, buňka vyrábí stále další. Z počátku je část likvidována v proteozomu, ale později protein agreguje a objevují se tak útvary typické pro Parkinsonovu chorobu – Lewyho tělíska. Jde o intraneuronální akumulace agregovaných proteinů [46].

Dále se na rozvoji podílí dysfunkce mitochondrií, lysozomů nebo transportu vezikul a neurozánět, který se rozvíjí v důsledku snahy imunitního systému odstranit atypické struktury z tkáně, přitom ale organismus poškozuje vlastní buňky [44]. Na lysozomální dysfunkci se navíc podílí i další kináza (LRRK2). V posledních letech se zkoumá řada jejích inhibitorů. Při její nadměrné aktivitě dochází ke zvýšené fosforylaci, a tedy i aktivaci Rab GTPáz, které se velkou měrou podílejí na regulaci sekrečních a endocytárních drah [47]. Tato kináza působí jako spouštěč lysozomální dysfunkce [47].

Předpokládá se, že na rozvoj nemoci v raných stádiích může mít vliv i nervová hyperaktivita. Nejhojnějším excitačním neurotransmiterem v CNS je glutamát a změna jeho homeostázy má za následek neurotoxicitu. Nadměrné uvolňování glutamátu do *substantia nigra pars compacta* má za následek aktivaci aktivaci glutamátových receptorů, příliv Ca^{2+} a díky tomu jsou spuštěny různé destruktivní kaskády. Zvýšená neuronální aktivita pak zvyšuje

uvolňování alfa-synukleinu [45]. Neuronální exitotoxicita hraje nejspíše zásadní roli při rozvoji Parkinsonovy choroby.

Bylo také zjištěno, že alfa-synuklein inhibuje mitochondriální komplex I, podobně jako toxiny z vnějšího prostředí a zvyšuje tím pravděpodobnost Parkinsonovy choroby [43]. Není ovšem jasné, zda alfa-synuklein a získané poškození mitochondriálního komplexu I jsou příčinou rozvoje nemoci nebo doprovodným jevem [43].

Stanovení diagnózy je většinou složité a trvá několik měsíců [48]. Parkinsonova choroba je často spojena i s jinými chorobami, a navíc nelze s jistotou určit, zda se jedná právě o ni nebo o jinou chorobu. Zatím totiž nejsou k dispozici žádné spolehlivé diagnostické markery, které by lékařům při určení diagnózy pomohly, a proto je většinou stanovena na základě klinických projevů, i když ty jsou často velmi variabilní a nespecifické. Typicky se vyskytuje tetráda bradykineze, klidový třes, rigidita (ztuhlost) a posturální instabilita [42; 44]. Ovšem postupem času, jak nemoc progreduje se přidávají další příznaky. Objevovat se mohou i deprese [44].

Jednoznačně potvrdit Parkinsonovu chorobu lze až pomocí imunohistochemie po zhotovení histologického preparátu [26]. Typická je přítomnost Lewyho tělísek (Obrázek 7), což jsou intraneuronální inkluze s alfa-synukleinem v cytoplazmě blízko jádra [43]. Poměrně novým zjištěním je, že se podobné patologické změny mohou v časných fázích onemocnění objevovat i ve více orgánech, a nejen v mozku. Například v kůži, tlustém střevě nebo slinných žlázách. To naznačuje, že by Parkinsonova choroba mohla být multisystémové onemocnění [44].



Obrázek 7 Lewyho tělíska v nervové tkáni. Převzato z [49].

Během posledních 5 let se začínají hromadit informace, že se na rozvoji Parkinsonovy choroby může podílet i tau protein, který je primárně spojen s Alzheimerovou chorobou [45].

Tau protein i alfa-synuklein jsou si v mnohém velmi podobné. Oba proteiny se v mozku vyskytují ve velmi hojné míře, mají vlastnosti podobné prionům (mohou šířit nesprávně poskládanou konformaci). Oba proteiny navíc mohou navzájem urychlit agregaci [45].

Léčba Parkinsonovy choroby je poměrně problematická a v současné době je spíše symptomatická. Nemoc jako taková je nevléčitelná, lze ale zmírnit její progresi. Existuje sice možnost dodávat chybějící dopamin, ale ani v tomto případě nedochází k významnému zlepšení stavu pacienta [42]. Navíc postupem času se u pacienta rozvíjí závislost na dopaminu a vyžaduje tak podávání stále vyšších dávek.

2.5. Myelinový bazický protein MBP

Myelinový bazický protein se nachází na myelinové pochvě v centrální nervové soustavě, kde hraje roli při jejím formování a stabilizaci. Spolu s alfa-synukleinem a tau proteinem patří mezi nejhojnější proteiny v CNS. Již dlouhou dobu je studován jako faktor patogeneze autoimunitního neurodegenerativního onemocnění - roztroušené sklerózy [50].

Tento protein má 9 izoform. Nejméně modifikovaná a nejhojnější izoforma je C1. Dále existují izoformy C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8-A, C8-B [51]. Izoformou ale může být i větší množství. Menší izoformy nejspíše hrají roli při remyelinizaci axonů u roztroušené sklerózy. Druhá, neklasická skupina izoform může podílet na transkripčních procesech nebo na signalizaci drah v T-lymfocytech a nervových buňkách. Toto poměrně široké spektrum izoform vzniká díky volitelným posttranslačním modifikacím [51]. Izoforma C1 má nejméně PTM, naproti tomu izoforma C8 má velké množství PTM. Proto má nejzápornější náboj. Každý z izomerů má specializovanou funkci. Protilátková a buněčná imunita zaměřená proti MBP se vyskytuje u roztroušené sklerózy.

Protein má celkem 304 aminokyselin, které mohou být modifikovány fosforylací, deaminací asparaginu nebo glutaminu, citrulací argininu nebo metylací. U izoform 3, 4, 5 a 6 je odstraněn methionin a alanin na N-terminálním konci je acetylovaný. Náboj proteinu závisí na poměru metylovaných zbytků argininu, a protože ten se během stárnutí snižuje, kladný náboj proteinu se zvyšuje. Nejvíce kladná je izoforma C1, nejméně pak C8-B [51].

Protein může být fosforylován na několika místech pomocí serin/threonin proteinázy TAOK2, VRK2, mitogenem aktivovaná proteinkinázou 11, 12 a 14 (MAPK11, MAPK12 a MAPK14) a deformovanou kinázou 1 (MINK1) [51].

2.5.1. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému postihující zejména ženy v mladém věku (20-40 let) [52; 53]. Výjimečně se může objevit před 18. rokem života nebo po 50. letech života [54]. Jde o multifaktoriální, autoimunitní, demyelinizující, neurodegenerativní onemocnění s neznámou patogenezi [50]. Toto onemocnění je nejčastější příčinou invalidity mladých dospělých. Postihuje zhruba 2,3 milionů lidí po celém světě. Nejrozšířenější je v severní Americe a Evropě, naopak nejnižší prevalence roztroušené sklerózy je v oblasti subsaharské Afriky a v Asii [55].

Onemocnění je doprovázeno zánětem, demyelinizací nervových vláken, a jejich přerušení. V některých případech se může myelinová pochva znovu vytvořit a obalit axon [50].

Pokud ale dojde k jeho přerušení, porucha je trvalá a dochází k zániku vedení [54]. Projevy nemoci jsou pak velmi rozmanité, protože závisí na poškozené nervové dráze. Většinou se ale vyskytuje porucha zrakového pole, která někdy může končit slepotou. Je to z důvodu postižení zrakového nervu. Dále se může vyskytovat porucha hybnosti, která může postihovat jednu až všechny čtyři končetiny. Pacienti pak mají problém s jemnější motorikou nebo s chůzí, často při ní potřebují oporu [54]. Postupné přerušení axonů a demyelinizace vede k dysfunkci mozkového kmene a mozečku, které jsou zodpovědné za rovnováhu. Proto je dalšími častými projevy nevolnost, problémy s chůzí a třes rukou. Dále se objevuje i mravenčení nebo necitlivost končetin [54].

Roztroušená skleróza je považována za autoimunitní onemocnění. Na patogenezi se podílejí autoreaktivní Th1 a Th17 lymfocyty. Dosud není znám antigen, který reakci spouští, nicméně po kontaktu s ním dochází ke spuštění reakce, při které jsou produkovány prozánětlivé cytokiny, interleukin 1 a 17 a interferon gama. To vede k up-regulaci, další produkci cytokinů a aktivaci buněk a porušení hematoencefalické bariéry, což umožní buňkám migrovat do CNS [53]. Kromě těchto buněčných mechanismů je roztroušená skleróza podmíněna i změnami v humorální imunitě. Často jsou v lézích v mozku nalézány B lymfocyty, plazmatické buňky a protilátky [52].

Protilátky jsou u roztroušené sklerózy brány většinou jako patogenní. Nejspíše mají vliv na demyelinizaci. Nejspíše jsou cílené na myelinové nebo oligodendrocytární proteiny, a to na myelinový bazický protein, proteolipidový protein, glykoprotein sdružený s myelinem a myelinový oligodendrocytární protein [54]. Právě MBP, který má mezi myelinovými proteiny největší zastoupení (asi 1/3) je považován za hlavní cíl imunitní odpovědi. Nález protilátek v séru nebo likvoru pacientů je ale spíše považován za ukazatel neurologického poškození než za primární příčinu nemoci [54].

Dle studií by za rozvojem roztroušené sklerózy mohla být porucha funkce non-receptorových tyrosin kináz. Tato porucha má pak za následek patologickou aktivaci T a B lymfocytů [12].

Diagnóza RS se provádí kombinací klinických a radiologických příznaků. Základem diagnózy je 5 klíčových znaků. Často je ale problém onemocnění diagnostikovat, pokud má pacient atypické příznaky. Léčba onemocnění není v současné chvíli možná. Existují pouze různé choroby modifikující terapie [56].

2.6. Tau protein

Tau protein, známý také jako s mikrotubuly asociovaný protein Tau (MAPT), je zodpovědný za skládání a stabilitu neuronů a také za udržování polaritu neuronů [57]. Většinou se vyskytuje v axonech neuronů, v cytosolu [58]. Funguje jako spojovací protein. Jeho C-konec se váže na axonální mikrotubuly a N-konec se váže na složky nervové plazmatické membrány [58]. Tau protein je složen z 758 aminokyselin a jeho celková velikost je 79 kDa. Gen tau se nachází na chromozomu 17 (přesněji na 17q21) [59]. Protein má 9 izoform, které jsou produkovány na základě alternativního sestřihu. Isoformy se od sebe mohou lišit přítomností nebo nepřítomností 5 exonů z celkových 15. Jedna je exprimována v periferním nervstvu, zatímco ostatní jsou exprimovány v centrálním nervovém systému [58]. Jeho přesná fyziologická funkce v mozku zatím není známa [59].

Tau protein je hojně spojován s rozvojem Alzheimerovy choroby. Jeho hyperfosforylované formy jsou hlavním znakem tohoto onemocnění. Abnormální akumulace fosforylovaného tau proteinu je patologickým markerem i u dalších primárních a sekundárních tauopatií [60]. Primární tauopatie jsou onemocnění, u kterých hraje tau protein hlavní roli. Patří sem frontotempolární lobární degradace tau, sporadická mnohočetná systémová tauopatie, Pickova choroba [61]. Do sekundárních tauopatií spadají onemocnění jako Alzheimerova choroba, chronická traumatická encefalopatie, Creutzfeld-Jakobova choroba. Tau protein významně přispívá k jejich patogenezi, ale není primární příčinou [61].

Pochopení chování proteinkináz, které Tau fosforylují se zdá být klíčovým pro vývoj nových léků a léčbu Alzheimerovy choroby [62]. Kinázy, které po aktivaci způsobují agregaci tau proteinu jsou glykogensyntázová kináza 3 β , cyklin-dependentní kináza 5, P38 mitogenem aktivovaná protein kináza, stresem aktivovaná kináza, aminoterminální kinázy. Na agregaci může mít vliv i inaktivace některých fosfatáz, a to tau fosfatázy, proteinové fosfatázy 2A [59].

Tento protein lze použít i jako biomarker. Jeho rozpustná forma je přítomna v mozkomíšním moku zdravých jedinců i nemocných. Jeho koncentrace má vztah ke stavu onemocnění [60; 63]. Výskyt tau proteinu není ale omezena jen na neurony v CNS. Vyskytuje se i v jiných strukturách a vykonává zde různé funkce. V defosforylovaném stavu může chránit DNA před poškozením. Jeho hyperfosforylovaná forma narušuje transport z jádra do cytoplazmy. Dochází k tomu kvůli interakci hyperfosforylovaného proteinu s jadernými póry [45].

2.6.1. Posttranslační modifikace tau proteinu

U tau proteinu byly identifikovány četné posttranslační modifikace. Studie se většinou zaměřují na patologické formy, nicméně vyskytují se i ve fyziologických podmínkách [61].

Mezi nejdůležitější posttranslační modifikace tau proteinu patří fosforylace. Může být fosforylován na reziduích serinu, threoninu i tyrosinu. Tau protein je velice složitý fosfoprotein, dokonce jeden z nejsložitějších. Ve své struktuře má velký počet míst, na kterých může proběhnout fosforylace, a to celkem 85. Z tohoto množství je 45 zbytků serinu, 35 threoninu a 5 tyrosinu [62]. Bylo zjištěno, že fosforylace na Ser-579 ovlivňuje schopnost vázat a stabilizovat mikrotubuly [58]. Pro většinu těchto reziduí jsou známy i kinázy, které je mohou fosforylovat. Existuje 5 reziduí, u kterých nejsou kinázy známy a není známa ani jejich funkce nebo případný podíl na rozvoji chorob. Objev těchto kináz je nejspíše nezbytný pro pochopení patogeneze a vývoj léčebné strategie neurodegenerativních chorob [62]. Některé fosforylace tau proteinu mohou inhibovat jeho agregaci [60]. Za fyziologického stavu je fosforylace koordinována činností kináz a fosfatáz a je reverzibilní. Neurony tak mají přirozenou hladinu fosforylace [60].

Další PTM, acetylace a ubiquitinace, se vyskytují hlavně na reziduích lysinu. Acetylace je často *in-vitro* zkoumanou modifikací lysinu a argininu, které mohou zvyšovat jeho agregaci. Tau má nejspíše vnitřní acetyltransferázovou aktivitu a podléhá vlastní acetylaci [61]. Ubikvitinace je důležitá PTM v eukaryotických buňkách, která se podílí na homeostáze proteinů. Často se vyskytuje i v místech bohatých na prolin [60]. Hlavním místem je Lys-48, dochází ale také k ubiquitinaci spojené s Lys-6 a Lys-11. Nicméně kvůli tomu, že ubiquitinace silně zvyšuje degradaci agregovaného tau proteinu, je poměrně těžké ji detekovat [60; 59]. Je možná i O-glykosylace nebo methylace, vyskytují se ale ve velmi malém množství. O-glykosylace se vyskytuje hlavně na serinu nebo threoniu a dost často na stejných místech dochází i k fosforylaci. Methylace se vyskytuje převážně na reziduích lysinu [60].

U tau proteinu je možná i neenzymatická modifikace – glykace. Jde o kovalentní vazbu mezi cukrem a aminoskupinou proteinu a vytvoření ketoaminu. Následně může docházet k oxidaci a zesíťování což může mít vliv na stabilizaci agregátů tvořících spleť párových šroubovicových vláken [58].

Při studiích zkoumající PTM tau proteinu, byly zjištěny modifikace na 55 různých fosforylačních místech, 19 acetylačních, 17 ubiquitinačních a 4 metylačních místech [60].

2.6.2. Alzheimerova choroba

Toto progresivní neurodegenerativní onemocnění patří v dnešní době mezi nejrozšířenější. Odhaduje se, že po celém světě postihuje 60-80 % lidí trpící demencí [62]. V současné době (2019) postihuje přibližně 50 milionů lidí po celém světě [64]. Onemocnění je definováno rozsáhlou ztrátou neuronů a vytvářením proteinových depozit mozku, která jsou tvořena amyloidními plaky a intracelulárními neurofibrilárními spleťmi [57]. Ty jsou způsobené hyperfosforylací tau proteinu.

Během posledních let dochází k velkému nárůstu počtu lidí trpících tímto onemocněním, zatím však pořád není známá příčina. Existují dědičné formy, velká část se ale šíří sporadicky, vliv mohou mít i environmentální faktory [64; 65]. Jedná se zřejmě o multifaktoriální onemocnění. Pravděpodobně se na tomto onemocnění podílí mitochondriální dysfunkce, oxidační stres, narušení autofagie, chronický stres endoplazmatického retikula a závažné metabolické problémy vedoucí k masivní neuronální apoptóze [65]. Tyto všechny věci vedou poškození neuronů a ztrátě synapsí. Toto pak vede u pacientů ke zhoršení kognitivních funkcí [65]. Dále dochází k progresivnímu poklesu paměti, dezorientaci, pacient se postupem času není schopný postarat sám o sebe, trpí změnami osobnosti. Prvním příznakem začínajícího rozvoje Alzheimerovy choroby je porucha krátkodobé paměti [64].

Tau protein může ovlivnit mitochondriální funkci na několika úrovních, a to u transportu, morfologie a bioenergetiky. Má vliv na mitochondriální komplex I. V důsledku toho dochází ke zvýšené produkci ROS a k peroxidaci lipidů, ke změnám mitochondriální dynamiky a zhoršené oxidační fosforylaci. Objevuje se snížená aktivita pyruvát dehydrogenázy, snížené buněčné dýchání, zhoršená regulace proteinů krebsova cyklu, antioxidantních proteinů. [65]. Chronický stres pak měl za následek poškození neuronů prefrontální kůry.

Tau patologie u tohoto onemocnění začíná často v odlišných oblastech mozku, a to v entorhinální kůře a hipokampu [65]. Odtud se šíří mozkiem v nepředvídatelném směru [60]. U pacientů lze často nalézt neurofibrilární spleti, které se skládají z hyperfosforylovaných vláken Tau proteinu [66]. Neuronální cytoskelet v mozku je postupně nahrazován spleťmi párových šroubovicových vláken [58]. Právě fosforylace tohoto proteinu vede ke změně jeho vazebné afinity k mikrotubulům a k indukci agregace proteinů [62]. Není přesně daný určitý fosforylační vzorec, ale existují místa, která mají k fosforylaci sklon. Těmito místy jsou Tyr-231, Ser-235 a Ser-262 [60]. Hyperfosforylace pak ovlivňuje rozpustnost proteinu a dochází k tvorbě fibril.

V dnešní době sice existuje několik léků na Alzheimerovu chorobu. Žádný z nich ji ale nedokáže účinně léčit. Většinou jen zpomalují progresi onemocnění. Těmito léky jsou inhibitory acetylcholinesterázy a memantin. Oba regulují aktivitu neurotransmiterů [64].

2.7. Imobilizované kinázy

Studium aktivity kináz *in-vitro* není rutinní metodou. Není důvod aktivitu kináz sledovat rutinně, a proto je sledována hlavně ve výzkumných centrech. Metod pro detekci je v současné chvíli poměrně dost, dá se použít MS, pIMAGO detekce, detekce se specifickými protilátkami anebo tradiční metoda s použitím radioaktivně značeného ATP. Komplikace při detekci ale může představovat několik vlastností kináz. Tou hlavní je citlivost kináz na změnu vnějšího prostředí. Kinázy jsou náchylné na změnu teploty i změnu pH. Také je velmi složité regulovat jejich aktivitu. Zároveň i jejich skladovací stabilita v čase výrazně klesá. Jedním z posledních problémů je, že při použití volné kinázy je po provedení fosforylace potřeba její odstranění z roztoku [67]. Výhodným řešením je navázat enzymy na pevný povrch (magnetické částice) a experimenty provádět s imobilizovanými kinázami [67]. Lze je použít k fosforylaci rekombinantních proteinů či peptidů *in-vitro* a po ukončení reakce je oddělit ze směsi pomocí magnetického pole. Získáme tak fosforylované produkty s minimální kontaminací enzymy [68; 69]. Takto upravené enzymy jsou odolnější, a i v organickém prostředí si zachovávají svoji aktivitu. Mohou se tak použít pro katalýzu reakcí na hydrofobních substrátech anebo v přítomnosti organických rozpouštědel [67]. Navíc magnetické částice s navázaným enzymem si zachovávají svou aktivitu a mohou tak být použity opakovaně [70; 71]. Díky opakovanému použití imobilizovaných enzymů je provedení experimentu levnější. Výhodná je i možnost rychlého zastavení reakce odstraněním enzymu ze směsi a zlepšení stability enzymu vůči teplotě, rozpouštědlům, pH, kontaminantům a nečistotám [70]. Imobilizace je tedy jednou z metod, která přispívá k lepšímu využití kináz v analýzách a snižuje náklady na analýzy navzdory nákladům, spojených s jejich výrobou [70; 72]. V poslední době jsou imobilizované enzymy v analýzách upřednostňovány [72]. V některých případech je imobilizace enzymu nutností [71].

Kinázy mohou být imobilizovány na pevný povrch pomocí nejrůznějších metod. Techniky imobilizace lze dle principu vazby rozdělit na fyzikální a chemické. Fyzikální metody jsou charakteristické slabšími interakcemi. Těmito interakcemi jsou především Van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce, iontová vazby nebo vodíkové vazby [70; 71]. Tato poměrně slabá vazba by neměla změnit strukturu proteinu nebo jeho aktivitu [67]. U chemických metod je zase podstatou tvorba kovalentní vazby mezi modifikovaným povrchem nosiče a enzymem [70]. Nicméně ani jedna metoda není ideální pro všechny enzymy a může docházet k stérickému bránění aktivního místa. Tento problém se povedlo minimalizovat u afinitní imobilizace, kde se využívá specifických afinitních vazeb [73].

Na tomto principu jsou založeny rekombinantní enzymy glutathion-S-transferáza (GTS), histidin (His), či protein vázající maltózu. Ty mohou vytvářet afinitní interakce se specifickými ligandy jakými jsou glutathion (GSH), Ni či maltóza, které jsou na povrchu pevné fáze [73].

I když je možné pevné fáze různě modifikovat a vhodně připravit pro vazbu enzymů, ne všechny enzymy lze pro imobilizaci použít.

2.7.1. Metody imobilizace

Jak již bylo zmíněno výše, kinázy mohou být imobilizovány na základě fyzikálních nebo chemických metod. Fyzikální adsorpce je metoda reverzibilní imobilizace, enzymy jsou adsorbovány na povrch. Tato metoda je nejjednodušší, nejrychlejší a nejlevnější způsob imobilizace enzymů s poměrně vysokou katalytickou aktivitou [69]. K adsorpci dochází na základě slabých, nespecifických sil jako jsou Van der Waalovy síly, hydrofobní interakce nebo vodíkové vazby, případně iontovými vazbami [70; 72]. Vazba na nosič je reverzibilní, za vhodných podmínek mohou být enzymy odstraněny. Pokud tedy již enzym není aktivní, lze ho vyměnit a nosič používat opakovaně. Nevýhodou tohoto způsobu imobilizace je únik enzymu z nosiče [70]. Imobilizace na principu adsorpce většinou zahrnuje inkubaci nosiče v roztoku s enzymem nebo se roztok enzymu nechává zaschnout na povrchu elektrod [72].

Další způsob imobilizace využívá afinitní vazbu mezi specifickými molekulami. Ty může představovat GST tag a glutathion modifikovaný na magnetických kuličkách. Kromě toho lze také využít specifické vazby histidinové kotvy s bivalentními kovovými ionty na magnetických částicích [68]. Často je tento způsob vazby řazen do metod fyzikální adsorpce, kde se využívá specifické vazby mezi komplementárními biomolekulami [70].

Další z fyzikálních metod imobilizace je zachycení enzymů v nosiči nebo uvnitř jeho vláken, do polymerní sítě, membrány nebo mikrokapsle [69]. Tato metoda imobilizace je ireverzibilní. Tento způsob zajišťuje lepší mechanickou odolnost systému a zamezuje vyplavování enzymu [70]. Volbou nosiče se výrazně ovlivní prostředí, ve kterém enzym funguje. Zachycení do nanostrukturních nosičů, kterými mohou být elektrolyticky uspořádaná nanovlákná bylo hojně používáno v oblastech chemie, biomedicínských biosenzorů [72].

Zesíťování je další fyzikální metodou, která zabraňuje vyplavování enzymu ze systému. Jde o vytvoření vazeb, zesíťování molekul enzymu mezi sebou. K tomu se používají různá činidla, nejčastěji glutaraldehyd. Tato metoda tedy nepotřebuje k imobilizaci nosič. To odstraňuje nevýhody spojené s použitím nosiče. Tou hlavní je, že při použití nosiče dochází ke snižování aktivity enzymu v důsledku jejího ředění. Při zesíťování získáme pouze čistý enzym [70].

Kovalentní vazba je nejpoužívanější metodou imobilizace. Spadá do chemických metod. Mohou jí být připojeny enzymy například na magnetické kuličky s modifikovaným povrchem, kde může být aldehydická, karboxylová, hydroxylová skupina nebo aminoskupina [74]. Vazba pak vzniká mezi karboxylem, resp. aldehydem a volnými aminoskupinami v molekule enzymu [68; 72]. Pro aktivitu enzymu je rozhodující orientace kovalentní vazby. Nejvyšší aktivitu si enzym zachovává, pokud do vazby nejsou zapojeny AMK v aktivním centru molekuly enzymu [70].

Každá z metod vazby má své výhody i nevýhody. Proto je třeba zvolit metodu podle toho, zda bude vhodná k použitému enzymu.

2.7.2. Nosiče

Cílem imobilizace je vazba enzymu na nosič a zachování jeho aktivity. Proto je důležité před samotnou imobilizací zvážit vlastnosti enzymů i nosičů. Hlavně je důležité si zjistit, jak jsou uspořádány, jaké mají funkční skupiny, náboj a jestli je daný nosič pro enzym vhodný [75]. Po imobilizaci enzymů se často provádí blokace volného povrchu nosičů za účelem snížení nespecifické interakce mezi analyty a stabilizace enzymu. K dispozici je celá řada blokujících činidel, z hlediska dostupnosti a ceny se nejčastěji používá BSA [75].

Jako nosič lze použít prakticky jakýkoli materiál, ať už jde o organický nebo anorganický, který bude mít dobrou biokompatibilitu [76]. Ideální matrice by měla mít vlastnosti jako je inertnost, stabilita, schopnost regenerace, schopnost snížit inhibici produktu nebo nespecifickou adsorpci a zvýšit specifitu a aktivitu enzymu [72]. Při výběru materiálu rozhoduje jeho cena, dostupnost a stabilita ve specifických podmínkách. Často je potřeba vzít v úvahu využití imobilizovaného enzymu a podle toho zvážit a vybrat velikost částic, jejich povrch, strukturu případně typ funkčních skupin [69]. Důležité je také zvážit, zda je daný typ materiálu vhodný pro enzym. Neexistuje totiž univerzální materiál vhodný pro všechny enzymy a jejich použití [76].

Z anorganických materiálů se používá oxid křemičitý, hydroxyapatit [67; 74]. Oproti polymerním materiálům mají tu výhodu, že jsou velmi stabilní a vysoce odolné vůči kyselinám i zásadám. Často se pro svou odolnost používají jako nosiče pro HPLC [76].

Organické materiály zahrnují přírodní i syntetické látky. Často se používá chitin, chitosan, celulóza, kolagen, karagenan a některé syntetické polymery jako polystyren, divinylbenzoová pryskyřice [72]. Dále lze použít i látky jako glutaraldehyd, bisdiazobenzidin nebo hexamethylendiisokyanát [72]. I když mají syntetické materiály dobré fyzikální a chemické vlastnosti, ukázalo se, že pro udržení aktivity enzymů je lepší použít například

polysacharidy. Nejslibněji se jeví chitosan, který je vhodný pro imobilizaci enzymů, neovlivňuje výrazně jejich aktivitu. Často se používá v kombinaci s alginátem, aby se zabránilo uvolňování enzymu z nosiče [72]. Problémem je jeho nestabilita ve vodném prostředí, kdy dochází k jeho bobtnání. Proto je připravován hybridní chitosan spolu s SiO₂ [76].

Aby se ještě zlepšily vlastnosti materiálů používaných pro imobilizaci, jsou možné i nejrůznější modifikace jejich povrchů. K imobilizaci se používají magnetické částice, protože jejich použití má celou řadu výhod. Takovými mohou být magnetické částice Sera-Mag Speed Beads modifikované karboxylovou skupinou. Existují i částice s aldehydovými, Ni²⁺, Co³⁺ funkčními skupinami [68]. Tyto částice mají velký povrch, vysokou vazebnou kapacitu, citlivost, stabilitu. Výhodou je jejich rychlá reakční kinetika a rychlá doba magnetické odezvy, a hlavně nízká nespecifická vazba a jednoduchá manipulace se vzorkem a jeho snadná separace pomocí magnetického pole. Takže mohou být ze vzorku snadno odstraněny a předchází se kontaminaci fosforylovaných produktů nebo takto mohou být kinázy jednoduše vyměněny [68]. Vazbou na magnetické částice by nemělo docházet k ovlivnění aktivitu nebo specifitu kinázy. Částice jsou veliké přibližně 1 μm. Jejich jádro je vyrobeno ze styrenu pomocí polymerace. Na toto jádro je pak následně nanesena jedna nebo dvě vrstvy magnetitu. Celá částice je upravena tak, aby se předcházelo nespecifické vazbě proteinů. Povrchová modifikace pomocí karboxylové skupiny umožňuje kovalentní vazbu nejen pro proteiny ale i pro ostatní biomolekuly jako jsou nukleové kyseliny. Částice mají široké spektrum použití například pro přípravu vzorků, v proteomice, pro izolaci nukleových kyselin nebo pro imunotesty.

2.7.3. Využití imobilizovaných enzymů

Enzymy imobilizované na magnetické částice mohou mít díky snadné manipulaci celou řadu využití. Kinázy mohou být využity pro *in-vitro* fosforylaci peptidů a proteinů. Kde se dají využít pro fosforylaci, následně ze vzorku odstranit. Částice mohou být opakovaně použity a vzorek lze analyzovat na MS s minimální kontaminací kinázy. To je velká výhoda oproti použití volné kinázy.

Různé proteázy imobilizované na magnetické částice se mohou použít při kapilární elektroforéze. Bylo zjištěno, že magnetické částice za vhodných podmínek vytváří v kapiláře síť [77]. Prvně jsou do kapiláry nadávkovány částice s imobilizovaným enzymem. Následně může být na kolonu nadávkován vzorek, který je při průchodu kolonou štěpen enzymem. Použití imobilizovaných enzymů tedy přináší celou řadu výhod.

2.8. Metody detekce fosforylace

Pro studium aktivity proteinkináz lze použít několik metod, je ale třeba dbát na jejich účinnost a citlivost. Existují testy založené na radioaktivních nebo povrchově-plazmových rezonančních technikách (SPR). Ty jsou sice velmi citlivé, stanovení rychlé a výborné pro provádění výzkumů. Nicméně je potřeba nákladných přístrojů, složitých procesů. Většina metod je založená na použití ATP, které je značeno radioizotopem nebo biotinem, dále na použití protilátek nebo proteinů vázající fosfáty [78]. V případě přípravy specifických protilátek je třeba vyrobit protilátky vždy pro každou jednotlivou fosforylaci na proteinech [78].

Některé metody detekují všechny fosforylace na proteinu nebo peptidu, nezávisle na tom, na jaké AMK je fosfátový zbytek. Takovou metodou je například pIMAGO. Další a nepoužívanější metodou detekce jsou metody hmotnostní spektrometrie.

2.8.1. Western blot s následnou imunodetekcí fosfoproteinů na membráně

Detekce fosforylace proteinů imobilizovaných na membráně po provedení Western blotu je dnes běžnou metodou. Proteiny ve vzorku se nejprve rozdělí pomocí SDS-PAGE elektroforézy podle své molekulové hmotnosti. Následně dojde k jejich přenosu na nitrocelulóзовou membránu, kde mohou být po blokaci detekovány pomocí fosfo-specifických protilátek [79]. Dají se detekovat fosforylované formy tyrosinu, serinu, threoninu.

Navzdory poměrně širokému rozšíření má tato metoda několik nedostatků. Jedním z nich je nedostatek kvalitních fosfo-specifických protilátek [80]. Dále pak znalost místa fosforylace, specifické aminokyselinové sekvence. Specifické anti-fosfoprottilátky se jsou schopné navázat pouze na určité aminokyselinové sekvence. Pokud místo fosforylace není známé, nejsou dostupné příslušné protilátky. Proto tuto metodu lze použít pouze na známé fosforylace. Dalším drobným nedostatkem je poměrně vysoká cena specifických protilátek. Pro každé místo fosforylace musí být protilátka vytvořena. Nakonec jsou také drobným nedostatkem této metody zdlouhavé procesy inkubace membrány s protilátkami [73].

2.8.2. pIMAGO

Metoda využívající specifitu dendrimeru pIMAGO pro detekci jakéhokoli fosfoproteinu není na rozdíl od imunodetekce založena na specifických protilátkách, a vazba není ovlivněna sekvencí aminokyselin. Proto může být detekována jakákoli fosforylace na jakémkoli místě proteinu nezávisle na aminokyselinovém zbytku [79].

Technologie je založena na ve vodě rozpustných, globulárních nanopolymerech tzv. dendrimerech, které jsou spojeny s reaktivními skupinami. Těmi mohou být například Ti^{IV+} ionty. Ty zajišťují vysoce specifické rozpoznávání fosfátových skupin [81]. Více skupin na dendrimeru zajišťuje velmi silnou vazbu na fosfoproteiny, což má za následek velmi vysokou specifitu [80]. Činidlo pIMAGO je vázáno s biotinem, což usnadňuje detekci, při níž se využívá specifické vazby mezi biotinem a avidinem.

Při detekci fosfoproteinů na membráně se vychází z postupu velmi podobného Western blotu s imunodetekcí. Po provedení elektroforetického dělení, transferu na membránu a jejím zablokování se přidá pIMAGO reagent značený biotinem [82]. Ten tedy nahrazuje primární protilátku používanou u imunodetekce. Dále se přidá konjugát, používá se značený avidin. Vždy se musí analyzovat i vzorek kontrolního fosfoproteinu [79].

Vizualizace výsledku může proběhnout dvěma způsoby. V postupu lze použít avidin značený křenovou peroxidázou a následně použít chemiluminiscenční substrát. Je tedy zaznamenána chemiluminiscence jako pozitivní výsledek a důkaz toho, že ve vzorku je přítomen fosfoprotein. Druhou možností je použít avidin s fluorescenční značkou, následně je pak snímána fluorescence. Oba tyto způsoby nám umožní pouhý průkaz fosforylace na proteinu, ale není možné určit jeho kvantitu.

Výhodou této metody je velikost dendrimeru. Jelikož jde o nanopolymery, lze ve stejné chvíli analyzovat fosforylace pomocí pIMAGO a zároveň celkové množství proteinu na stejné membráně pomocí protilátek. Nedochozí zde totiž ke stérickému bránění [80]. Velikost dendrimeru je několikanásobně menší než velikost protilátky, a to asi 14 kDa [80].

Tuto metodu lze využít kromě detekce proteinů imobilizovaných na membráně i k detekci v destičce podobně jako metodou ELISA. Hlavní aplikací těchto metod je sledování změn fosforylace během *in-vitro* fosforylačních testů. Metody se liší citlivostí detekce. Metoda pro uspořádání v destičce by měla být citlivější a měla by být schopná detekovat i 10 ng proteinu [83]. Pro spolehlivou detekci fosfoproteinů na membráně je třeba alespoň 100 ng proteinu [84]. Dle zdroje [85] je možné pomocí metody pIMAGO v uspořádání v destičce detekovat fosforylaci koncentraci od 2 ng/ μ l. Při detekci na membráně byla pro spolehlivou detekci potřeba koncentrace v μ g.

2.8.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie patří v proteomice mezi nenahraditelné analytické metody. Může být použita pro identifikaci a kvantifikaci proteinových izoform, proteinových konformací a interakcí, ale hlavně pro detekci četných posttranslačních úprav [86].

Analyzovány mohou být celé proteiny nebo jsou pomocí proteáz rozštěpeny a vzniklé peptidy jsou následně analyzovány. U složitějších vzorků, které obsahují více látek, lze před samotnou analýzou provést nabohacení požadovaného proteinu a pak je cíleně analyzován jen určitý protein nebo peptid [86]. Výsledky jsou pak srovnány s proteinovými databázemi, což nám umožní určit, zda jde o správný protein.

Tato metoda detekce fosforylace patří mezi složitější metody na rozdíl od předešlých metod. Má ale řadu výhod jako například rychlost detekce. Analýza fosforylovaných peptidů pomocí MS má ale mnoho úskalí. Problémem je primárně nízké zastoupení analyzovaného fosfoproteinu ve vzorcích, nízká ionizační účinnost, nestabilní fosfátová část nebo interference nefosforylovaných proteinů. Toto jsou příčiny zkreslených výsledků a nesprávných závěrů [87]. K odstranění těchto problémů přispívá nabohacení fosfopeptidů na TiO₂ částice [87].

Pro detekci PTM lze použít cílenou LC-MS, která také přispívá k lepším a přesnějším výsledkům [87]. Ve studii z roku 2020 byla takto profilována fosforylační místa v receptoru růstového epidermálního faktoru a nádorové linie rakoviny plic. Z výsledků se poté identifikovala fosforylační místa související s rakovinou [86].

Problém při detekci mohou představovat proteomy obsahující více PTM nebo různé polymerní a rozvětvené PTM, hlavně glykosylace a polyubikvitinace. Nicméně existují postupy, jak tyto struktury zpracovat a analyzovat [86]. Navíc v posledních 10 letech došlo k výraznému pokroku v oblasti hmotnostní spektrometrie. Byly například navrženy nové metody značení a detekce. Je možné značit více vzorků, analyzovat všechny najednou a tím výrazně urychlit práci. Stále se ještě pracuje na nových činidlech, takže by v budoucnu mohlo být multiplexování na ještě vyšší úrovni [88].

2.8.4. Radioaktivní detekce fosfoproteinu

K ověření fosforylace substrátu, tedy aktivity kinázy, lze použít i radioaktivní detekci. Ta je založena na použití radioaktivně značeného adenosintrifosfátu (^{Y-32}P)ATP. Vychází se z toho, že se při reakci začlení značený fosfát do substrátu, následně se detekuje radioaktivní záření. Výsledkem je elektroforetický záznam.

Assay se provádí tak, že se nechá inkubovat kináza společně se značeným ATP a peptidem, který má být fosforylován. Reakce je po inkubaci zastavena přidáním Laemmliho vzorkového pufru, vzorky jsou nanášeny na gel a nechají se elektroforeticky rozdělit. Fosforylovaný peptid lze detekovat na gelu autoradiografií nebo lze provést Westernový přenos na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu. Ta je po vysušení vystavena fosforové cloně nebo rentgenovému filmu a jsou detekovány radioaktivně značené bílkoviny. Doba expozice

může trvat několik hodin až dnů. Záleží na specifické aktivitě radioizotopu a kinetice reakce [89].

Pro pracovníky a životní prostředí představuje použití radioaktivních sloučenin v této metodě také vyšší riziko [73]. Je třeba používat vhodné osobní ochranné pomůcky, standardně se používá plášť, dvojitě rukavice a ochranné brýle. Dále vzorky, které obsahují ^{32}P ATP by měly být před uživatelem stíněny, aby se minimalizovala expozice. Každý pracovník by u sebe měl mít zařízení monitorující záření. Všechny kontaminované materiály musí být likvidovány dle předem daného, poměrně přísného předpisu [89].

Tuto kinázovou assay navíc mohou provádět jen některá pracoviště. Navíc je tato metoda velmi drahá, kvůli použití radioaktivních sloučenin a přístrojové technice [89]. Z těchto důvodů se v dnešní době používají spíše testy založené na protilátkách, detekci chemiluminiscenčního záření nebo detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.

V ideálním případě by se pro získání komplexního obrazu o tom, jak se kináza chová *in-vitro* a *in-vivo* mělo použít několik různých postupů [89]. Většina kináz v *in-vivo* modelu funguje jako komplex s jinými buněčnými složkami. Proto se mohou v *in-vitro* modelu chovat jinak. Proto je třeba výsledky interpretovat s opatrností a součástí testů by vždy měly být pozitivní a negativní kontroly [89].

2.9. Multifosforylované peptidy

Fosforylace proteinů je tedy hojně sledovanou a studovanou PTM. Většina fosfoproteinů je ale fosforylována na více místech, dochází ke shlukování a tvorbě heterogenních směsí. Z toho důvodu je biologický účinek fosforylace obvykle studován pomocí syntetických, homogenních multifosforylovaných peptidů (MPP). Nicméně výroba těchto peptidů je poměrně složitá, při výrobním procesu se muselo řešit několik problémů, které proces brzdily nebo neumožňovaly. V poslední době ale došlo k velkému pokroku, problémy se podařilo odstranit nebo minimalizovat a celý proces syntézy urychlit [90]. Aktuálně existuje několik možností výroby multifosforylovaných peptidů: Fmoc SPSS pomocí modifikovaných peptidů, SPSS v kombinaci s mikrovlnným zářením, semisyntéza proteinů, syntéza proteinů a kombinace biotechnologie, fosforylační přístup založený na enzymech [9].

Syntéza Fmoc peptidů obsahující 1-3 fosforylační místa je poměrně snadná. Je možné vyrobit fosfoproteiny o délce až 70 AMK. Výroba je založena na chemické syntéze peptidů na pevné fázi [9]. Pokud ale protein obsahuje více jak 4 fosforylační místa, je syntéza poměrně náročná, obzvláště, pokud jsou seskupená u sebe [91]. Problémem je především to, že u prekurzorů dochází ke sterickeému bránění a elektrostatickému odpuzování. Další komplikací představuje tvorba struktury β -skládaného listu v alkalických podmínkách [91]. Při syntéze multifosforylovaných peptidů se proto tyto problémy obcházejí častou změnou reakčních podmínek, hlavně častou změnou reakční teploty. Dobu jedné syntézy se podařilo zkrátit na několik minut [68].

Semisyntetickým přístupem je možné syntetizovat peptidy v délce 50 AMK. Kombinuje synteticky a rekombinantně připravené fragmenty. Touto metodou je možné připravit proteiny alfa-synuklein, tau protein a huntingtin [9].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Potřebné vybavení

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- Aparatura pro horizontální elektroforézu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Aparatura pro Semi-dry Western blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Hmotnostní spektrometr MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Koncentrátor Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní laminovačka (ETA, Praha, ČR)
- Náhradní folie pro svářečky (ETA, Praha, ČR)
- Nitrocelulózová membrána (NC), porozita 0,2 μm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Magnetické míchadlo
- Magnetický stojánek (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)
- MALDI destička
- Parafilm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- pH metr Boeco BT-600 (Boeco, Hamburg, Německo)
- pH papírky (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Petriho misky
- Předvážky KERN 440-33N (Kern A Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Rotátor Bio Rs-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Silné filtrační papíry Extra Thick Blot Paper (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Stanice pro výrobu ultračisté vody Halios, Biotech (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Stanice pro fotografování membrán a gelů ChemiDocTM XRS + Systém s Image LabTM softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Termostat blokový Grant-Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, Anglie, UK)
- Termostat (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

- Třepačka Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Topné hnízdo Block Heater Grand Bio LTD (Grand Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- Zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Zkumavky 0,2; 0,5; 1,5; 2 a 5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Zkumavky s upraveným vnitřním povrchem Protein LoBind Tubes 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)

3.2. Imobilizace enzymu na magnetické částice

3.2.1. Imobilizace trypsinu na magnetické částice

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [92].

Chemikálie:

- Benzamidin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid vápenatý; CaCl_2 (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hovězí sérový albumin (BSA) z hovězího séra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35%, HCL (Penta, chrudim, ČR)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid; EDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný; Sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí trypsin, T9021-1G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Lot # 101M7013V)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Nosič:

- Sera-Mag Speed Beads, magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou, 0,816 μm (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Roztoky:

- 0,1 M tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,01 M CaCl_2
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,01 M fosfátový pufr pH 7,3

- 0,01 M fosfátový pufr pH 7,3 s 0,5 % BSA
- Roztok trypsinu s benzamidinem (poměr w/w 10:1): 6 mg trypsinu v 940 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 60 μ l zásobního roztoku benzamidinu. Roztok byl inkubován 10 minut za mírného otáčení při laboratorní teplotě. Byl připraven čerstvý.
- Roztok EDC: 18,88 mg EDC bylo rozpuštěno v 500 μ l 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3
- Roztok sulfo-NHS: 3,14 mg sulfo-NHS bylo rozpuštěno v 500 μ l 0,01M fosfátového pufru pH 7,3
- 0,064 M zásobní roztok benzamidinu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Postup:

Sterilní špičkou byl ze zásobního roztoku odebrán 1 mg částic. Částice byly 5x promyty 0,01 M fosfátovým pufrům pH 7,3. Po posledním promytí bylo k částicím v rychlém sledu přidáno 200 μ l roztoku EDC, 200 μ l roztoku sulfo-NHS a po rychlém promíchání 500 μ l roztoku trypsinu s benzamidinem. Roztoky EDC a sulfo-NHS byly rozpuštěny těsně před přidáním k částicím, promíchány a pipetovány. Reakční směs byla doplněna 100 μ l 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 anebo 100 μ l 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 s 0,5 % BSA (výsledná koncentrace v 1 ml je 0,05 %).

Imobilizace probíhala přes noc (16 h) při 4°C za mírného otáčení. Poté byla odebrána vazebná frakce a uschována pro případné stanovení aktivity (-20°C). Následovalo promývání částic pomocí magnetického separátoru nejprve 4x 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a následně 3x 1 ml 0,1M tris-HCl pufrům pH 7,8 s 0,01M CaCl₂. Po promytí byl supernatant i částice v 0,1 M tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂ a s přidavkem 50 μ l roztoku benzamidinu (0,0032 M) uloženy do lednice, kde mohly být uchovávány nebo k nim byl rovnou přidán substrátový roztok a byla stanovena aktivita.

3.2.2. Stanovení aktivity trypsinu pomocí substrátu BAPNA

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [92].

Chemikálie:

- Kyselina octová; CH₃COOH, 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid vápenatý; CaCl₂ (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného; NaH₂PO₄ · 2 H₂O
- Dodekahydrát hydrogenufosforečnanu sodného; Na₂HPO₄ · 12 H₂O
- N- α -Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid; BAPNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- N,N-dimethylformamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35%, HCL (Penta, chrudim, ČR)
- Trypsin, T9021-1G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Lot # 101M7013V)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

- 0,1 M tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂
- 0,055M substrátový roztok BAPNA v N,N-dimethylformamidu (zabaleno v alobalu)
- 30% kyselina octová
- Zásobní roztok 1 mg/ml v 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂
- Zásobní roztok 0,2 mg/ml v 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂

Postup:

Nejprve byla připravena kalibrační řada dle Tabulky 1. Každého kalibračního bodu bylo připraveno 100 μ l.

Tabulka 1: Kalibrační řada trypsinu.

Koncentrace (μg/100 μl)	Zásobní roztok trypsinu (0,2 mg/ml)	Ředící roztok (0,1M tris-HCl s 0,01M CaCl₂)
0 (BLANK)	0 μ l	100 μ l
2	10 μ l	90 μ l
4	20 μ l	80 μ l
6	30 μ l	70 μ l
8	40 μ l	60 μ l
10	50 μ l	50 μ l
12	60 μ l	40 μ l
14	70 μ l	30 μ l
20	100 μ l	0 μ l

Ke kalibračním bodům (100 μ l) bylo přidáno 0,88 ml 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂ a 20 μ l roztoku BAPNA. Ke vzorku imobilizovaného enzymu (1mg) bylo přidáno 0,88 ml 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂ a 20 μ l roztoku BAPNA. Následovala 30 minutová inkubace vzorků za mírného otáčení při 37°C.

Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 200 μ l 30% kyseliny octové. V případě vzorků obsahující enzym imobilizovaný na částice byla prvně pomocí magnetického stojánku odebrána tekutina bez částic a přenesena do nové eppendorf zkumavky. K ní pak byla kyselina octová přidána. Kdyby byla přidána k částicím, došlo by k jejich zničení.

Po zastavení reakce bylo 200 μ l vzorku přeneseno do destičky a proměřeno na spektrofotometru Multiscan při 405 nm.

3.2.3. Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [85].

Chemikálie:

- 1,4-Dithiotreitol, DTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-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 vápenatý; CaCl₂ (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- MES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylenkarbodiimid hydrochlorid; EDAC, EDC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný; Sulfo-NHS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rekombinantní lidská Src kináza, aktivní, exprimovaná v *E. coli*, molekulová hmotnost 83 kDa, (0,1 µg/µl), v ultračisté vodě, uchovávan v -80°C, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, S1076)

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 MgCl₂, 2 mM DTT, 5 mM EGTA

Nosič:

- Sera-Mag Speed Beads, magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou, 0,816 µm (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Postup:

Při imobilizaci Src kinázy na magnetický nosič bylo postupováno dle [85].

Nejprve byl sterilní špičkou ze zásobního roztoku odebrán 0,1 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. Množství 2,42 mg Sulfo-NHS bylo rozpuštěno v 220 µl ultračisté vody a přidáno ke směsi. Dále bylo 2,2 mg EDAC rozpuštěno ve 110 µl ultračisté vody a přidáno ke směsi bylo.

Takto připravená reakční směs byla inkubována (30 minut, laboratorní teplota, mírné otáčení). Poté byly magnetické částice promyty 1× 1 ml 0,5 M MES pufru, pH 6,0 a 1× 1 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0. Po promytí bylo k částicím přidáno 485 µl 50 mM MES pufru, pH 6,0 a 0,5 µl (0,5 µg) Src kinázy (Při imobilizaci s BSA bylo přidáno 485 µl 0,05% BSA v 50 mM MES pufru. Takto připravená reakční směs byla inkubována (16 hodin, 4 °C, mírné otáčení).

Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce, která byla zamražena na -20 °C. Částice byly promyty 4x 1 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0 a 3x 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 °C.

3.3. Fosforylace substrátu Src kinázou *in-vitro*

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [85].

Chemikálie a proteiny:

- Adenosin-5'-trifosfát, ATP (New England Biolabs, Massachusetts, USA)
- 1,4-Dithiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglycol-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, MgCl₂ (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina trifluoroctová 99%, TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Peptidový substrát, c-SRC substrate; H-Tyr-Ile-Tyr-GLY-Ser-Phe-Lys-OH, skladován při -20°C (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)
- Myelinový bazický protein (MBP) izolován z hovězího mozku, molekulová hmotnost 18,4 kDa, ZR o koncentraci 1 µg/µl, roztok uchováván v -20°C (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA, M1891-5MG)
- Rekombinantní lidská Src kináza, exprimovaná v *E. coli*, molekulová hmotnost 83 kDa, ZR 1 µg/10 µl, rozpuštěna ve vodě, alikvoty uchovávány v -80°C, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, S1076-10UG)
- Rekombinantní lidský alfa-synuklein, exprimován v *E. coli*, čistota >95%, molekulová hmotnost 14,46 kDa, ZR 1 o koncentraci 1 µg/µl, roztok uchováván v -20°C (rPeptide, Bogart, Ga, USA, S-1001-1)

Roztoky:

- Reakční pufr pH 7,2: 40mM HEPES, 5 mM MgCL₂, 2mM DDT, 5mM EGTA
- ATP (10mM)
- TFA 5%
- Rekombinantní Src kináza, koncentrace 1 µg/10 µl

Potřeby:

- Lobind mikrozkušavky Eppendorf 0,5 a 1,5 ml

3.3.1. Fosforylace peptidového substrátu v čase volnou kinázou**Postup:**

Reakční směs byla připravena v mikrozkušavce (0,5 ml) smícháním 5 µl (0,5 µg) Src kinázy, 5 µl (10 µg) peptidového substrátu, 5 µl ATP a 85 µl reakčního pufru. Mikrozkušavka byla inkubována v termobloku s třepáním při 250 rpm, 30°C 48 hodin.

Po 1, 3, 24 a 48 hodinách byly do nových zkumavek odebrány frakce (10 µl). Odebrané frakce byly okyseleny 5% TFA na výsledné pH 1-2. Detekce fosforylace byla provedena hmotnostní spektrometrií (MS).

3.3.2. Fosforylace peptidového substrátu v čase imobilizovanou Src kinázou

Reakční směs byla připravena v mikrozkušavce (1,5 ml). K 0,1 mg částic s imobilizovanou kinázou bylo přidáno 90 µl reakčního pufru, 5 µl ATP (0,5 mM) a 5 µl peptidového substrátu (10 µg). Takto připravená směs byla inkubována 48 hodin při 30°C, 250 rpm v termobloku. V časech 1; 3; 24 a 48 hodin byly pomocí magnetického separátoru odebrány alikvoty (10 µl), které byly okyseleny 3 µl 5% TFA na výsledné pH 1-2. Byly uchovávány při -20°C a analyzovány MS.

3.3.3. Fosforylace proteinu volnou Src kinázou**Postup:**

Do eppendorf zkumavek (1,5 ml) s nízkou nespecifickou sorpcí (Lobind) byla připravena reakční směs obsahující 10 µg proteinu (MBP nebo alfa-synukleinu), 10 µl ATP (1 mM), 1 µg volné kinázy a 70 µl reakčního pufru. Směs byla inkubována na třepačce při 250 rpm, 24 hodin při 30 °C. Po inkubaci byla směs rozdělena na alikvoty.

Pro Western blot s pIMAGO a imunodetekcí bylo odebráno 80 µl směsi, pro detekci MS bylo odebráno 20 µl. Do prázdné zkumavky bylo přidáno 50 µl 0,5% SDS a zkumavka

byla inkubována na třepačce 5 minut při 500 rpm. Následně bylo těchto 50 μl rozděleno, 10 μl bylo přidáno k 20 μl , celý objem byl okyselen 5% TFA a v -20°C uschován pro následnou MS analýzu. Zbylých 40 μl bylo přidáno k 80 μl . Tato směs byla umístěna do koncentrátoru, kde byla zakoncentrována na objem 50 μl (s 8 μg proteinu). Z tohoto objemu bylo 25 μl uschováno do mrazáku pro případné pozdější opakování elektroforézy. Zbylých 25 μl bylo rozděleno na 2x 12,5 μl (v každém 2 μg proteinu). Jeden vzorek byl zpracován dle postupu pro elektroforézu (kapitola 3.4), Western blot a následnou imunodetekci (kapitola 3.5), druhý byl zpracován dle postupu pro Western blot s pIMAGO detekcí (kapitola 3.6).

3.3.4. Fosforylace proteinu Src kinázou imobilizovanou na magnetické částice

K alikvotu částic s imobilizovanou Src kinázou (0,1 mg částic, 1 μg kinázy) bylo přidáno 80 μl reakčního pufru, 10 μg proteinu (MBP nebo alfa-synukleinu) a 10 μl ATP (1 mM). Směs byla smíchána a inkubována v Lobind eppendorf zkumavkách. Takto připravená směs byla inkubována na třepačce při 250 rpm, 30°C , 24 hodin.

Podobně jako u fosforylace volnou Src kinázou i tady byl pro Western blot s pIMAGO a imunodetekcí odebrán objem 80 μl vzorku (8 μg proteinu), pro detekci MS byl odebrán objem 20 μl (2 μg proteinu). Do prázdné zkumavky s částicemi bylo přidáno 50 μl 0,5% SDS a zkumavka byla inkubována na třepačce 5 minut při 500 rpm. Následně bylo těchto 50 μl rozděleno stejně jako v předchozím případě (kapitola 3.3.3.).

3.4. SDS-PAGE elektroforéza

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [93] a [85].

Chemikálie a proteiny:

- 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 ProteinTM Standards, dual color, 10 - 250 kDa, (Bio-rad, Hercules, CA, USA)
- Marker molekulových hmotností; Precision Plus ProteinTM Standards, unstained, 10 - 250 kDa, (Bio-rad, Hercules, CA, USA)
- N,N'-methylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- N, N, N, N-tetramethylendiamin, TEMED (Lachema, Neratovice, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Myelinový bazický protein (MBP) z hovězího mozku, MW 18,4 kDa, (1 µg/µl), v ultračisté vodě, uchovávan v -20°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lidské IgG z lidské plazmy, lyofilizát, molekulová hmotnost 150 kDa, (1 µg/µl), v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7,3, uchovávan v -20°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) z hovězího séra, lyofilizát, molekulová hmotnost 66,5 kDa, (1 µg/µl), v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7,3, uchovávan v -20°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rekombinantní Src kináza, lidská, aktivní, exprimovaná v *E. coli*, molekulová hmotnost 83 kDa, (0,1 µg/µl), v ultračisté vodě, uchovávan v -80°C, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, S1076)
- Rekombinantní alfa-synuklein, exprimován v *E. coli*, čistota >95%, molekulová hmotnost 14,46 kDa, ZR 1 o koncentraci 1 µg/µl, roztok uchovávan v -20°C (rPeptide, Bogart, Ga, USA, S-1001-1)

Roztoky:

- Roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- Roztok B (1,5M Tris-HCl pufr, pH 8,8)
- Roztok C (1,0M Tris-HCl pufr, pH 6,8)
- Roztok D (10% roztok SDS)
- Roztok E (10% roztok persíranu amonného)
- TEMED (N, N, N, N-tetramethylendiamin)
- Vzorkový pufr
 - o Laemmli sample buffer 1x a 4x (Bio-Rad, Herkules, CA, USA) bez přídavku 2-merkaptóetanolu
 - o Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Herkules, CA, USA) s přídavkem 2-merkaptóetanolu
- Elektrodový pufr: 0,025M Tris, 0,192 M glycin s 0,1% SDS, pH 8,3 - 8,6
- Roztok MBP: koncentrace 1 µg/ µl, v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7,3
- Roztok IgG: koncentrace 1 mg/ml
- Roztok BSA: koncentrace 1 mg/ml

Postup přípravy gelů:

Skla, hřebínek (0,75 mm, 10 jamek), držák i guma k polymeraci gelu byly před vložením do aparatury odmaštěny vodou s jarem, opláchnuty a otřeny lihem. Skla byla vložena do držáku aparatury a zajištěna. Spodní strana skel byla utěsněna pomocí parafilmu, aby se předešlo vytékání gelu při dávkování. Takto připravená skla byla umístěna na gumu do průhledného stojánku pro nalévání gelu, a ještě zajištěna špičkou.

Dále byly připraveny směsi gelů smícháním destilované vody, roztoků A, B, C D, E a TEMED v poměru dle Tabulky 2 pro dělicí a poté zaostřovací gel. Roztok dělicího gelu byl po promíchání nadávkován mezi připravená skla po rysku a převrstven destilovanou vodou. Takto připravený gel polymeroval 30 minut. Poté byla pomocí filtračního papíru odsáta přebytečná voda. Byla nachystána směs pro zaostřovací gel a nadávkována až po horní okraj skel. Do zaostřovacího gelu byl umístěn hřebínek. Takto připravený gel tuhnul 15 minut.

Tabulka 2: Příprava gelů

	12% dělicí gel	16,5% dělicí gel	5% zaostřovací gel
Destilovaná voda	1,68 ml	0,9 ml	1,4 ml
Roztok A	2 ml	2,75 ml	0,33 ml
Roztok B	1,25 ml	1,25 ml	-
Roztok C	-	-	0,25 ml
Roztok D	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml
Roztok E	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml

Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byla nejprve skla s držákem uvolněna ze stojánku, následně i z držáku a byl opatrně vyjmut hřebínek. Gely byly umístěny do aparatury do elektroforetické vany a zality elektrodoým pufrem tak, aby se jím jamky promyly. Takto jsou gely připraveny pro aplikaci vzorků.

Gely je možné připravit předem a skladovat při 4-8°C. V takovém případě jsou gely po přípravě a vytažení hřebínku uloženy do suché, čisté misky, zabalené do vlhkého papíru a folie, aby se zabránilo jejich vyschnutí.

Příprava a aplikace vzorků:

Do čistých zkumavek byla připravena směs ze vzorků a vkládacího pufru. Následně byly zkumavky vloženy do topného hnízda a inkubovány při 100 °C 3 minuty. Po zchlazení byly vzorky dávkovány do jamek zaostřovacího gelu automatickou pipetou

a plastovými špičkami nebo pomocí GELoaderu. Při tomto kroku lze použít Hamiltonovu pipetu. Po aplikaci každého vzorku je ale potřeba ji řádně promýt etanolem.

Při aplikaci vzorků do gelu je důležité, aby byly gely umístěny v elektroforetické aparatuře, jejich jamky byly zcela zality elektrodoým pufrem a kratší skla směřovala do středu. Po aplikaci vzorků se s gely nesmí více manipulovat a elektroforetické dělení je potřeba spustit co nejdříve.

Spuštění elektroforézy a ukončení:

Vnitřní prostor mezi gely musí být naplněn elektrodoým pufrem zcela aby elektroforéza probíhala, prostor kolem skel by měl být naplněn po rysku na stěně elektroforetické vany. Vana byla uzavřena víkem tak, aby byly odpovídající elektrody u sebe, zapojena do zdroje, na kterém byly nastaveny hodnoty 30 mA (na jeden gel), konstantní napětí 180 V a 45 minut. Dělení většinou probíhá 45-50 minut, čelo by mělo být u dolního okraje skel. Je třeba kontrolovat, zda po zapnutí elektroforéza probíhá, to se ověří přítomností bublinek. Někdy může dojít k poklesu hladiny elektrodoého pufru mezi gely a elektroforéza pak přestane probíhat. V takovém případě je potřeba vypnout zdroj, doplnit pufr a následně pokračovat v dělení.

Jakmile čelo doputuje ke spodnímu okraji aparatury, byl vypnut zdroj napětí a odpojena vana. Elektrodoý pufr je možné použít opakovaně (2-3x). Gely byly vyjmuty z držáku, skla byla oddělena pomocí špachtle a stříčkou s destilovanou vodou byly přeneseny do Petriho misek. Gely mohou být po krátkou dobu skladovány v misce s destilovanou vodou. Pro delší skladování je třeba proteiny v gelu fixovat pomocí fixačního roztoku alespoň 30 minut.

3.4.1. Barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie G-250 Stain

Vizualizace proteinů v gelu lze dosáhnout pomocí Coomassie Blue. Citlivost barvení pomocí Coomassie Blue je přibližně 0,3-1 µg proteinu. Pro větší citlivost lze gel obarvit pomocí dusičnanu stříbrného. Proteiny v gelu se barví přímo po elektroforetické separaci, pokud je potřeba zjistit pozice proteinů. Nebo se gel barví až po přenesení na membránu, pro ověření, že se přenesly všechny proteiny z gelu. Vazba barviva na proteiny je ireverzibilní.

Chemikálie:

- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina octová; CH₃COOH, 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Roztoky:

- Bio-Safe coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, Herkules, CA, USA, BR121521)
- Fixační roztok: 5% kyselina octová a 50% etanol

Postup:

Gel byl nejprve propláchnut destilovanou vodou, následně byl zalit fixačním roztokem a inkubován 20 minut na míchačce při laboratorní teplotě. Poté byl fixační roztok slit. Gel byl rehydratován v destilované vodě 30 minut. Nakonec byl gel inkubován v barvicím roztoku Commasie Brilliant Blue po dobu 40-60 minut. Pro odbarvení pozadí gelu byl gel promýván vodou 2x 20 minut.

3.4.2. Barvení proteinů roztokem AgNO₃

Barvení stříbrem je nejcitlivější metodou barvení. Limit detekce je 1-10 ng proteinu v gelu. Při barvení dochází k interakci kladně nabitých Ag⁺ iontů se záporně nabitými skupinami proteinů v gelech a se sulfátovou skupinou SDS. Po přidání vyvíjejícího se roztoku dochází k redukci Ag⁺ iontů na Ag⁰.

Chemikálie:

- Amoniak, vodný roztok 25-29% (Penta, Chrudim, ČR)
- Dusičnan stříbrný AgNO₃ (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 (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citronová, bezvodá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina octová; CH₃COOH, 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Roztoky:

- 10% glutaraldehyd (připravuje se čerstvý)
- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol
- NaOH 9M
- Roztok stříbra AgNO₃ 20%
- Roztok amoniakálního stříbra: 20% AgNO₃ byl postupně přikapáván k roztoku (10,5 ml destilované vody, 0,7 ml amoniaku a 119,9 μl 9 M NaOH) až do okamžiku vytvoření

běžovohnědého zákalu. Po vytitrování byl roztok doplněn na objem 50 ml destilovanou vodou.

- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová + 0,04% formaldehyd

Postup:

Po provedení transferu byl gel umístěn do vody. Následně byl gel fixován ve fixačním roztoku alespoň 30 minut na třepačce za laboratorní teploty. Tento krok lze provést i přes noc (4°C). Poté se gel rehydratuje 30 minut v destilované vodě na třepačce. Veškeré inkubace probíhaly za laboratorní teploty. Po rehydrataci gelu následuje inkubace s 10% glutaraldehydem 30 minut na třepačce a promytí destilovanou vodou 6x 10 minut na třepačce. Propláchnutý gel byl inkubován 12 minut s 20% roztokem AgNO₃, pak byl gel rychle opláchnut destilovanou vodou a byl přidán vyvolávací roztok. Inkubace s vyvolávacím roztokem je jen krátká – pár minut na třepačce. Gel je třeba sledovat, jestli se již objevují proužky. Pokud už je vše dostatečně vybarveno, slijí se vyvolávací roztok a přidá se ustalovací roztok, ve kterém se gely mohou uchovávat při 4 °C.

3.5. Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí

3.5.1. Westernový přenos proteinů na membránu

Při práci se vycházelo z postupů uvedených v [85] a [94].

Chemikálie:

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

Roztoky:

- Transferový roztok: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% etanol

Postup:

Nitrocelulózová membrána byla uštířena podle šablony. Manipulace s membránou probíhala výhradně pomocí pinzety a v rukavicích. Před transferem byla membrána i 2 blotovací papíry inkubována v transferovém roztoku 30 minut při 4°C.

Po provedení elektroforetické separace a vyjmutí gelu ze skel byl gel pomocí proudu destilované vody ze stříčky spláchnut do misky. Po propláchnutí gelu ve vodě a oříznutí byl gel

inkubován v transferovém roztoku 20 minut při 4°C. Do čisté Western blotové aparatury byl nejprve umístěn blotovací papír, na něj membrána, potom gel, a nakonec druhý blotovací papír. Aparatura byla uzavřela víkem a připojena ke zdroji. Na zdroji byl nastaven konstantní proud 0,3 A (pro jeden gel) a napětí 12 V. Transfer probíhal 70 minut.

3.5.2. Detekce proteinů na nitrocelulózkové membráně pomocí Ponceau S

Postup vycházel z postupu uvedeného v [85] a [94].

Ponceau S je barvivo, které se používá pro obarvení membrány po provedení transferu. Citlivost barvení s Ponceau S je asi 2x větší než pomocí Coomassie Blue, teda asi 5 µg. Díky tomuto barvení zjistíme účinnost transferu, zda se povedlo proteiny na membránu převést, nebo zda zůstaly na gelu. Barvení proteinů pomocí Ponceau S je reverzibilní a dá se odstranit při promývacích krocích pomocí destilované vody.

Chemikálie:

- Kyselina octová; CH₃COOH, 99% (Lach-Ner, Neratovice)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

- Barvicí roztok: 0,1% Ponceau S a 1% kyselina octová

Postup:

Po provedení westernového přenosu na membránu byla membrána inkubována 30 minut v roztoku Ponceau S při laboratorní teplotě za mírného míchání. Po inkubaci bylo pozadí odbarveno destilovanou vodou. Membrána byla vyfocena pomocí programu GeneSys. Následně byla ponechána v destilované vodě, došlo k jejímu odbarvení, takže mohla proběhnout imunodetekce nebo pIMAGO detekce.

3.5.3. Detekce fosforylace na proteinech pomocí specifických protilátek

Postup vycházel z postupu uvedeného v [94].

Chemikálie

- ClarityTM Western ECL substrate (Biorad, Hercules, CA, USA, 1705062)
 - o Obsahuje roztok peroxidu a luminolu s urychlovačem
- Chlorid sodný, NaCl (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný, KCl (Penta, Chrudim, ČR)

- Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Lach- Ner, Neratovice, ČR)
- Králičí anti-myší IgG protilátky značené HRP, skladovány při -20°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A9044)
- Myší monoklonální anti-fosfotyrosin protilátky, skladovány při -20°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, SLBV4381)
- Myší monoklonální protilátky anti-alfa-synuklein, fosforylovaný Tyr32, Izotyp: IgG1, κ , koncentrace 0,5 mg, skladovány při 2°C (BioLegend, Francie, 899202)
- Sušené mléko, odtučněné (Nutri Star, Praha, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky

- PBS-T, pH 7,2 - 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,1% Tween 20
- Blokační roztok: 10% sušené mléko v PBS-T
- Roztok primárních protilátek: Myší monoklonální anti-fosfotyrosin protilátky ředěné 1:2000, v PBS-T pufru
- Roztok primárních protilátek: Myší anti-alfa-synuklein protilátky ředěné 1:100, v PBS- T pufru
- Roztok sekundárních protilátek: Králičí anti-myší IgG značené HRP, ředěné 1:10 000, v PBS-T pufru
- Chemiluminiscenční substrátový roztok: Reagencie z kitu ClarityTM Western ECL substrate byly smíchány 1:1.

Postup

Membrána byla po barvení v roztoku Ponceau S blokována v 10% blokačním roztoku na třepačce (2 hodiny, laboratorní teplota). Po blokaci byla zatavena do folie se 3 ml roztoku primární protilátky ředěnou v poměru 1:2000. Inkubace probíhala 20 hodin za mírného otáčení při 4°C . Po inkubaci byla membrána promyta na třepačce v PBS-T (3x 5 minut, laboratorní teplota). Poté znovu zatavena do folie a byly k ní přidány 3 ml sekundární protilátky (ředění 1:10 000). Inkubace probíhala 2 hodiny za mírného otáčení při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána opět promyta v PBS-T (5x 5 minut, mírné míchání při laboratorní teplotě). Při posledním promytí byl připraven chemiluminiscenční substrát. Promytá membrána byla umístěna do čisté Petriho misky, na její povrch byl nanesen chemiluminiscenční substrát

(2 ml) a následovala inkubace na třepačce (1-3 minuty, laboratorní teplota, zabaleno v alobalu). Při práci s chemiluminiscenčním roztokem je třeba pracovat ve tmě, v ideálním případě zhasnout v laboratoři. Nakonec byla provedena chemiluminiscenční detekce pomocí stanice GeneSys.

3.6. Detekce fosfoproteinů v membráně pomocí kitu pIMAGO

Metoda pIMAGO detekce byla převzata a upravena z [81].

Při detekci pomocí pIMAGO kitu je třeba nejprve proteiny rozdělit pomocí SDS-PAGE a provést Western blot. Gely byly připraveny dle kapitoly 3.2. Vzorky jsou před nadávkováním na gel inkubovány v roztoku SDS/DTT (3 minuty, 100°C). Následně byl přidán 5x IAA aby jeho výsledná koncentrace byla 1x. Vzorky byly inkubovány 15 minut ve tmě. Po nadávkování vzorků na gel byla spuštěna elektroforéza dle postupu popsáno v kapitole 3.2.

Po provedení elektroforetického dělení následoval Westernový přenos proteinů na membránu dle kapitoly 3.3.1. Membrána byla po přenosu obarvena v Ponceau S a gel v Coomassie Blue a AgNO₃.

Chemikálie:

- 1,4-Dithiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-jodacetamid, IAA, skladováno při 2-8°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kontrolní fosfoprotein z kitu, β-kasein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlorid sodný, NaCl (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Avidin-HRP, skladováno v -20°C,
- pIMAGO reagent, skladováno při 2-8°C, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-jodacetamid, IAA, skladováno při 2-8°C, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 10x Blokovací pufr, skladováno při 2-8°C, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 5x pIMAGO pufr, skladováno při 2-8°C, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 10x Wash pufr, skladováno při 2-8°C, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Clarity™ Western ECL substrate (Biorad, Hercules, CA, USA, 1705062)

Roztoky:

- DTT 50 mM
- kit na pIMAGO: 10x Wash pufr, 5x pIMAGO pufr a 10x blokovací pufr byly před použitím ředěny destilovanou vodou, aby jejich výsledná koncentrace byla 1x.

- Konjugát: avidin-HRP, ředěn 1: 2 000 v blokovacím pufru
- TBST pufr, pH 7,5: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20
- Chemiluminiscenční substrátový roztok: Reagencie z kitu Clarity™ Western ECL substrate byly smíchány 1:1.

Postup:

Membrána byla po přenosu blokována 1 hodinu v blokovacím pufru na třepačce při laboratorní teplotě. Tento krok lze provést i přes noc v uzavřené Petriho misce s blokovacím pufrům na třepačce v lednici. Na membránu vystačí 10 ml pufru. Druhý den byla připravena směs pIMAGO reagencie v pIMAGO pufru v poměru 1:1000. Membrána byla umístěna do čisté misky a tato směs k ní byla přidána, inkubace probíhala 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Následně byla membrána promyta 3x 10 ml Wash pufru. Po promytí pufrům byla membrána ještě jednou promyta TBST pufrům. Každý promývací krok trval 5 minut. Po promytí byl k membráně přidán roztok konjugátu avidin-HRP s blokovacím pufrům v poměru 1:2000.

Membrána byla inkubována 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána 3x promyta v TBST (každé promytí trvalo 5 minut). Nakonec byl přidán roztok chemiluminiscenčního substrátu, následovala krátká inkubace na třepačce při laboratorní teplotě ve tmě (1-3 minuty). Membrána byla po vyvolání nafocena na stanici GeneSys.

3.7. Příprava vzorku proteinu pro analýzu hmotnostní spektrometrií

3.7.1. Proteolytické štěpení proteinu volným sekvenčně modifikovaným trypsinem

Při práci se vycházelo z postupu uvedeného v [85].

Trypsin je enzym, který štěpí peptidy specificky za argininem nebo lysinem. Problém představuje autolýza trypsinu. Díky tomu pak vznikají fragmenty, které mají pseudo-chymotrypsinovou aktivitu a štěpí nespecificky. Při práci se používal sekvenčně modifikovaný vepřový trypsin. Tento trypsin je modifikovaný redukční methyloací lysinových reziduí, díky které vzniká vysoce stabilní molekula, odolná vůči autolýze [95].

Chemikálie:

- 2-jodacetamid, IAA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1,4-Dithiotreitol, DTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Hydrogenuhličitan amonný, NH_4HCO_3
- Kyselina trifluoroctová, TFA, 99% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sekvenčně modifikovaný vepřový Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grad, aktivita: 19136 U/mg, lyofilizát, skladován v $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

Roztoky:

- 50 mM NH_4HNO_3
- 200 mM DTT v 50 mM NH_4HNO_3
- 400 mM IAA v 50 mM NH_4HNO_3
- 10% TFA
- Roztok trypsinu: 20 μg trypsinu rozpuštěno v 200 μl ředícího pufru z kitu

Postup:

Vzorek proteinu po fosforylaci byl zcela odpařen v koncentrátoru ($45\text{ }^\circ\text{C}$, 1400 rpm), odpařování trvalo 50-60 minut. Následně byl vzorek rozpuštěn v 50 mM NH_4HNO_3 do celkového objemu 60 μl . Ke vzorku bylo přidáno 10 μl 200 mM DTT v 50 mM NH_4HNO_3 a následovala inkubace reakční směsi v termobloku s třepáním (30 minut, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 600 rpm). Po vychlazení reakční směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 μl 400 mM IAA v 50 mM NH_4HNO_3 a následovala inkubace (30 minut, laboratorní teplota, ve tmě, na rotátoru). Poté bylo přidáno k reakční směsi 10 μl 200 mM DTT v 50 mM NH_4HNO_3 , aby došlo k neutralizaci přebytečného IAA. Následovala inkubace směsi (15 minut, laboratorní teplota, na rotátoru).

Během této inkubace byl připraven pracovní roztok trypsinu. Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno pro reakci potřebné množství. Trypsin/Lys C se do reakce s proteinem přidává v hmotnostním poměru 1:40. Odebrané množství trypsinu bylo zahřáto ($30\text{ }^\circ\text{C}$, 15 minut). Takto připravený trypsin byl přidán k vzorku. Následovala inkubace směsi v termo-shakeru (16 hodin, 37°C , 500 rpm). Po inkubaci bylo štěpení proteinu zastaveno pomocí přidavku 5 μl 10% TFA. Vzorky neštěpeného proteinu byly uchovávány v $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.7.2. Obohacení fosfopeptidů na nosiči Titansphere™ TiO Bulk Material

Chemikálie:

- Acetonitril 99%, ACN (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Částice Titansphere™ TiO Bulk Material
- Hydrogenfosforečnan sodný, Na_2HPO_4 (Penta, Chrudim, ČR)

- Hydroxid amonný, NH₄OH (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)

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 kyselinou mléčnou (LA)
- Eluční roztok: 1% NH₄OH

Postup:

Z připravené suspenze titanových částic bylo pro analýzu odebráno 0,5 mg částic. Takto připravené částice byly promyty. Nejprve k nim bylo přidáno 1x 400 µl 80% ACN s 0,1% TFA (1 minuta, 3000 rpm) a 1x 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 (ke 100 µl vzorku bylo přidáno 100 µl 80% ACN s 5% TFA a 1 M LA). Nosič s naneseným vzorkem byl poté inkubován (30 minut, laboratorní teplota, 1150 rpm, ve tmě). Po inkubaci byl odebrán roztok s nenávanými složkami, přepipetován do nové zkumavky, okyselen 20% TFA a uschován v -20 °C. Nosič byl promyt 2x 400 µl 80% ACN s 5% TFA a 1M kyseliny mléčné (1 minuta, 3000 rpm), 2x 400 µl 80% ACN s 1% TFA (1 minuta, 3000 rpm) a 1x 400 µl 80% ACN s 05% TFA (1 minuta, 3000 rpm). K promytému nosiči bylo přidáno 100 µl elučního roztoku a následovala inkubace (15 minut, laboratorní teplota, 1400 rpm). Poté byl supernatant odebrán a okyselen 20% TFA (cca 2 µl) na výslednou hodnotu pH 3-4. Obohacené vzorky fosfopeptidů mohou být před odsolovacím krokem skladovány při teplotě -20 °C.

3.7.3. Odsolení vzorku proteinů na pevné fázi OLIGO

Chemikálie:

- Acetonitril 99,9%; ACN (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, DHB (LaserBio Labs SARL, Valbonne, Francie)
- Kyselina fosforečná; H₃PO₄ (Fluka, New Jersey, USA)
- Kyselina trifluoroctová 99%; TFA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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% H₃PO₄
- Suspenze fáze: OLIGOTM R3 reversed – Phase Resin v 80% ACN s 0,1% TFA

Postup:

Konec špičky GELoaderu byl stlačen tak, aby jím mohla procházet tekutina, ale nedocházelo přitom k uvolňování fáze. Následně do něj bylo dávkováno 10 µl suspenze fáze. Aby byl zajištěn průchod fáze GELoadrem, byla stlačena stříkačkou. Do takto připravené mikrokolonky bylo dávkováno 15 µl 80% ACN s 0,1% TFA tak, aby cca 5 µl zůstalo nad fází. Takto připravené kolonky lze skladovat v uzavřeném stojánku v lednici při 4 °C.

Do takto připravených kolonek bylo dávkováno 20 µl vzorku. Vzorek byl protlačen skrz fázi v mikrokolonce tak, že jeho část zůstala nad pevnou fází. Kdyby byl protlačen dosucha, docházelo by k vysušování fáze proudem vzduchu. Při tomto kroku došlo k navázání vzorku na pevnou fázi. Následovalo promytí navázaného vzorku 15 µl 0,1% TFA a tentokrát byla protlačena všechna tekutina do sucha. Eluce vzorku byla provedena přímo na MALDI destičku pomocí 3 µl matrice, celý objem byl protlačen na 1 spot. Vzorky se po nanesení na destičku nechaly zaschnout, mohou se skladovat při pokojové teplotě uzavřené v krabici nebo analyzovat hned.

Z hmotnostního spektrometru získáme hmotnostní spektra. Z hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity píků, které odpovídaly fosforylované a nefosforylované formě v případě analýzy peptidového substrátu. Ze získaných intenzit byla vypočtena procentuální míra fosforylace peptidového substrátu dle Rovnice 1.

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

Rovnice 1 Výpočet míry fosforylace peptidového substrátu [%], I – relativní intenzita píku.

Po získání hmotnostních spekter u proteinů (MBP, alfa-synuklein) je třeba porovnat výsledky získané na analyzátoru s hmotnostními spektry proteinů v databázích (databáze UniProt, Swiss-Prot) a zjistit, zda byl protein fosforylován. Při analýze MALDI-Orbitrap hmotnostní spektrometrií může docházet k malému rozdílu v ionizaci

substrátu. Záleží, do kterého místa na destičce je paprsek laseru namířen. Výsledná intenzita píku pak nemusí zcela odpovídat reálné koncentraci složek analytu. I přesto je tato metoda poměrně přesná a citlivá.

Výsledky analýz byly vyhodnocovány v online programu MS-Fit. Při analýze byla nastavena maximální možná chyba v přesnosti určení hmoty na 10 ppm a povolena byla maximálně 2 vynechaná místa štěpení. Jako variabilní modifikace byly nastaveny fosforylace (S, T, Y), oxidace (M), glutamin na kyselinu pyroglutámovou a acetylace na N-terminální části proteinu. Jako fixní modifikace byla nastavena karbamidomethylace (C).

Analýzu MS i vyhodnocování získaných výsledků provedl Mgr. Ondřej Morávek. Vzorky byly analyzovány na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL, který analyzuje v pozitivním módu s rozlišovací schopností 60000 (FWHM u $m/z = 400$).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tématem experimentální části práce bylo zavést a optimalizovat citlivé metody detekce tyrosinové fosforylace proteinů založené na Western blotu s detekcí dendrimerem pIMAGO a imunodetekcí se specifickými anti-pTyr protilátkami. Pro ověření získaných výsledků byla používána hmotnostní spektrometrie (MS) [85]. Fosforylace na tyrosinu u proteinů se vyskytuje vůbec nejméně, ve srovnání s fosforylacemi na serinu a threoninu [7] a metody její detekce musí být poměrně citlivé.

Optimalizované byly přípravné kroky separace proteinů v SDS-PAGE gelu a podmínky přenosu proteinů na membránu, barvení proteinů s Ponceau S, Coomassie Blue a AgNO₃ a také imunodetekce a detekce dendrimerem pIMAGO. Práce na několika úrovních navazuje na výsledky diplomové práce Mgr. Markéty Fojtíkové [85], která se zabývala především přípravou a charakterizací imobilizované Src kinázy a následně fosforylací proteinů Tau a MBP s detekcí pomocí pIMAGO kitu v ELISA a provedení MS analýz.

V této práci se zaměřujeme především na detekci fosforylace proteinů na tyrosinu. Pro fosforylace substrátů byla využívána Src kináza volná a imobilizovaná na superparamagnetické částice Sera-Mag Speed Beads. V předchozí práci s imobilizací Src kinázy bylo zjištěno, že aktivita kinázy po šesti opakovaných použití klesla o 92,99 % [85]. Zároveň při skladování imobilizované kinázy (bez BSA) po dobu jeden měsíc došlo k poklesu aktivity o 33,61 % [85]. V této práci jsme při imobilizaci Src kinázy ověřovali přínos možného přídatku BSA, který je používán pro snížení nespecifické sorpce proteinů například v microarrays [75], na aktivitu a skladovací stabilitu imobilizované Src. Src kináza imobilizovaná za nových podmínek byla použita k *in-vitro* fosforylaci proteinů – MBP a alfa-synukleinu, s cílem studia fosforylovaných míst u obou fosfoproteinů.

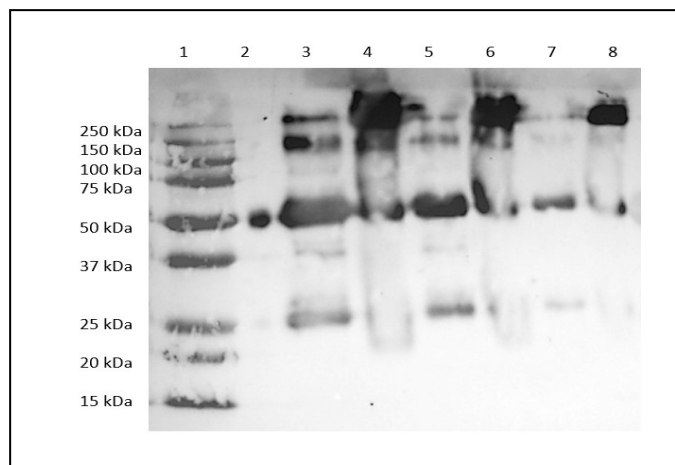
4.1. Optimalizace metod pro detekci fosforylace proteinů na tyrosinu v membráně

Cílem experimentů bylo zavést a optimalizovat metodu Western blotu s imunodetekcí přirozeně fosforylovaných proteinů pomocí protilátek se specifitou proti fosfotyrosinu (anti-pTyr) a pomocí dendrimeru pIMAGO, který má specifitu k fosfoskupinám. Metody se mohou na základě odlišných detekčních principů (dendrimer a protilátka) lišit citlivostí detekce. Kromě koncentrace proteinu může citlivost detekce záviset i na míře fosforylace [84].

Pro imunodetekci fosforylace proteinu byly používány primární monoklonální myši anti-pTyr protilátky. Jako konjugát pak králičí anti-myši IgG protilátky značené HRP. Na membráně byly vizualizovány pouze proteiny, které byly fosforylovány na tyrosinu. Cílem optimalizací bylo prověření postupu přenesení separovaných proteinů z gelu do membrány a ověření ředění a detekce anti-pTyr protilátek. K optimalizacím jsme použili proteiny s fosforylacemi na tyrosinu - myelinový bazický protein (MBP), lidské IgG, a Src kinázu. Fosforylaci na tyrosinu jsme ověřili také v databázi UniProt [96; 97; 98]. Hovězí sérový albumin byl použit jako negativní kontrolní protein bez fosforylací (opět ověřeno v databázi UniProt [99]).

V prvních experimentech byla cílem především optimalizace času transferu a kontrola imunodetekce s anti-p-Tyr. Byly použity vzorky s různou koncentrací lidského IgG. Nejprve bylo provedeno elektroforetické rozdělení proteinů v SDS PAGE dle kapitoly 3.4. Vždy byl jeden vzorek vložen do vkladacího pufru G a další do pufru F s merkptoethanolem. U vzorků v pufru G s merkptoethanolem došlo k redukci disulfidických můstků a rozkladu molekul proteinů. Po elektroforetickém dělení následoval 30 minut dlouhý Westernový přenos (dle kapitoly 3.5.1.). Nejprve byl přenos proteinů na membránu ověřen pomocí Ponceau S a poté imunodetekcí s anti-pTyr dle kapitoly (3.5.3.). Na membráně tak bylo možné vidět molekulu celého lidského IgG i jeho fragmenty, tedy lehké i těžké řetězce.

Chemiluminiscenční signál byl na membráně zaznamenán ve všech drahách, ve kterých byl vzorek IgG, signál chemiluminiscence byl poměrně silný (Obrázek 8).

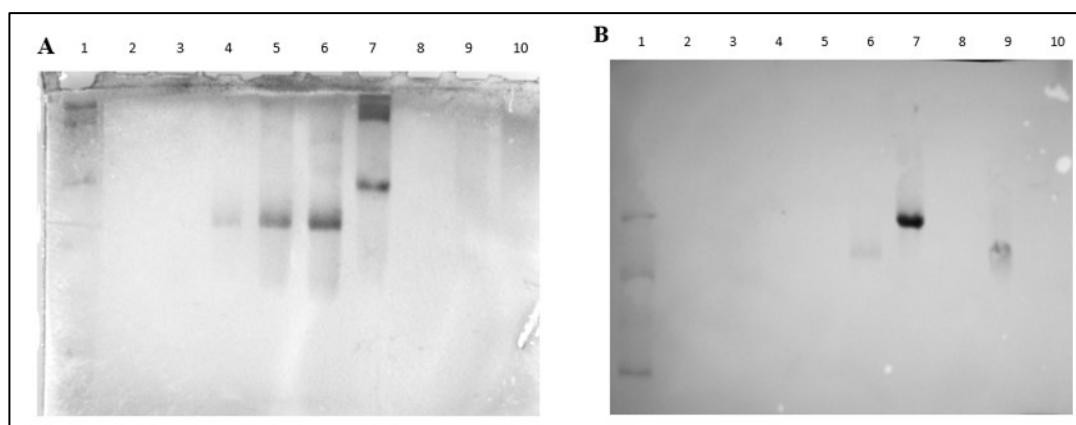


Obrázek 8 Detekce přirozené fosforylace u vzorků IgG. **Separáčn**í **dráha** č. **1** – Marker molekulových hmotností; **č.3, 5 a 7** – lidské IgG ve vkladacím pufru F, koncentrace 10 µg, 5 µg a 1 µg; **č. 4, 6 a 8** – lidské IgG ve vkladacím pufru G, koncentrace 10 µg, 5 µg a 1 µg. NC membrána značená anti-pTyr protilátkami.

Úspěšně se povedlo detekovat fosforylaci u nativního proteinu IgG a ověřit ředění primárních protilátek.

Součástí práce bylo zavést a optimalizovat metodu detekce fosfoproteinů na NC membráně pomocí dendrimera pIMAGO-biotin. Pomocí této metody lze detekovat fosforylaci nezávisle na AMK, která je fosforylována. Nezáleží tedy, jestli je fosfátová skupina navázána na serin, threonin nebo tyrosin. Metoda byla používána již dříve v ELISA uspořádání, viz [85]. Tato diplomová práce se zabývá optimalizací varianty pro Western blot. Pro tento účel byly k dispozici komerční kity s detekcí chemiluminiscence (avidin-HRP) a s detekcí fluorescence (avidin-Fluor 550 i avidin-Fluor 800). Jako kontrolní protein je v kitu používán β-kasein, který je přirozeně fosforylován na Thr18, Ser21, Ser23, Ser24, Ser25 (ověřeno v databázi UniProt, [100]). Jeho velikost je 24 kDa.

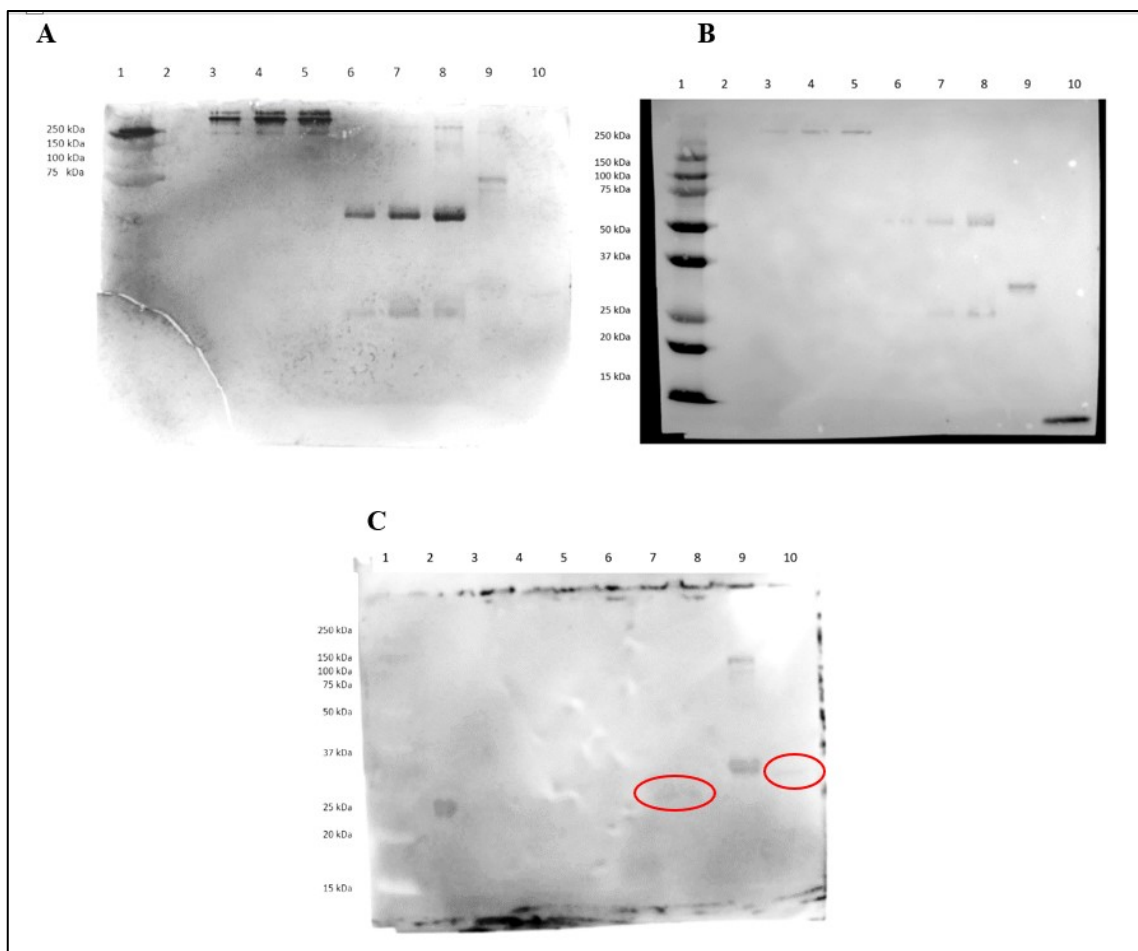
Kombinace s DTT a IAA potřebná pro Western blot s pIMAGO detekcí způsobuje lehké rozmazání separovaného proteinu (Obrázek 9).



Obrázek 9 Detekce přirozené fosforylace u vzorků MBP, IgG a BSA. **Separační dráha:** č. 1 – Marker molekulových hmotností; č. 3 – nativní MBP v koncentraci 1 µg; č. 4 – lidské IgG v koncentraci 0,5 µg; č. 5 – lidské IgG v koncentraci 1 µg; č. 6 – lidské IgG v koncentraci 2 µg; č. 7 - BSA v koncentraci 1 µg; č. 9 – α -kasein, kontrolní fosfoprotein z pIMAGO kitu; č. 10 – β -kasein, kontrolní fosfoprotein z pIMAGO kitu. (A) SDS-PAGE, 12% gel po přenosu, barveno koloidním stříbrem, (B) NC membrána, barveno Ponceau S. Doba transferu: 30 minut.

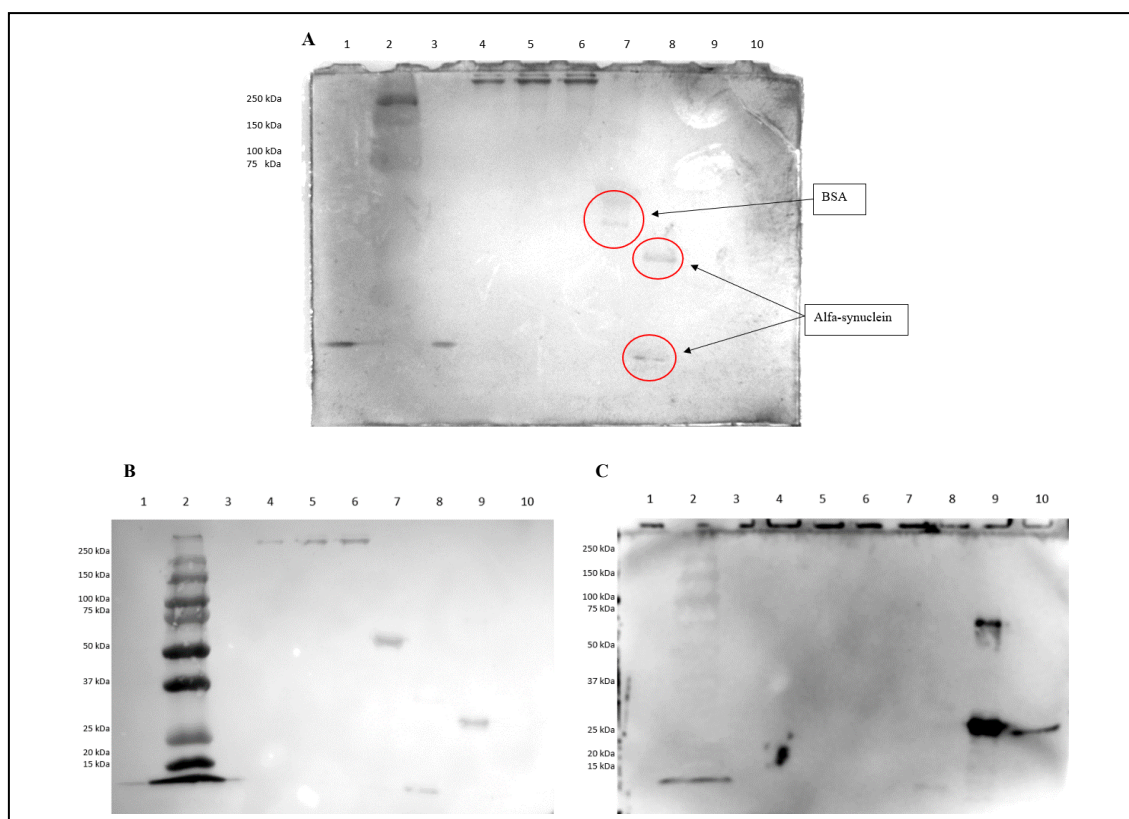
Závěrem experimentu bylo, že pro další práci bylo potřeba snížit koncentraci DTT. Původní doporučená koncentrace DTT byla 50 mM, kvůli výsledkům byla snížena na 25 mM. Bylo také zjištěno, že bude lepší dobu transferu 30 minut (Obrázek 9) prodloužit na 70 minut (Obrázek 10), aby se zajistil maximální přenos proteinů na membránu.

Při dalším experimentu pro ověření citlivosti detekce pomocí pIMAGO byly použity různé koncentrace lidského IgG – 0,5; 1 a 2 µg. Pro separaci SDS-PAGE byly také připraveny proteiny s fosforylacemi α - a β -kasein pro kontrolu správnosti provedení testu. Vzorky IgG byly vloženy do SDS/DTT a zbylá část pouze do 2x Laemliho vkládacího pufru G. Po SDS-PAGE separaci byl proveden transfer na NC membránu (70 minut) a obarvení membrány v Ponceau S. Byly připraveny dva identické gely a přenosy na NC membránu. U jedné membrány byla provedena imunodetekcí (obrázek neuveden) a u druhé pomocí dendrimera pIMAGO. Na membráně šlo po pIMAGO detekci vidět odezvy od kontrolních proteinů (α i β - kaseinu) a u IgG v SDS/DTT o koncentraci 1 a 2 µg (Obrázek 10).



Obrázek 10 Detekce přirozené fosforylace u vzorku lidského IgG, α -kaseinu a β -kaseinu. **Separační dráha č.1** – marker molekulových hmotností; **č.3, 4 a 5** – 0,5; 1 a 2 μ g IgG, bez DTT; **č. 6,7 a 8** – 0,5; 1 a 2 μ g IgG, s DTT a IAA; **č.9** – 1 μ g α - kaseinu; **č. 10** – kontrolní fosfoprotein (β -kasein). **(A)** SDS-PAGE elektroforéza, 12% gel, barveno AgNO₃; **(B)** NC membrána po přenosu, barveno Ponceau S; **(C)** NC membrána po Western blot s pIMAGO detekcí. Doba transferu: 70 minut.

Za stejné podmínky experimenty byl zopakován i s MBP, alfa-synukleinem a kontrolními proteiny, IgG, BSA, α -kaseinu a β -kaseinu. Vzorky byly inkubovány s 2x Laemliho vkladacím pufrem G 3 minuty při 100 °C (bez DTT). Poté byly hned nadávkovány na gel, elektroforeticky rozděleny a přeneseny na membránu. Dále bylo postupováno podle pIMAGO postupu z kapitoly 3.6. Výsledek detekce fosforylace touto metodou je na Obrázku 11.

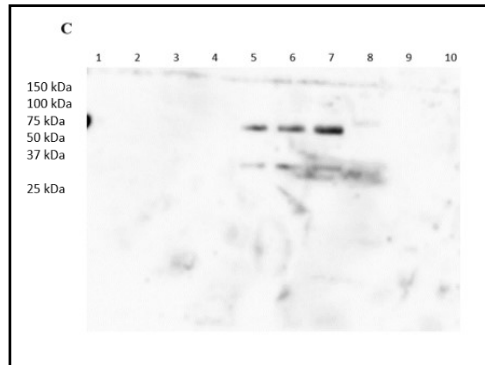


Obrázek 11 Detekce fosforylace proteinů na membráně pomocí pIMAGO. **Separací dráha:** č. 1 – nMBP, koncentrace 1 μg ; č. 2 – Marker molekulové hmotnosti; č. 3 – nMBP, koncentrace 1 μg ; č. 4, 5, 6 – lidské IgG, koncentrace 0,5; 1 a 2 μg ; č. 7 – BSA, koncentrace 1 μg ; č. 8 – α -synuklein, koncentrace 1 μg ; č. 9 – α -kasein, koncentrace 1 μg ; č. 10 – β -kasein. **(A)** SDS-PAGE, 12% gel po přenosu, barveno AgNO_3 , **(B)** NC membrána, barveno Ponceau S, **(C)** NC membrána po Western blot s pIMAGO detekcí.

Na gelu barveném AgNO_3 (Obrázek 11A) je vidět nMBP, IgG, BSA i alfa-synuklein. Kontrolní proteiny (α - i β -kasein) na gelu viditelné nejsou. Na gelu i membráně se velmi často v dráze s β -kaseinem objevoval velmi silný band na spodní části gelu. Podle odhadované molekulové hmotnosti bylo zjištěno, že jde o barvu, která je součástí vzorku, nikoli o fragmentovaný β -kasein. Na NC membráně (Obrázek 11B) je vidět, že proteiny jsou na membránu přeneseny v dostatečném množství, všechny jsou viditelné. Čas transferu 70 minut lze považovat za dostatečný. Později bylo zjištěno, že MBP je fragmentován, na membráně je jasně vidět, že nemá správnou velikost a je třeba použít MBP z jiného alikvotu.

Při další modifikaci experimentu s pIMAGO kitem (obrázek neuveden) nebyl zaznamenán signál na membráně. Stejná membrána byla po detekci pomocí tohoto kitu 5x promyta PBS-T pufrem, pH 7,3 analyzována pomocí imunodetekce (dle kapitoly 3.5.3.). Po imunodetekci došlo k zaznamenání signálu (Obrázek 12). Na membráně byly jasně viditelné

odezvy IgG. Je patrná i různá koncentrace vzorků IgG. Po pIMAGO detekci tedy lze provést detekci pomocí protilátek.



Obrázek 12 Detekce fosforylace u lidského IgG . **Separční dráha:** č. 1 – Marker molekulových hmotností; č. 2, 3, 4 – MBP v koncentracích 1, 2 a 4 μg ; č. 5, 6, 7 – lidské IgG v koncentracích 1, 2 a 4 μg ; č. 8 – BSA v koncentraci 1 μg . NC membrána, značeno anti-pTyr.

4.2. Imobilizovaná Src kináza

Pro následující studium *in-vitro* fosforylace proteinů byla připravena imobilizovaná Src kináza. Cílem experimentů byla imobilizace kinázy kovalentní vazbou na superparamagnetické částice a následné ověření její aktivity fosforylací peptidového substrátu. Imobilizované enzymy mají řadu výhod, jako jsou vyšší odolnost vůči teplotě, změnám pH, kontaminantům a nečistotám, a to i v organickém prostředí. Je možná rychlá separace z reakční směsi a rychlé zastavení reakce. Imobilizovaný enzym si zachovává svou aktivitu a je možné ho použít opakovaně, což činí provedení experimentu levnější [67; 70; 71].

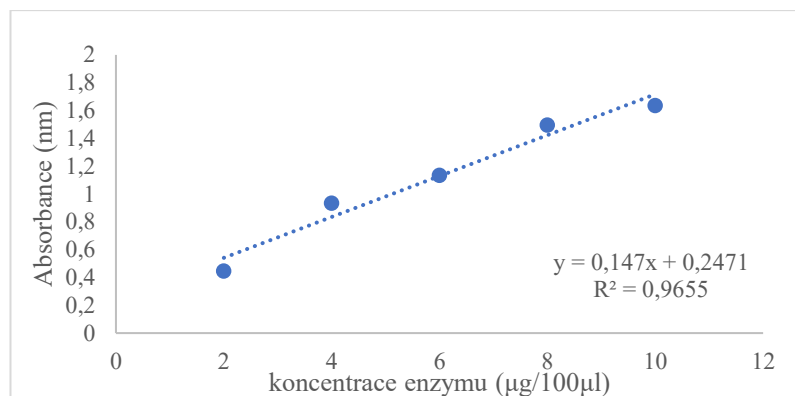
K hodnocení aktivity imobilizované Src byl fosforylován peptidový substrát s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Míra fosforylace byla vyhodnocena jako poměr intenzit píků fosforylovaného (m/z 957,4) a nefosforylovaného substrátu (m/z 877,4) podle Rovnice 1 (v kapitole 3.7.3). Také byla aktivita imobilizované kinázy porovnávána s volnou kinázou.

Před zahájením experimentů se Src kinázou byla metoda vazby enzymu na částice ověřena s enzymem se snadnou a rychlou detekcí aktivity. Pro tento účel byl použit hovězí trypsin (3.4.21.4.) [101].

4.2.1. Imobilizace trypsinu na magnetické částice

Trypsin byl na magnetické částice imobilizován metodou dle [92] s přídavkem BSA dle postupu v kapitole 3.2.1, ve dvou opakováních, a byla u něj sledována aktivita po imobilizaci a také skladovací a operační stabilita. Při metodě vazby byl použit přídavek BSA podle [75] s cílem kontroly nespecifické sorpce proteinů na magnetické částice při následných fosforylacích. Zároveň bylo u vazby modelového enzymu potřeba ověřit, zda BSA neovlivňuje enzymovou aktivitu. Testovaná koncentrace byla 0,05% BSA.

Po imobilizaci byla stanovena aktivita trypsinu pomocí substrátu BAPNA dle postupu v kapitole 3.2.2. BAPNA je chromogenní substrát, který je štěpen trypsinem za uvolnění *p*-nitroanilinu, který byl detekován při vlnové délce 450 nm. To má za následek změnu barvy roztoku, která je snímána kolorimetricky. Pro stanovení koncentrace aktivního trypsinu na částicích byla připravena kalibrační řada (2-20 μg trypsinu na 100 μl roztoku). K vytvoření kalibrační křivky byly použity pouze body z lineární oblasti křivky (Graf 1).



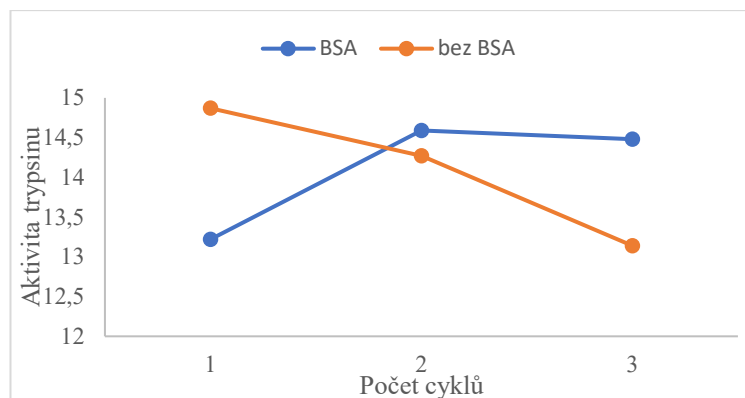
Graf 1 Kalibrační křivka trypsinu. Pracovalo se v dubletu.

K částicím byl přidán substrátový roztok a byla změřena absorbance při 405 nm. Hodnoty absorbance i množství enzymu získané po přepočtu z kalibrační závislosti jsou uvedeny v Tabulce 3. Původní množství enzymu pro vazbu na částice bylo 3 mg/1 mg částic. Na částice se navázala jen část enzymu ze vzorku. Počáteční aktivita enzymu u vzorku s použitím BSA při imobilizaci se jeví jako nižší, nicméně v čase se aktivita enzymu jeví jako stabilnější.

Tabulka 3 Aktivita imobilizovaného trypsinu. Měření probíhalo se 0,1 mg částic s přepočtem na celý nosič. Experiment byl prováděn v dubletu.

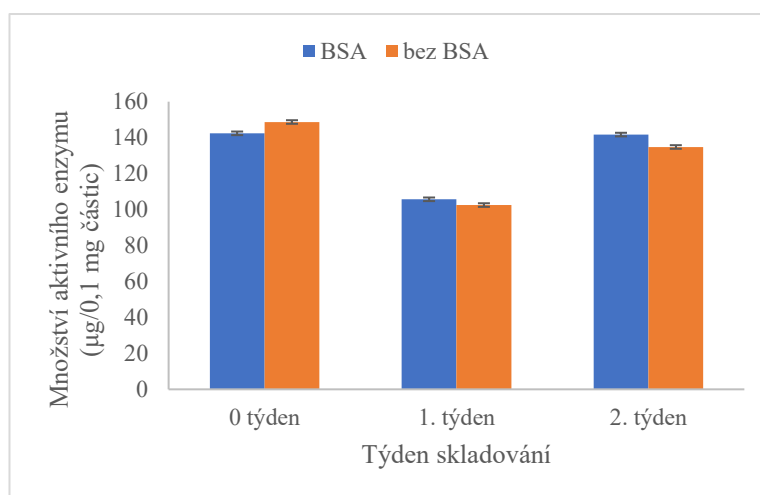
	Průměr	Aktivita enzymu µg / mg částic
Vzorek bez BSA	2,518	148,735 ± 0,004
Vzorek s BSA	2,425	142,408 ± 0,003

Součástí experimentu s přidavkem BSA bylo i sledování operační stability. K částicím s trypsinem po stanovení aktivity byl opět přidán substrátový roztok, a po inkubaci byla proměřena absorbance. Celý experiment byl celkem 3x opakován (Graf 2). Trend aktivity trypsinu na částicích u vzorku bez BSA v čase viditelně a poměrně rychle klesal. Zajímavý je ale trend u vzorku obsahující BSA. Výsledná aktivita u vzorku s BSA se jeví jako stabilnější při opakovaném používání. Na počátku dokonce došlo k nárůstu aktivity. Pro přesnější výsledky by ovšem bylo potřeba více opakování.



Graf 2 Operační stabilita trypsinu imobilizovaného na magnetické částice s BSA a bez něj. Měření probíhalo se 0,1 mg částic s přepočtem na celý nosič. Experiment byl prováděn v dubletu.

Oba vzorky (s přidavkem BSA i bez) byly uschovány při 4 °C a po týdnu analyzovány, aby byla zjištěna i operačně-skladovací stabilita (Graf 3). U imobilizovaných enzymů obecně platí, že aktivita enzymu klesá s dobou skladování a také s počtem používání. I když může být autolýza trypsinu omezena imobilizací, je vhodnější přidat k imobilizovanému trypsinu inhibitor [102]. Po prvním týdnu skladování byl u obou vzorků imobilizovaného trypsinu zaznamenán výrazný pokles aktivity, ke kterému přispěl i fakt, že byl skladován pouze v 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 s 0,01 M CaCl₂. Další týden byly vzorky skladovány v pufru s přidavkem roztoku benzamidinu (0,0032 M), který působí jako tzv. kompetitivní inhibitor aktivity trypsinu. Kompetitivní inhibitor má podobnou strukturu jako substrát, naváže se do aktivního místa enzymu, ale není enzymem štěpen. Způsobuje stabilizaci enzymu. Při zvýšení koncentrace substrátu může být inhibitor z vazby s enzymem vytěsněn. Po týdnu byl u obou vzorků zaznamenán výrazný nárůst aktivity, která se přiblížila aktivitě původní (Graf 3).

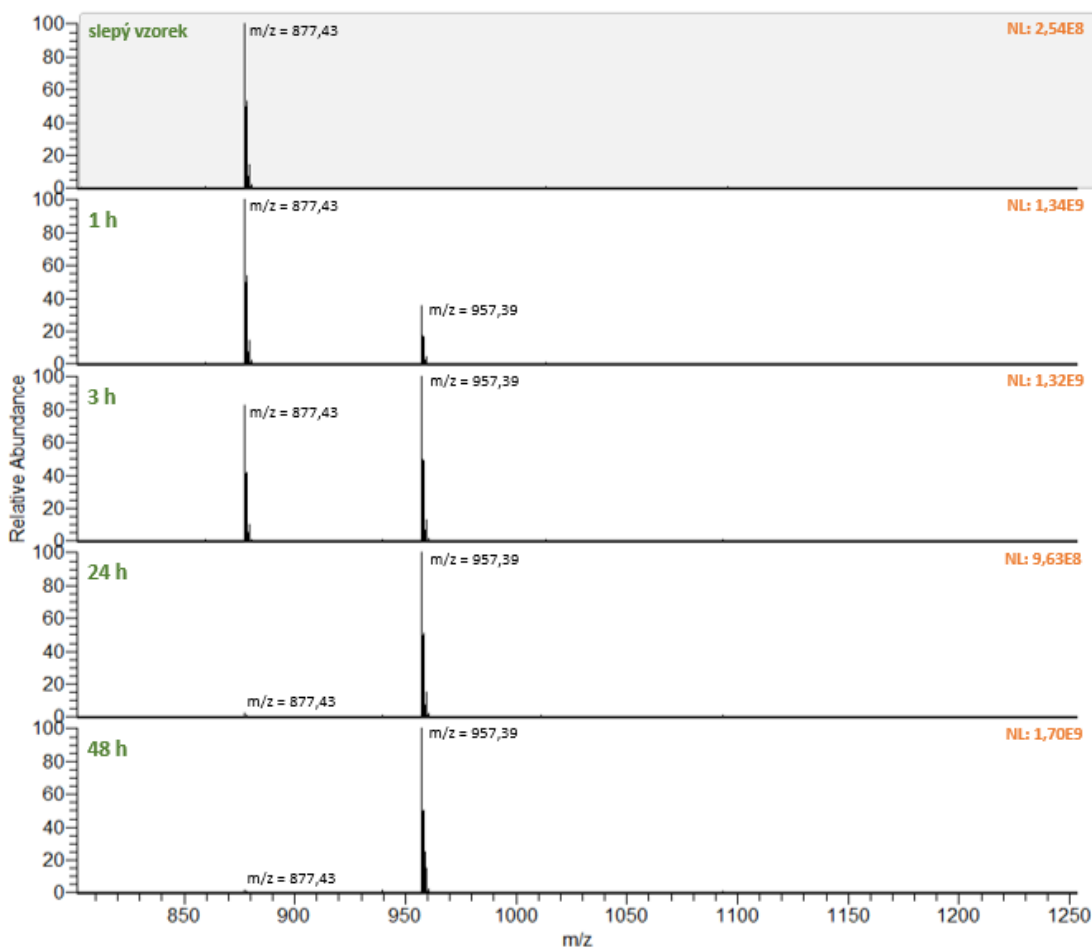


Graf 3 Operačně-skladovací stabilita trypsinu imobilizovaného na částice. Měření probíhalo s 0,1 mg částic. Experiment byl prováděn v dubletu.

Aktivita trypsinu poklesla vlivem přídavku BSA po 2 týdnech skladování o 0,49 %. U vzorku imobilizovaného trypsinu bez přídavku BSA poklesla jeho aktivita o 9,35 %. Přídavek BSA tedy zvýšil stabilitu trypsinu.

4.2.2. Imobilizace Src kinázy na magnetické částice

Cílem experimentu bylo zjištění míry fosforylace peptidového substrátu volnou kinázou v čase. Míra fosforylace byla vypočítána z intenzit píků dle Rovnice 1. U experimentu byly alikvoty odebírány v čase, abychom mohli hodnotit nárůst aktivity volné kinázy. Experiment byl proveden dle kapitoly 3.3.1. Reakční směs tvořil HEPES pufr, ATP, peptidový substrát a volná Src kináza (0,5 μ l) v celkovém reakčním objemu 100 μ l. Pro hodnocení byl připraven slepý vzorek bez enzymu a byl zpracován stejně jako reakční směs. Z reakční směsi a slepého vzorku se byly odebrané alikvoty okyseleny 5% TFA a skladovány v -20 °C. Vzorky byly následně připraveny pro MS analýzu dle postupu v kapitole 3.7. a analyzovány (Graf 4, Tabulka 4).



Graf 4 MALDI-Orbitrap hmotnostní spektra peptidového substrátu fosforylovaného volnou Src kinázou v koncentraci 0,5 μ g. Intenzita laseru: 4 μ l. Matrice DHB.

Tabulka 4 Intenzita píkú fosforylovaného a nefosforylovaného peptidového substrátu a míra fosforylace s volnou Src kinázou ze dvou opakování.

Čas fosforylace	Intenzita píku m/z = 877.43 (nefosf. substrát) * 10 ⁸	Intenzita píku m/z = 957.39 (fosf. substrát) * 10 ⁸	Míra fosforylace (%)	% průměr
1 h	4,18	2,25	35,0	29,80 ± 5,19
	3,49	1,14	24,6	
3 h	3,62	4,98	57,9	54,20 ± 3,72
	4,24	4,32	50,5	
24 h	0,121	5,34	97,8	97,50 ± 0,31
	0,15	4,95	97,1	
	0,142	5,73	97,6	
48 h	0,0955	6,43	98,5	98,30 ± 0,36
	0,0211	1,54	98,6	
	0,0799	3,6	97,8	

Z hmotnostních spekter je patrné, že s přibývajícím časem klesá intenzita píku nefosforylovaného substrátu (m/z 877,43). Zatímco intenzita fosforylovaného substrátu (m/z 957,39) v čase stoupá. Po 48 hodinách fosforylace je ve vzorku většina substrátu (98 %) ve fosforylované formě. U slepého vzorku je pak vidět pouze pik nefosforylovaného substrátu (m/z 877,43). Tímto experimentem jsme si ověřili funkci volné Src kinázy.

V Tabulce 5 je uvedeno srovnání míry fosforylace za stejných podmínek s imobilizovanou kinázou. Bylo imobilizováno 0,5 µg Src kinázy na 0,1 mg magnetických částic (dle postupu 3.2.3.) V tomto případě byla imobilizace kinázy provedena bez přídavku BSA.

Tabulka 5 Srovnání míry fosforylace volné a imobilizované kinázy. Počet opakování 2.

Čas fosforylace	Míra fosforylace volnou kinázou (%)	Míra fosforylace imobilizovanou kinázou (%)
1 h	29,8	0,2
3 h	54,2	1,5
24 h	97,5	8,1
48 h	98,3	13,7

V čase byl u fosforylace imobilizovanou kinázou pozorován jen velmi malý nárůst fosforylace. Důvodem nižší míry fosforylace může být nesprávná orientace imobilizovaného enzymu nebo uvolňování enzymu z nosiče.

V předchozím experimentu se zjistilo, že imobilizace Src kinázy velmi snižuje její aktivitu. Proto bylo pro další experimenty zvýšeno množství imobilizované kinázy na 1 µg/0,1 mg částic. Zároveň bylo přidáno BSA, které by mohlo snížit sorpci kinázy na částice a zlepšit její aktivitu. Src kináza byla imobilizovaná podle metody v [85] a pro porovnání byl jeden vzorek proveden bez přídavku BSA, druhý vzorek v prostředí 0,05 % BSA. Množství kinázy v obou vzorcích bylo 1 µg a pracovalo se v dubletech.

Pro zjištění aktivity Src kinázy byla po imobilizaci provedena fosforylace peptidového substrátu podle metody z kapitoly 3.3.1. Detekce fosforylovaného peptidu byla hodnocena MS (Tabulka 6). Hodnocení míry fosforylace bylo provedeno dle Rovnice 1.

Tabulka 6 Srovnání míry fosforylace imobilizovanou kinázou bez přídavku a s přídavkem BSA. Počet opakování 2.

Čas fosforylace	Míra fosforylace imobilizovanou kinázou bez BSA (%)	Míra fosforylace imobilizovanou kinázou s přídavkem BSA (%)
1 h	1,3	5,7
3 h	16,9	11,2
24 h	4,0	67,3
48 h	38,0	93,2

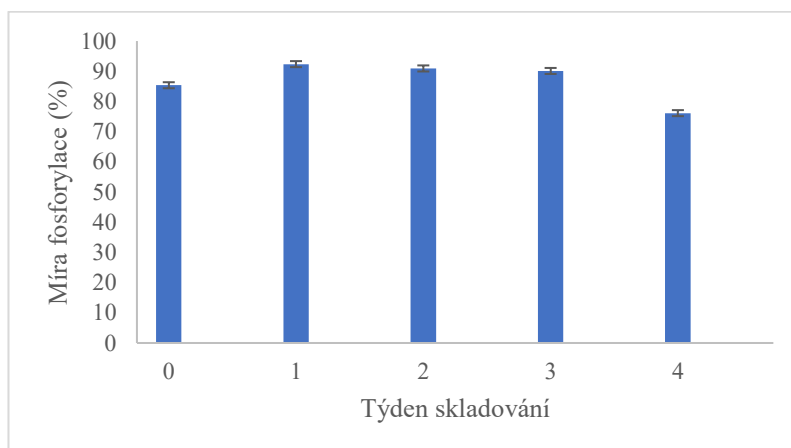
U kinázy imobilizované v prostředí BSA byl v čase pozorován velký nárůst intenzity píku fosforylované formy substrátu s mírou fosforylace přes 93 % po 48 hodinách. U kinázy bez BSA byla míra fosforylace peptidu odpovídající aktivitě po 48 hodinách jen 38 %.

Po imobilizaci byly u obou vzorků a opakování uschovány vazebné frakce s nenavázanou Src kinázou. Tyto frakce byly po zakoncentrování ve vakuovém koncentrátoru na objem 100 µl použity k fosforylaci peptidového substrátu (48 hodin). Následnou MS analýzou bylo zjištěno, že pouze u jednoho vzorku byl detekován malý pík fosforylovaného peptidu a vypočtená míra fosforylace byla 1,6 %. Kináza byla z většiny navázaná na částice.

4.2.3. Skladovací stabilita imobilizované Src

Další z charakterizací imobilizovaného enzymu je sledování skladovací stability. Pro tento účel bylo připraveno 10 alikvotů imobilizované Src kinázy (1 µg Src kinázy na 0,1 mg částic) s přídavkem 0,05% BSA v imobilizační směsi [75]. Po imobilizaci byly po týdně skladování použity k fosforylaci peptidového substrátu 2 alikvoty částic s imobilizovanou Src kinázou, po dobu celkem 4 týdnů. Po 24 hodinách fosforylace byla detekce provedena pomocí MS. Ke skladování sloužil 40 mM HEPES pufr, pH 7,2 a alikvoty

byly skladovány při 4 °C. Z výsledků (Graf 5) je vidět, že BSA zlepšilo aktivitu i stabilitu imobilizované Src. Po imobilizaci byla aktivita imobilizované kinázy 85,36 %. V průběhu jejího skladování došlo k poklesu v aktivitě, za 4 týdny o 10,82 %.



Graf 5 Skladovací stabilita imobilizované Src kinázy s přídavkem BSA.

Od třetího týdne skladování ovšem docházelo po fosforylaci u části magnetických částic ke ztrátě jejich magnetismu. Po vložení do magnetického stojánku nedošlo k jejich přichycení ke stěně, částice s kinázou částečně zůstávaly usazené na dně zkumavky. To by mohlo ukazovat na rozpad magnetických částic.

4.3. Fosforylace MBP Src kinázou *in-vitro* a její detekce

Cílem experimentů byla tyrosinová fosforylace nativního MBP *in-vitro* pomocí volné a imobilizované Src kinázy a ověřit je optimalizovanými metodami Western blot pomocí imunodetekce, dendrimeru pIMAGO a analýzou na hmotnostním spektrometru.

Nativní MBP (P02687_Bovine) má dle databáze UniProt čtyři tyrosiny, na kterých může fosforylace probíhat – 12, 67, 126 a 133 [96]. Z databáze také vyplývá, že může být přirozeně fosforylován na tyrosinu (záleží na izoformě). Při předešlých experimentech se nám fosforylaci na tyrosinu u MBP detekovat nepodařilo, nejspíše tedy není na tyrosinu přirozeně fosforylován.

Při předešlých experimentech v práci [86] bylo zjištěno, že dochází ke ztrátám MBP během fosforylace. Ke ztrátám dochází nejspíše v důsledku vazby na povrchy zkumavek. Proto bylo při dalších modifikacích experimentu použito vyšší množství MBP a vždy byly při práci používány eppendorf zkumavky s nízkou sorpcí. Pro zajištění maximálního zisku MBP byly zkumavky po fosforylaci také proplachovány 0,5% SDS a tento roztok byl přidán ke vzorku. Tento krok se využíval pro maximální zisk proteinu již v [85].

4.3.1. Detekce fosforylace MBP metodou Western blotu s imunodetekcí

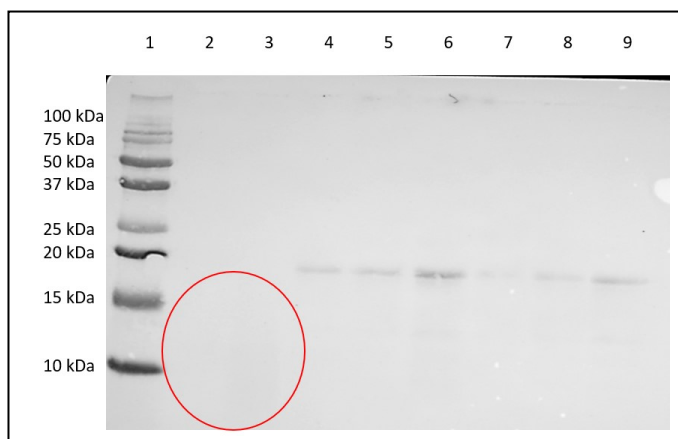
Cílem bylo fosforylovat MBP pomocí volné i imobilizované Src kinázy a následně detekovat fosforylaci pomocí optimalizované metody Western blot s imunodetekcí s anti-pTyr protilátkami, pIMAGO detekcí a ověřit analýzou pomocí MS.

Při první modifikaci experimentu bylo fosforylováno 10 µg MBP pomocí 1 µg volné Src kinázy. Celkový objem reakční směsi byl 100 µl. Z tohoto množství byly 2 µg (20 µl) pro imunodetekci. Tento alikvot byl zpracován dle postupu pro elektroforézu (viz kapitola 3.2.) s následným transferem na membránu a imunodetekcí (kapitola 3.3.). Druhý alikvot obsahující 2 µg (20 µl) byl zpracován dle kapitoly 3.6, detekce proběhla pomocí Western blotu s pIMAGO detekcí. Zbylých 6 µg (60 µl) bylo ponecháno ve zkumavce, okyseleno 5% TFA na hodnotu pH 1-2 a analyzováno pomocí MS.

Na gelu po transferu (Obrázek neuveden) na membránu a barvení roztokem AgNO₃ šlo fosforylovaný MBP (pMBP) je v pozici, ale jen velmi malý náznak. I když byl viditelnější na NC membráně, pomocí specifických protilátek se ho prokázat nepodařilo. Koncentrace je nejspíše velmi nízká pro detekci. Ačkoli by měla být koncentrace fosforylovaného MBP i nativního podobná a to 1 µg/jamku, na gelu i na membráně šlo vidět, že nativního MBP (nMBP) je zde výrazně více. Fosforylace u MBP nejspíše způsobila to,

že se MBP více přichytává na stěny zkumavek, a proto ho je na gelu méně. Dále byla na gelu viditelná molekula IgG, která byla prokázána i pomocí specifických protilátek. Na gelu i membráně byla viditelná Src kináza, její velikost ke 85 kDa. Díky přirozené fosforylace na Tyr419 ji bylo možné vidět i po imunodetekci. Na gelu byl i kontrolní fosfoprotein z pIMAGO kitu, kterým je β -kasein. Ten ale pomocí imunodetekce vizualizován nebyl, protože nenese fosforylaci na tyrosinu.

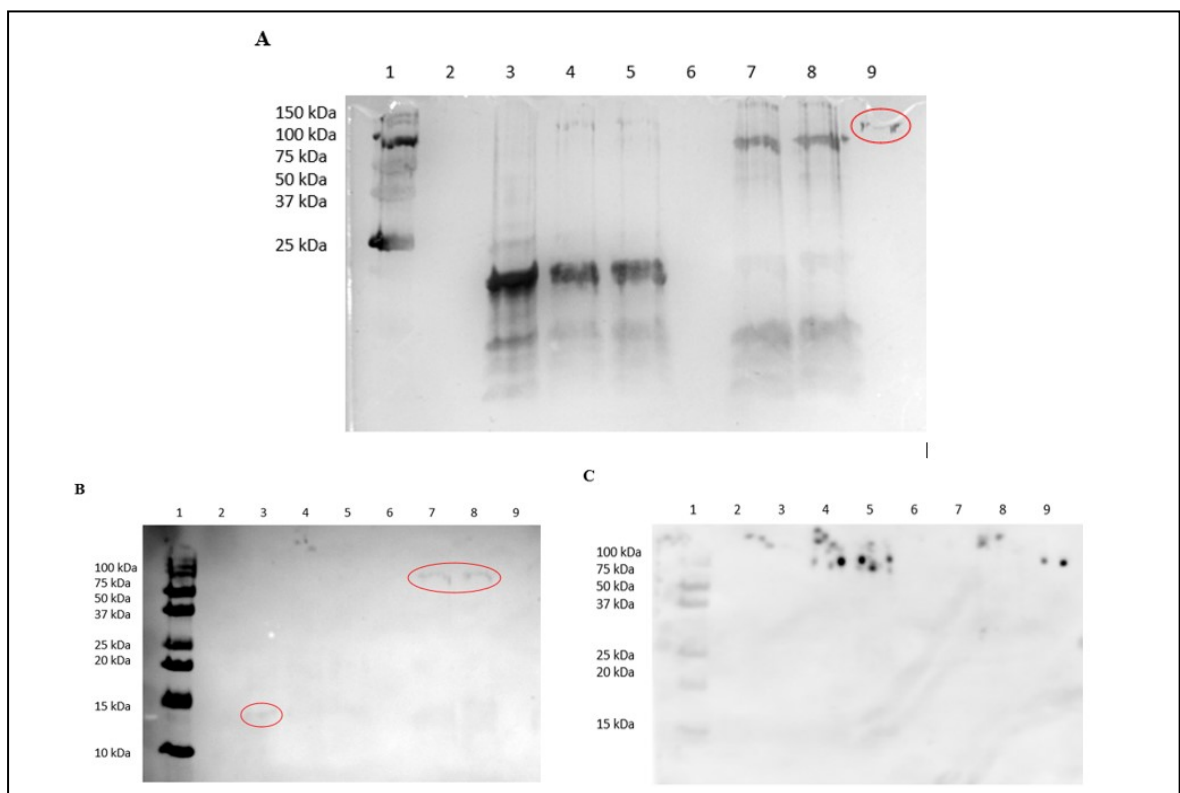
Ze zbylých 6 μg určených pro detekci na MS byly odebrány 2 μg , upraveny dle postupu 3.7. a analyzovány na MS. Ani tady se fosforylaci nepodařilo prokázat. Důvodem opět mohlo být velmi malé množství analytu. Množství se odebíralo dle teoretického výpočtu. Při dalších experimentech bylo potřeba pro tuto detekci odebrat větší množství analytu. Později bylo zjištěno že MBP, který byl v mrazáku připravený byl již fragmentovaný. Přišlo se na to při experimentu, kdy byl použit 16,5% gel, a kterém bylo jasně vidět, že MBP nemá správnou velikost a jedná se jen o jeho fragmenty. Takže důvodem předešlých neúspěšných výsledků mohla být i fragmentace proteinu. Proto bylo třeba připravit nové MBP a srovnat jeho velikost se starým MBP. Výsledek transferu je vidět na Obrázku 13. Velikost nového MBP odpovídá 18 kDa. U starého MBP je vidět je šmouha o velikosti 10 kDa. Část MBP byla povářena s DTT (25 mM), aby se ověřilo, zda bude i nové MBP tvořit šmouhy vlivem DTT. MBP bez DTT a s DTT se od sebe lišily jen málo, velký vliv na tvoření šmouh tedy DTT nemá. Pro další experimenty byl tedy používán nově připravený MBP.



Obrázek 13 Ověření molekuly MBP z nového alikvotu. **Separační dráha č. 1** – Marker molekulových hmotností; **č. 2, 3** – původní MBP, koncentrace 2 μg ; **č. 4, 5, 6** – nový MBP, koncentrace 0,5; 1 a 2 μg ; **č. 7, 8, 9** – nové MBP, s DTT a IAA, koncentrace 0,5; 1 a 2 μg . NC membrána obarvená v Ponceau S.

Mohlo se tedy pokračovat v experimentech s novým MBP. Fosforylováno bylo celkem 10 μg MBP pomocí 1 μg Src imobilizované na 0,1 mg částic a pro srovnání i 1 μg volné Src. Oba experimenty byly provedeny v dubletu. Celkové množství 100 μl bylo rozděleno

dle kapitoly 3.3.3. Prázdná zkuševka po fosforylaci byla vypláchnuta roztokem 0,5% SDS, protože již při dřívějším experimentu bylo zjištěno, že se MBP ztrácí. Právě vypláchnutí roztokem SDS by mělo pomoci uvolnit MBP sorbovaný na povrch zkuševky. Po zakoncentrování byly vzorky dávkovány na gel. Aby nedocházelo ke zbytečnému ředění, byl použit 4x Laemliho vkladací pufr. Teoretické množství MBP při dávkování na gel bylo 2 μg . Pro kontrolu byl do jedné pozice přidán i nativní MBP, také v množství 2 μg a Src kináza (0,5 μg), která by posloužila i jako pozitivní kontrola, protože je fosforylována na tyrosinu. Protože se tentokrát pracovalo pouze s malými proteiny, byl použit 16,5% gel. Po provedení elektroforézy a přenosu na membránu byl na membráně vidět pouze marker, jen lehký náznak nMBP. Dále pak Src kináza u vzorků pMBP fosforylovaných volnou kinázou (Obrázek 14). Po inkubaci s protilátkami byl zaznamenán signál pouze od Src kináz. Je ale vidět, že při transferu nebyly přeneseny všechny separované proteiny. Po obarvení gelu v roztoku AgNO_3 se na gelu objevil marker, Src kináza a lehce MBP. Zvláštní je viditelný pokles koncentrace u MBP fosforylovaného pomocí volné kinázy. Se vzorkem bylo zacházeno stejně, jako se vzorkem fosforylovaným imobilizovanou kinázou. A naopak jsou zde vidět spíše jeho fragmenty.



Obrázek 14 Detekce fosforylace MBP pomocí imunodetekce. **Separáčn**í dráha č.1 – Marker molekulových hmotností; č. 3 – nMBP, koncentrace 2 μg ; č. 4 a 5 – pMBP fosforylovaný imobilizovanou Src, koncentrace 2 μg ; č. 7 a 8 – pMBP volnou kinázou, koncentrace 2 μg ; č. 9 – Src kináza, koncentrace 0,4 μg . (A) SDS-PAGE, 16,5% gel, barveno AgNO_3 ; (B) NC membrána, barveno Ponceau S; (C) NC membrána po imunodetekci pomocí anti-pTyr.

4.3.2. Detekce fosforylace MBP metodou Western blotu s pIMAGO

Cílem byla detekce fosforylace provedené na MBP imobilizovanou a volnou Src kinázou. Metodou Western blotu s pIMAGO detekcí se již úspěšně povedlo detekovat přirozenou fosforylací na alfa-kaseinu a IgG molekule.

Experiment byl zopakován s novým alikvotem MBP, byly použity vzorky zpracované dle kapitoly 3.3.3. Po transferu na membránu a jejím obarvení nebyly viditelné žádné proteiny. Po detekci byl zaznamenán signál pouze od kontrolního proteinu, MBP vidět nebyl. Nejspíše i v tomto případě neproběhl ideálně transfer.

4.3.3. Analýza fosforylace MBP hmotnostní spektrometrií

Vzorky proteinu (2 µg) určené pro MS detekci byly zpracovány dle postupu v kapitole 3.7. a analyzovány na hmotnostním spektrometru. Hodnocení spekter provedl Mgr. Ondřej Morávek. U získaných hmotnostních spekter tryptických peptidů MBP byla hodnocena přítomnost fosforylací, především na tyrosinu. Spektra byla v programu porovnána se sekvencí MBP. Pro vyhodnocení je třeba znát sekvenci hovězího MBP (Obrázek 15) a také přirozené fosforylace u nativního MBP. Tento protein má několik izoform, které se od sebe liší mino jiné i fosforylacemi. Nativní MBP je fosforylován převážně na serinech a threoninech [96]. Hovězí MBP má v AMK sekvenci 4 tyrosiny, které mohou být teoreticky fosforylovány – tyrosin 12, 67, 126 a 133.

AAQKRPSQRS	KYLASASTMD	HARHGFLPRH	RDTGILDSLQ
RFSGSDRGAP	KRSGSGKDGHH	AARTTHYGSL	PQKAQGHPRQ
DENPVVHFFK	NIVTPRTPPP	SQKGRGLSL	SRFSWGAEGQ
KPGFGYGGRA	SDYKSAHKGL	KGHDAQGTL	KIFKLGGRDS
RSGSPMARR			

Obrázek 15 AMK sekvence nativního hovězího MBP s vyznačenými tyrosiny, na kterých může fosforylace proběhnout. Převzato z [96].

V Tabulce 7 jsou uvedeny tryptické peptidy získané analýzou vzorku MBP po fosforylací imobilizovanou a volnou Src kinázou. Experiment byl prováděn v dubletu.

Výsledky z MS potvrdily fosforylací MBP na tyrosinu 12, 67 u obou vzorků fosforylovaného MBP (volnou i imobilizovanou Src kinázou). Fosforylace na tyrosinu 126 byla prokázána u MBP fosforylovaného volnou Src kinázou, u MBP fosforylovaného imobilizovanou

nelze s jistotou říct, zda fosforylace na tomto tyrosinu proběhla. U MBP fosforylovaného volnou kinázou by mohla být fosforylace i na tyrosinu 133, ale také to nelze s jistotou říci. Tohoto závěru můžeme dospět za předpokladu, že Src kináza fosforylovala specificky pouze tyrosiny.

Tabulka 7 MS detekce fosforylací u molekuly MBP po fosforylaci imobilizovanou a volnou Src kinázou. Vzorky byly připraveny ve dvou opakováních a každý byl analyzován v dubletu.

MBP fosforylovaný imobilizovanou Src kinázou							
m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba Δ ppm	PTM	Začátek sekvence	Konec sekvence	Vynechaná štěpná místa	AMK sekvence
1211,549	1211,546	2,73	1Phospho	64	73	0	(R)TTHYGSLPQK(A)
1402,585	1402,582	1,85	1Phospho	12	23	0	(K)YLASASTMDHAR(H)
1617,711	1617,709	1,34	1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1617,71	1617,709	0,623	1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1633,706	1633,704	1,16	1Oxidation 1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1880,805	1880,812	-3,6	1Phospho	113	129	0	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)
3198,517	3198,527	-3,09	1Phospho	64	90	1	(R)TTHYGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFK(N)
3878,906	3878,924	-4,49	1Phospho	64	96	2	(R)TTHYGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFKNIVTPR(T)
MBP fosforylovaný volnou Src kinázou							
m/z (experimentální)	m/z (teoretická)	Chyba Δ ppm	PTM	Začátek sekvence	Konec sekvence	Vynechaná štěpná místa	AMK sekvence
1384,664	1384,662	1,16	1Phospho	130	141	2	(R)ASDYKSAHKGLK(G)
1402,587	1402,582	3,66	1Phospho	12	23	0	(K)YLASASTMDHAR(H)
1617,711	1617,709	1,23	1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1633,706	1633,704	1,11	1Oxidation 1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1880,814	1880,812	1,05	1Phospho	113	129	0	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)
3198,518	3198,527	-2,94	1Phospho	64	90	1	(R)TTHYGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFK(N)
1402,585	1402,582	2,1	1Phospho	12	23	0	(K)YLASASTMDHAR(H)
1617,712	1617,709	1,48	1Phospho	10	23	1	(R)SKYLASASTMDHAR(H)
1880,814	1880,812	1,41	1Phospho	113	129	0	(R)FSWGAEGQKPGFGYGGR(A)
3198,522	3198,527	-1,7	1Phospho	64	90	1	(R)TTHYGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFK(N)
3878,915	3878,924	-2,21	1Phospho	64	96	2	(R)TTHYGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFKNIVTPR(T)

Povedlo se tedy fosforylovat MBP volnou i imobilizovanou Src kinázou. I když se nám fosforylaci nepovedlo prokázat na membráně po Western blotu pomocí imunodetekce a dendrimera pIMAGO, můžeme po MS detekci říci, že se fosforylace povedla. U detekcí na membráně byl nejspíše problém s přenosem proteinů z gelu na membránu, proto nebyly detekovány odezvy. Pro lepší výsledky MS detekce by ale bylo třeba zvýšit množství proteinu, a to na množství minimálně 10 μ g. I když bylo při imobilizaci kinázy použito BSA a Lobind zkumavky, může docházet k sorbování proteinu na stěny zkumavek nebo na magnetické částice.

Při hodnocení MS spekter je třeba vzít v úvahu i hodnotu Δ ppm. Čím je její hodnota vyšší, tím méně je výsledek přesný. V našem případě byla brána hodnota do |10|.

4.4. Fosforylace alfa-synukleinu Src kinázou *in-vitro* a její detekce

Dalším proteinem vybraným k *in-vitro* fosforylaci byl rekombinantní lidský alfa-synuklein. Tento protein byl vyprodukovaný v *E. coli*, a nepředpokládá se tak přirozená fosforylace, která by mohla být nalezena u savců. Z databáze UniProt vyplývá, že ve struktuře má protein celkem 4 tyrosiny, na kterých může teoreticky fosforylace proběhnout. Jsou to tyrosiny 39, 125, 133 a 136. Zatím nebylo zjištěno, zda má fosforylace na tyrosinu 133 nebo 136 vliv na agregaci alfa-synukleinu. Fosforylace na tyrosinu 125 vliv na agregaci nemá. Jako problémová se ale ukazuje hyperfosforylace na tyrosinu 39 [41].

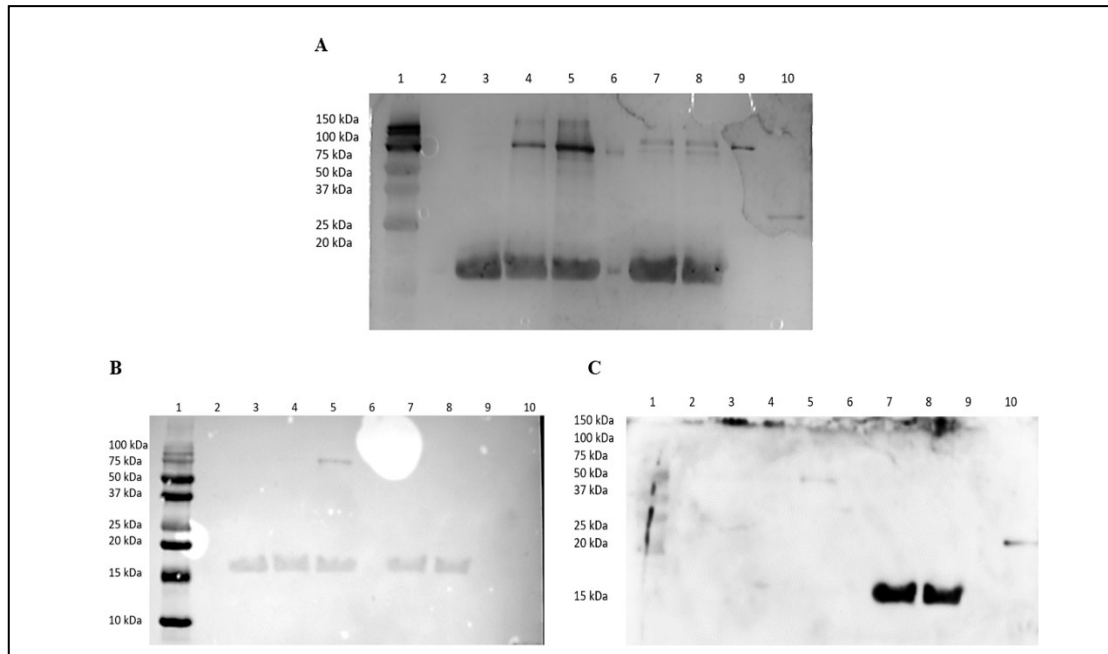
Protein byl fosforylován *in-vitro* volnou i imobilizovanou Src kinázou. Detekce fosforylace proteinu proběhla metodami Western blot s protilátkami specifickými k anti-pTyr a se specifickými protilátkami k alfa-synukleinu - anti-Tyr39. Dále proběhla detekce metodou Western blotu s dendrimerem pIMAGO a detekce MS.

4.4.1. Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blotu s pIMAGO

Nejprve byla provedena fosforylace (v dubletech) alfa-synukleinu (10 µg) dle postupu v kapitole 3.3.3. a 3.3.4. Následně bylo 100 µl směsi rozděleno: 20 µl bylo odebráno a okyseleno 5% TFA, zbylých 80 µl bylo určeno na SDS-PAGE analýzu a Western blotu s imunodetekcí a pIMAGO detekcí. Prázdňá zkumavka po fosforylaci byla propláchnuta 50 µl 0,5% SDS, a poměrně rozdělena ke vzorku na MS analýzu, vzorku určenému na elektroforézu. Vzorek byl před elektroforézou zakoncentrován na objem 50 µl. Objem 25 µl byl okyselen 5% TFA a uschován v -20°C. Zbylá polovina vzorku byla zpracován dle postupu pro Western blot a následnou imunodetekci (kapitola 3.5) a detekci s dendrimerem pIMAGO (kapitola 3.6).

Vzorky byly zpracovány dle postupu v kapitole 3.6. Při srovnání gelu barveného AgNO₃ a membrány barvené v Ponceau S (Obrázek 16) je vidět, že nedošlo k dokonalému přenosu všech proteinů. Na gelu (Obrázek 16A) můžeme vidět rekombinantní alfa-synuklein, který je přítomný pouze ve formě monomeru (14 kDa), protože je vzorek při přípravě inkubován s DTT. Zároveň lze u všech vzorů fosforylovaného alfa-synukleinu vidět Src kináza. Viditelná by ale měla být jen u vzorku fosforylovaného volnou Src kinázou, protože tam není možnost ji po fosforylaci od vzorku oddělit. Její přítomnost i u vzorku, který byl fosforylován imobilizovanou Src kinázou značí, že se kináza uvolňuje z nosiče. Možným důvodem uvolňování kinázy z nosiče je inkubace prázdné zkumavky s částicemi s 0,5% SDS. Na membráně po obarvení v Ponceau S je vidět p-alfa-synuklein fosforylovaný

volnou Src kinázou i Src kináza. Po provedení pIMAGO detekce lze vidět signál u kontrolního proteinu, u Src kinázy uvolněné z nosiče a alfa-synukleinu fosforylovaného volnou Src kinázou. Fosforylace synukleinu imobilizovanou Src kinázou nebyla detekována.

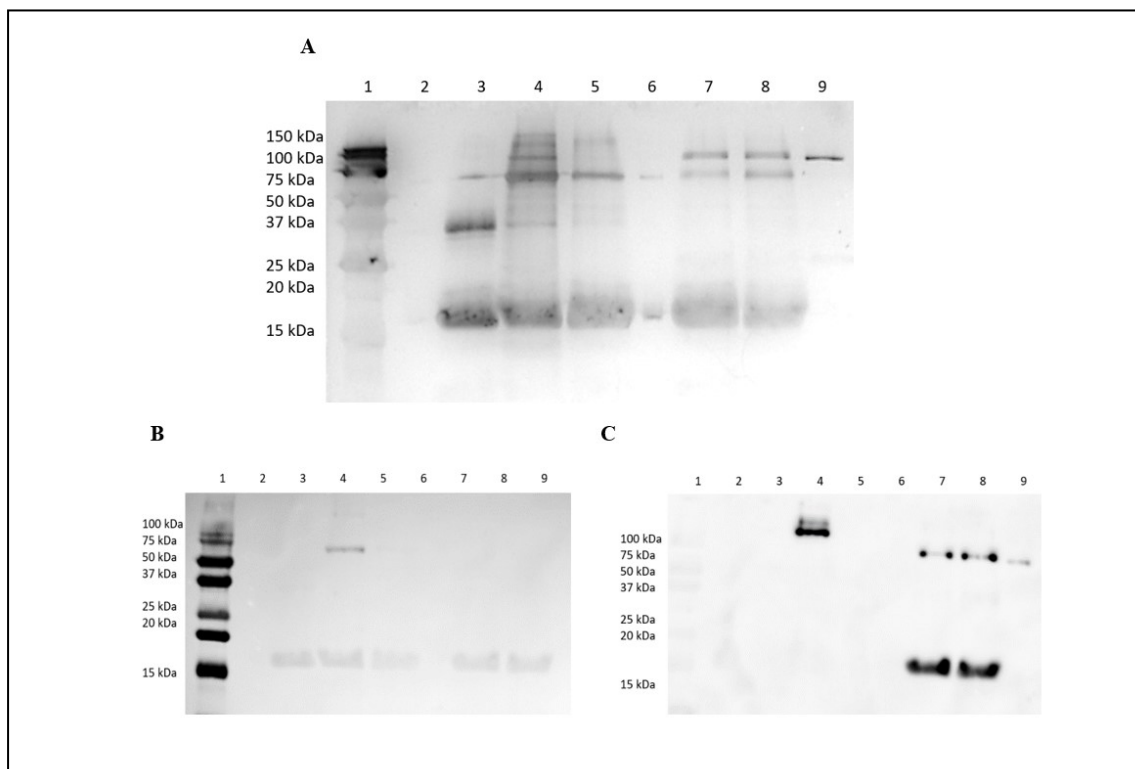


Obrázek 16 Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blot s pIMAGO detekcí. **Separační dráha č.1** – Marker molekulových hmotností; **č. 3** – rekombinantní alfa-synuklein, koncentrace 2 μg ; **č. 4 a 5** – fosforylovaný alfa-synuklein fosforylovaný imobilizovanou Src, koncentrace 2 μg ; **č. 7 a 8** – p-alfa-synuklein, fosforylovaný volnou kinázou, koncentrace 2 μg ; **č. 9** – Src kináza, koncentrace 0,4 μg ; **č.10** – kontrolní fosfoprotein. **(A)** SDS- PAGE, 16,5% gel, barveno koloidním stříbrem; **(B)** NC membrána, barveno Ponceau S; **(C)** NC membrána po Western blotu s pIMAGO detekcí.

4.4.2. Detekce fosforylace alfa-synukleinu metodou Western blotu s imunodetekcí

V tomto experimentu byly pro imunodetekci použity dvojí protilátky proti fosforylovanému tyrosinu, a to anti-pTyr protilátky, a anti-pTyr39, které se naváží specificky pouze na fosforylovaný tyrosin 39 alfa-synukleinu.

Vzorek fosforylovaného alfa-synukleinu z kapitoly 4.4.1. byl analyzován i pomocí specifických protilátek. Na membráně po separaci SDS-PAGE a Western blotu byl po obarvení v Ponceau S (Obrázek 17) detekován alfa-synukleín a nejspíše i Src kináza uvolněná z nosiče.



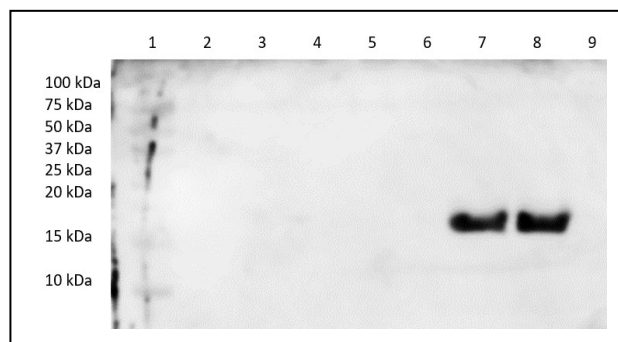
Obrázek 17 Detekce fosforylace alfa-synukleinu pomocí imunodetekce. **Separční dráha č.1** – Marker molekulových hmotností; **č. 3** – rekombinantní alfa-synukleín, koncentrace 2 μg ; **č. 4 a 5** – fosforylovaný alfa-synukleín fosforylovaný imobilizovanou Src, koncentrace 2 μg ; **č. 7 a 8** – fosforylovaný alfa-synukleín, fosforylovaný volnou kinázou, koncentrace 2 μg ; **č. 9** – Src kináza, koncentrace 0,4 μg . **(A)** SDS-PAGE, 16,5% gel, barveno AgNO_3 ; **(B)** NC membrána, barveno Ponceau S; **(C)** NC membrána po imunodetekci pomocí anti-pTyr.

Po obarvení gelu v AgNO_3 je vidět, že část proteinů na něm zůstala a nepřenesla se. Protože nebyl použit merkaptoetanol nebo DTT, na gelu můžeme vidět, že rekombinantní alfa-synukleín vytváří trimery. Monomer má MW 14 kDa, na gelu lze vidět další band odpovídající zhruba 40 kDa. U všech p-alfa-synukleínů lze vidět Src kinázu. Správně by měla být jen u vzorků fosforylovaných volnou kinázou. Nejspíš tedy dochází k uvolňování kinázy z nosiče. Správně by měla být na nosič navázána kovalentně. Může ale dojít k tomu,

že se na nosič naváže sorpcí (nekovalentně), v takovém případě pak může dojít k jejímu uvolňování při vymývání zkumavek 0,5% SDS. V případě alfa-synukleinu nebyl na gelu pozorován tak výrazný pokles množství proteinu po fosforylaci volným enzymem jako u MBP. Na gelu jsou vidět všechny proteiny v dostatečné intenzitě. Transfer na membránu nebyl ideální ale alfa-synukleín se přenesl v dostatečném množství pro následnou detekci fosforylace. Po imunodetekci byl zaznamenán poměrně silný signál od alfa-synukleinu fosforylovaného volným enzymem. Takže můžeme říci, že se povedla fosforylace proteinu. Nepovedlo se detekovat signál proteinu fosforylovaného imobilizovaným enzymem. Na membráně by přitom měl být v dostatečném množství. Důvodem může být nízká koncentrace (ne všechny protein může být fosforylován) nebo se fosforylace nezdařila vůbec. Další protein, který poskytuje pozitivní odezvu je Src kináza.

V dalším experimentu byly použity protilátky pouze proti pTyr39. Cílem bylo zjistit, zda fosforylace proběhla na Tyr39 nebo na jiném tyrosinu. Právě tato fosforylace se ukazuje jako jednou z příčin tvorby nerozpustných agregátů alfa-synukleinu (Lewyho tělísek) [41]. Primární myší monoklonální IgG1 protilátka se specifitou anti-pTyr39 se naváže na cílovou strukturu fosforylovaného tyrosinu 39 v AMK sekvenci alfa-synukleinu specificky. Při Western blotu a následné imunodetekci se záznamem chemiluminiscenční odezvy se tak objeví pozitivní odezva jen v případě, že fosforylace alfa-synukleinu proběhla na Tyr39. Pokud by proběhla na jiných tyrosinech, nebyla by fosforylace detekována.

Pro detekci fosforylace alfa-synukleinu pomocí Western blotu s detekcí specifickou protilátkou byla využita membrána po pIMAGO detekci [80]. Membrána byla promyta PBS-T pufrém, pH 7,4 (promývání probíhalo přes noc, při 4°C na třepačce), následně blokována v 10% roztoku sušeného mléka v PBS-T, pH 7,2 a dále se pokračovalo dle postupu v kapitole 3.5.3. Po inkubaci se substrátovým roztokem byla detekována odezva fosforylace alfa-synukleinu s volnou kinázou (Obrázek 18).



Obrázek 18 Detekce fosforylace alfa-synukleinu na Tyr39 na NC membráně. **Separční dráha č.1** – Marker molekulových hmotností; **č. 3** – rekombinantní alfa-synuklein, koncentrace 2 µg; **č. 4 a 5** – p-alfa-synuklein fosforylovaný imobilizovanou Src, koncentrace 2 µ; **č. 7 a 8** – p-alfa-synuklein, fosforylovaný volnou kinázou, koncentrace 2 µg; **č. 9** – Src kináza, koncentrace 0,4 µg.

4.4.3. Analýza fosforylace alfa-synukleinu hmotnostní spektrometrií

Vzorky proteinu (2µg) určené pro MS detekci byly zpracovány dle postupu v kapitole 3.7. a analyzovány na MS. Získaná hmotnostní spektra byla porovnána v programu porovnána se sekvencí alfa-synukleinu a byly hledány rozdíly. Jedná se o rekombinantní protein, který ve své struktuře nemá žádné savčí fosforylace. Hodnocení je tedy snazší než u nativního MBP. Pro porovnání bylo třeba znát i sekvenci AMK rekombinantního alfa-synukleinu (Obrázek 19). Analýzou pomocí MS objeveny některé fosforylace na threoninu a serinu. S ohledem na zaměření DP budou vyhodnoceny pouze ty fosforylace, které jsou na tyrosinu.

MDVFMKGLSK	AKEGVVAAAE	KTKQGVAAEA	GKTKEGVLYV
GSKTKEGVVH	GVATVAEKT	EQVTNVGGAV	VTGVTAVAQK
TVEGAGSIAA	ATGFVKKDQL	GKNEEGAPQE	GILEDMPVDP
DNEAYEMPSE	EGYQDYEPEA		

Obrázek 19 Sekvence AMK rekombinantního alfa-synukleinu s vyznačenými tyrosiny, na kterých může fosforylace proběhnout. Převzato z [29].

Ve studii [103] byla detekována fosforylace lidského synukleinu v pozici Tyr39, analýzou LC- MS/MS. Byl zde zkoumán mozkomíšní mok zdravých dárců a pacientů s Parkinsonovou chorobou a bylo zjištěno, že u nemocných pacientů je v mozkomíšním moku vyšší množství hyperfosforylovaného alfa-synukleinu na tyrosinu 39. Proto se o něm uvažuje jako o možném diagnostickém markeru [103].

U alfa-synukleinu může proběhnout fosforylace teoreticky na 4 tyrosinech – 39, 125, 133 a 136. Kromě tyrosinu může být alfa-synukleín fosforylován i na serinu. V lidském organismu je alfa-synukleín fosforylován především na serinových reziduích – Ser87 a Ser129 [29]. Vzhledem k použití tyrosin kinázy při fosforylaci byly v hmotnostních spektrech vyhledávány především fragmenty obsahující tyrosin, na kterých byla sledována přítomnost fosforylace.

U alfa-synukleinu fosforylovaného volnou i imobilizovanou kinázou nebyly detekovány peptidy obsahující fosforylaci na tyrosinu. I když se sice pomocí specifických protilátek a pomocí dendrimera pIMAGO fosforylace podařila prokázat, potvrdit MS analýzou se jí nepodařilo. Důvodem může být příliš nízká koncentrace proteinu. Pro příští experimenty je třeba navýšit množství proteinu, a to minimálně na 10 μg . Z časových důvodů již nebylo možné experimenty opakovat.

Při hodnocení MS spekter je třeba vzít v úvahu i hodnotu Δppm . Čím je její hodnota vyšší, tím méně je výsledek přesný. V našem případě byla brána hodnota do |10|.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla detekce fosforylace proteinů Src kinázou, imobilizovanou na magnetické částice. Při imobilizaci Src kinázy byl použit přídavek BSA, který výrazně zlepšil její aktivitu (oproti imobilizaci bez použití BSA). Její aktivita po imobilizaci s BSA je v experimentu v čase zcela srovnatelná s aktivitou volné Src kinázy. Při experimentech bylo zjištěno, že se kináza z nosiče uvolňuje. A to i když byla vázána na magnetické částice s modifikovaným karboxylovým povrchem kovalentní vazbou, která je poměrně pevná. Důvodem uvolňování pak může být proplachování částic po fosforylaci 0,5 % SDS.

Také skladovací stabilita imobilizované proteinkinázy byla v případě přídatku BSA výrazně lepší. Po čtyřech týdnech skladování poklesla aktivita enzymu jen o 10,82 %. Imobilizovaný enzym si tedy dlouhodobě udržoval svou aktivitu, jen s malým poklesem. Zároveň bylo zjištěno, že po třech týdnech skladování došlo po fosforylaci peptidu k rozpadání magnetických částic a ke ztrátě jejich magnetizmu. I to může stát za poklesem aktivity kinázy.

Dále byla cílem fosforylace myelinového bazického proteinu a alfa-synukleinu imobilizovanou a volnou Src kinázou a její detekce. Nejprve byla optimalizována SDS-PAGE separace a detekce proteinů, jejich transfer na NC membránu a následná detekce přirozené fosforylace proteinů pomocí fosfospecifických protilátek a dendrimeru pIMAGO.

V případě fosforylace MBP *in-vitro* jsme prokázali fosforylace na tyrosinu, a to pomocí volné i imobilizované Src kinázy, metodou hmotnostní spektrometrie. Tuto fosforylaci se nepodařilo prokázat pomocí Western blotu s imunodetekcí a ani s dendrimerem pIMAGO. V obou případech nejspíše neproběhl správně transfer na membránu, a proto by bylo třeba experiment zopakovat. Koncentrace fosfoproteinu (2 μ g) by měla být dostatečná pro detekci.

U alfa-synukleinu byla po *in-vitro* fosforylaci volnou Src kinázou detekována fosforylace na tyrosinu pomocí Western blotu s imunodetekcí a s dendrimerem pIMAGO. Díky protilátkám specifickým proti fosforylovanému Tyr39 v alfa-synukleinu se prokázala fosforylace přímo na tyrosinu 39. Analýza hmotnostní spektrometrií fosforylaci na tyrosinu neprokázala. Experiment s MS analýzou by bylo také potřeba zopakovat, s vyšší koncentrací (více než 2 μ g) proteinu. Problémem detekce proteinů po *in-vitro* fosforylaci proteinkinázami jsou jejich ztráty v plastech a na magnetických částicích. Proto je potřeba mít jejich koncentrace vyšší a pracovat s materiály, které omezí jejich nespecifickou adsorpci.

6. ZDROJE

- [1] TAYLOR, Susan a Alexandr KORNEV. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011, **36**(2), 65-77. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006
- [2] NEWTON, Alexandra C. Protein kinases in tune. *IUBMB Life*. 2019, **71**(6), 670-671. Dostupné z: doi:10.1002/iub.2065
- [3] MILLER, Chad a Benjamin TURK. Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 2018, **43**(5), 380-394. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.02.009
- [4] TAN, Penglong, Chunyang LEI, Xin LIU, Meng QING, Zhou NIE, Manli GUO, Yan HUANG a Shouzhuo YAO. Fluorescent detection of protein kinase based on zirconium ions-immobilized magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2013, **780**, 89-94. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.03.070
- [5] ROSKOSKI, Robert. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*. 2015, **94**, 9-25. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2015.01.003
- [6] BRAUTIGAN, David L. Protein Ser/Thr phosphatases - the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS Journal*. 2013, **280**(2), 324-325. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x
- [7] NELSON, David a Michael COX. *Principles of biochemistry*. Fourth edition. New York, 229 231 s. Dostupné také z: <http://aulanni.lecture.ub.ac.id/files/2012/01/15616949-Lehninger-Principles-of-Biochemistry-1-copy.pdf>
- [8] BOUTIN, Jean A. Tyrosine protein kinase assays. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996, **684**(1-2), 179-199. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(95)00563-3
- [9] SLOVAKOVA, Marcela a Zuzana BILKOVA. Contemporary Enzyme-Based Methods for Recombinant Proteins In Vitro Phosphorylation. *Catalysts*. 2021, **11**(8). Dostupné z: doi:10.3390/catal11081007
- [10] KNAPE, Matthias, Maximilian WALLBOTT, Nicole BURGHARDT, Daniela BERTINETTI, Jan HORNUNG, Sven SCHMIDT, Robin LORENZ a Friedrich HERBERG. Molecular Basis for Ser/Thr Specificity in PKA Signaling. *Cells*. 2020, **9**(6). Dostupné z: doi:10.3390/cells9061548
- [11] K. BHANUMATHY, Kalpana, Amrutha BALAGOPAL, Frederick VIZEACOUMAR, Franc VIZEACOUMAR, Andrew FREYWALD a Vincenzo GIAMBRA. Protein Tyrosine Kinases Their Roles and Their Targeting in Leukemia. *Cancers*. 2021, **13**(2). Dostupné z: doi:10.3390/cancers13020184
- [12] SOLOUKI, Sabrina, Avery AUGUST a Weishan HUANG. Non-receptor tyrosine kinase signaling in autoimmunity and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019, **201**, 39-50. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2019.05.008
- [13] PUNDIR, Sangya, Maria MARTIN a Claire O'DONOVAN. UniProt Protein Knowledgebase In: WU, Cathy H., Cecilia N. ARIGHI a Karen E. ROSS, ed., Cathy WU, Cecilia ARIGHI,

Karen ROSS. *Protein Bioinformatics*. New York, NY: Springer New York, 2017, s. 41-55. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-6781-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6783-4_2

- [14] *Expasy: non-specific protein-tyrosine kinase..* Dostupné z: <https://enzyme.expasy.org/EC/2.7.10.2>
- [15] *Expasy: receptor protein-tyrosine kinase.* Dostupné z: <https://enzyme.expasy.org/EC/2.7.10>.
- [16] AIT-BOUZIAD, Nadine, Anass CHIKI, Galina LIMORENKO, Shifeng XIAO, David ELIEZER a Hilal LASHUEL. Phosphorylation of the overlooked tyrosine 310 regulates the structure, aggregation, and microtubule- and lipid-binding properties of Tau. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, **295**(23), 7905-7922. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA119.01251
- [17] DU, Zhenfang a Christine LOVLY. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*. 2018, **17**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s12943-018-0782-4
- [18] LURETTE, Olivier, Hala GUEDOUARI, Jordan MORRIS et al. Mitochondrial matrix-localized Src kinase regulates mitochondrial morphology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022, **79**(6). Dostupné z: doi:10.1007/s00018-022-04325-y
- [19] TRENKER, Raphael a Natalia JURA. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Current Opinion in Cell Biology*. 2020, **63**, 174-185. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2020.01.016
- [20] ROSKOSKI, Robert. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, **324**(4), 1155-1164. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.171
- [21] FAN, Gaofeng, Saadat ALEEM, Ming YANG, W. MILLER a Nicholas TONKS. Protein-tyrosine Phosphatase and Kinase Specificity in Regulation of SRC and Breast Tumor Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(26), 15934-15947. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.651703
- [22] ALWANIAN, Wanian, Katarina VLAJIC, Wenjun BIE, Andre KAJDACSY-BALLA a Angela TYNER. Protein tyrosine kinase 6 regulates activation of SRC kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2022, **298**(11). Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2022.102584
- [23] LI, Yaoyuan, Yanju BAO, Honggang ZHENG, Yinggang QIN a Baojin HUA. The nonreceptor protein tyrosine kinase Src participates in every step of cancer-induced bone pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, **141**. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111822
- [24] FILIPPAKOPOULOS, Panagis, Susanne MÜLLER a Stefan KNAPP. SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Current Opinion in Structural Biology*. 2009, **19**(6), 643-649. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2009.10.001
- [25] DENG, Yang, Nilda ALICEA-VELÁZQUEZ, Ludovic BANNWARTH, Soili LEHTONEN, Titus BOGGON, Heung-Chin CHENG, Vesa HYTÖNEN a Benjamin TURK. Global Analysis of Human Nonreceptor Tyrosine Kinase Specificity Using High-Density Peptide Microarrays. *Journal of Proteome Research*. 2014, **13**(10), 4339-4346. Dostupné z: doi:10.1021/pr500503q

- [26] STEFANIS, L. -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, **2**(2), 009399-009399. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a009399
- [27] ATIK, Anzari, Tessandra STEWART a Jing ZHANG. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathology*. 2016, **26**(3), 410-418. Dostupné z: doi:10.1111/bpa.12370
- [28] ZHANG, Jiaming, Xiaoping LI a Jia-Da LI. The Roles of Post-translational Modifications or α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Frontiers in Neuroscience*. 2019, **1** Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2019.00381
- [29] *Uniprot: P37840 · SYUA_HUMAN*. In: . [cit. 2023-01-31]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37840/entry>
- [30] KANG, Lijuan, Gina MORIARTY, Lucy WOODS, Alison ASHCROFT, Sheena RADFORI a Jean BAUM. N-terminal acetylation of α -synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer. *Protein Science*. 2012, **21**(7), 911-917. Dostupné z: doi:10.1002/pro.2088
- [31] WATSON, Matthew a Jennifer LEE. N-Terminal Acetylation Affects α -Synuclein Fibril Polymorphism. *Biochemistry*. 2019, **58**(35), 3630-3633. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.9b00629
- [32] BARTELS, Tim, Joanna CHOI a Dennis SELKOE. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011, **477**(7362), 107-110. Dostupné z: doi:10.1038/nature10324
- [33] YOO, Hajung, Jeongmin LEE, Bokwang KIM et al. Role of post-translational modifications on the alpha-synuclein aggregation-related pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Report* 2022, **55**(7), 323-335. Dostupné z: doi:10.5483/BMBRep.2022.55.7.073
- [34] LIMA, Vanderlei, Lucas DO NASCIMENTO, David ELIEZER a Cristian FOLLMER. Role of Parkinson's Disease-Linked Mutations and N-Terminal Acetylation on the Oligomerization of α -Synuclein Induced by 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018, **10**(1), 690-703. Dostupné z: doi:10.1021/acchemneuro.8b00498
- [35] SIGURDSON, Christina, Jason BARTZ a Markus GLATZEL. Cellular and Molecular Mechanisms of Prion Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2019, **14**(1), 497-516. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013109
- [36] BARTELS, Tim, Nora KIM, Eric LUTH, Dennis SELKOE a Annalisa PASTORE. N-Alpha Acetylation of α -Synuclein Increases Its Helical Folding Propensity, GM1 Binding Specificity and Resistance to Aggregation. *PLoS ONE*. 2014, **9**(7). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103727
- [37] BARTELS, Tim, Tim BARTELS, Joanna CHOI, Nora KIM a Dennis SELKOE. Non-denaturing purification of alpha-Synuclein from erythrocytes. *Protocol Exchange*. 2011. Dostupné z: doi:10.1038/protex.2011.254
- [38] LORENTZON, Emma, Ranjeet KUMAR, Istvan HORVATH a Pernilla WITTUNG-STAFSHEDE. Differential effects of Cu²⁺ and Fe³⁺ ions on in vitro amyloid formation of

- biologically-relevant α -synuclein variants. *BioMetals*. 2020, **33**(2-3), 97-106. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-020-00234-4
- [39] ZHAO, Kun, Yeh-Jun LIM, Zhenying LIU et al. Parkinson's disease-related phosphorylation at Tyr39 rearranges α -synuclein amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020, **117**(33), 20305-20315. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1922741117
- [40] DIKIY, Igor, Bruno FAUVET, Ana JOVIČIĆ et al. Semisynthetic and in Vitro Phosphorylation of Alpha-Synuclein at Y39 Promotes Functional Partly Helical Membrane-Bound States Resembling Those Induced by PD Mutations. *ACS Chemical Biology*. 2016, **11**(9), 2428-2437. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.6b00539
- [41] PALOMINO-HERNANDEZ, Oscar, Fiamma BURATTI, Pamela SACCO, Giulia ROSSETTI, Paolo CARLONI a Claudio FERNANDEZ. Role of Tyr-39 for the Structural Features of α -Synuclein and for the Interaction with a Strong Modulator of Its Amyloid Assembly. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(14). Dostupné z: doi:10.3390/ijms21145061
- [42] BARTONÍKOVÁ, Tereza, Kateřina MENŠÍKOVÁ, Vladimír JANOUT a Petr KAŇKOVSKÝ. Epidemiologie Parkinsonovy choroby. *Solen: Neurologie pro praxi*. 2020, **21**(5), 390-394. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/neu/2020/05/10.pdf>
- [43] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Patricia, Enrico ZAMPESE, Kristen STOUT et al. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*. 2021, **599**(7886), 650-656. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-04059-0
- [44] BLOEM, Bastiaan, Michael OKUN a Christine KLEIN. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2021, **397**(10291), 2284-2303. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)00218-X
- [45] PAN, Lina, Lanxia MENG, Mingyang HE a Zhentao ZHANG. Tau in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2021, **71**(11), 2179-2191. Dostupné z: doi:10.1007/s12031-020-01776-5
- [46] PALDINO, Emanuela, Vincenza D'ANGELO, Mariangela MASSARO CENERE et al. Neuropathology of the Basal Ganglia in SNCA Transgenic Rat Model of Parkinson's Disease: Involvement of Parvalbuminergic Interneurons and Glial-Derived Neurotrophic Factor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(17). Dostupné z: doi:10.3390/ijms231710126
- [47] MALONEY, Michael, Xiang WANG, Rajarshi GHOSH et al. LRRK2 Kinase Activity Regulates Parkinson's Disease-Relevant Lipids at the Lysosome. *BioRxiv: The preprint server for biology*. 2022, 79. Dostupné z: doi:10.1101/2022.12.19.521070
- [48] DOSTÁL, Václav. *Pozdní komplikace Parkinsonovy choroby*. 2013, **14**(1), 28-32. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/neu/2013/01/07.pdf>
- [49] Dementia with Lewy Bodies. In: *Alzheimer's association*. Chicago. Dostupné z: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-dementia/types-of-dementia/dementia-with-lewy-bodies>

- [50] MARTINSEN, Vebjørn a Petri KURSULA. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids*. 2022, **54**(1), 99-109. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-021-03111-7
- [51] *Uniprot: P02686 · MBP_HUMAN*. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02686/entry>
- [52] BARTOŠ, Aleš. Klinické využití protilátek u roztroušené sklerózy. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2008, **71104**(1), 26-33. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2008-1-1/klinicke-vyuziti-protilatek-u-roztrousene-sklerozy-37549>
- [53] KLINEOVA, Sylvia a Fred LUBLIN. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018, **8**(9). Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a028928
- [54] BARTOŠ, Aleš. *Antiaxonální protilátky u roztroušené sklerózy*. Praha, 2006. Doktorská dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [55] DOSHI, Anisha a Jeremy CHATAWAY. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clinical Medicine*. 2016, **16**(6), 53-59. Dostupné z: doi:10.7861/clinmedicine.16-6-s53
- [56] TRAVERS, Brett, Benjamin TSANG a Joshua BARTON. Multiple sclerosis: Diagnosis, disease-modifying therapy and prognosis. *Australian Journal of General Practice*. 2022, **51**(4), 199-206. Dostupné z: doi:10.31128/AJGP-07-21-6103
- [57] ZHANG, Huiqin, Wei WEI, Ming ZHAO, Lina MA, Xuefan JIANG, Hui PEI, Yu CAO a Hao LI. Interaction between A β and Tau in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Biological Sciences*. 2021, **17**(9), 2181-2192. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.57078
- [58] *Uniprot: P10636 · TAU_HUMAN*. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10636/entry>
- [59] HAMANO, Tadanori, Soichi ENOMOTO, Norimichi SHIRAFUJI, Masamichi IKAWA, Osamu YAMAMURA, Shu-Hui YEN a Yasunari NAKAMOTO. Autophagy and Tau Protei. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(14). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22147475
- [60] WEGMANN, Susanne, Jacek BIERNAT a Eckhard MANDELKOW. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 2021, **69**, 131-138. Dostupné z: doi:10.1016/j.conb.2021.03.003
- [61] TAPIA-ROJAS, Cheril, Fabian CABEZAS-OPAZO, Carol DEATON, Erick VERGARA, Gail JOHNSON a Rodrigo QUINTANILLA. It's all about tau. *Progress in Neurobiology*. 2019, **175**, 54-76. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2018.12.005
- [62] KAO, Der-Shyang, Yanyan DU, Andrew DEMARCO, Sehong MIN, Mark HALL, Jean-Christophe ROCHET a W. TAO. Identification of Novel Kinases of Tau Using Fluorescence Complementation Mass Spectrometry (FCMS). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2022, **21**(12). Dostupné z: doi:10.1016/j.mcpro.2022.100441

- [63] SALVADÓ, Gemma, Mahnaz SHEKARI, Carles FALCON et al. Brain alterations in the ear Alzheimer's continuum with amyloid- β , tau, glial and neurodegeneration CSF markers. *Brai Communications*. 2022, **4**(3). Dostupné z: doi:10.1093/braincomms/fcac134
- [64] RUSEK, Marta, Ryszard PLUTA, Marzena UŁAMEK-KOZIOŁ a Stanisław CZUCZWAR. Ketogenic Diet in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(16). Dostupné z: doi:10.3390/ijms20163892
- [65] EPREMYAN, Khoren, Tatyana GOLEVA a Renata ZVYAGILSKAYA. Effect of Tau Protein on Mitochondrial Functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2022, **87**(8), 689-701. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922080028
- [66] WEGMANN, Susanne, Bahareh EFTEKHARZADEH, Katharina TEPPER et al. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *The EMBO Journal*. 2018, **37**(7). Dostupné z: doi:10.15252/embj.201798049
- [67] JESIONOWSKI, Teofil, Jakub ZDARTA a Barbara KRAJEWSKA. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*. 2014, **20**(5-6), 801-821. Dostupné z: doi:10.1007/s10450-014-9623-y
- [68] HROMADKOVA, Lenka, Rudolf KUPCIK, Marie VAJRYCHOVA et al. Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *The Analyst*. 2018, **143**(2), 466-474. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN01508A
- [69] BEZERRA, Camilla, Celina DE FARIAS LEMOS, Marylane DE SOUSA a Luciana GONÇALVES. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, ar future trends. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, **132**(26). Dostupné z: doi:10.1002/app.42125
- [70] MOHAMAD, Nur, Nur MARZUKI, Nor BUANG, Fahrul HUYOP a Roswanira WAHAB. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015, **29**(2), 205-220. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2015.1008192
- [71] BARBOSA, Oveimar, Rodrigo TORRES, Claudia ORTIZ, Ángel BERENGUER-MURCIA, Rafael RODRIGUES a Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules*. 2013, **14**(8), 2433-2462. Dostupné z: doi:10.1021/bm400762h
- [72] DATTA, Sumitra, L. CHRISTENA a Yamuna RAJARAM. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013, **3**(1), 1-9. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- [73] LI, Yunfang, Jia XU, Yu CHEN, Zhinan MEI a Yuxiu XIAO. Screening of inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β from traditional Chinese medicines using enzyme-immobilized magnetic beads combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1425**, 8-16. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.10.062
- [74] MONZO, Alex, Edit SPERLING a Andrés GUTTMAN. Proteolytic enzyme-immobilization techniques for MS-based protein analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009, **28**(7) 854-864. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2009.03.002

- [75] SUN, Yung-Shin a Xiangdong ZHU. Characterization of Bovine Serum Albumin Blocking Efficiency on Epoxy-Functionalized Substrates for Microarray Applications. *SLAS Technology*. 2016, **21**(5), 625-631. Dostupné z: doi:10.1177/2211068215586977
- [76] FANG, Si-Meng, Hai-Na WANG, Zhong-Xi ZHAO a Wei-Hong WANG. Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2012, **2**(2), 83-89. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2011.12.002
- [77] HAGEDOORN, Peter-Leon a Jerome NRIAGU, ed., Eric SKAAR. *Trace Metals and Infectious Disease*. Kapitola 18. Cambridge: MIT Press, 2015. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK569677/>
- [78] ZHANG, Ying, Chunzhao ZHAO, Li LI, Chuan-Chih HSU, Jian-Kang ZHU, Anton ILIUK a W. TAO. High-Throughput Phosphorylation Screening and Validation through Ti(IV)-Nanopolymer Functionalized Reverse Phase Phosphoprotein Array. *Analytical Chemistry*. 2018, **90**(17), 10263-1027. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b01843
- [79] ILIUK, Anton a W. TAO. Universal Non-Antibody Detection of Protein Phosphorylation Using pIMAGO. *Current Protocols in Chemical Biology*. 2015, **7**(1), 17-25. Dostupné z: doi:10.1002/9780470559277.ch140208
- [80] ILIUK, Anton, Li LI, Michael MELESSE, Mark HALL a W. TAO. Multiplexed Imaging of Protein Phosphorylation on Membranes Based on Ti IV Functionalized Nanopolymers. *ChemBioChem*. 2016, **17**(10), 900-903. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201600068
- [81] ILIUK, Anton, X. LIU, Liang XUE, Xiaoqi LIU a W. TAO. Chemical Visualization of Phosphoproteomes on Membrane. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012, **11**(9), 629-639. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.O112.018010
- [82] CHRISTENSEN, Brian, Gitte SCHYTTTE, Carsten SCAVENIUS, Jan ENGHILD, Marc MCKEE a Esben SØRENSEN. FAM20C-Mediated Phosphorylation of MEPE and Its Acidic Serine- and Aspartate-Rich Motif. *JBM R Plus*. 2020, **4**(8). Dostupné z: doi:10.1002/jbm4.10378
- [83] *PIMAGO fosfoprotein detection kit for platelete*. Dostupné z: <https://www.tymora-analytical.com/wp-content/uploads/2016/05/pIMAGO-biotin-HRP-detection-on-microplate-100-wells-Technical-Document.pdf>
- [84] *PIMAGO fosfoprotein detection kit for Western Blot*. Dostupné z: <https://www.tymora-analytical.com/wp-content/uploads/2014/12/pIMAGO-biotin-HRP-detection-on-Western-Blot-40-blots-Technical-Document.pdf>
- [85] FOJTÍKOVÁ, Markéta. *Imobilizace Src kinázy na magnetický nosič pro fosforylaci proteinů*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice; Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.
- [86] MANES, Nathan a Aleksandra NITA-LAZAR. Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research. *Journal of Proteomics*. 2018, **189**, 75-90. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2018.02.008

- [87] KUPCIK, Rudolf, Jan MACAK, Helena REHULKOVA et al. Amorphous TiO₂ Nanotubes as a Platform for Highly Selective Phosphopeptide Enrichment. *ACS Omega*. 2019, **4**(7), 12156-12166. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b00571
- [88] PINO, Lindsay, Jacob ROSE, Amy O'BROIN, Samah SHAH a Birgit SCHILLING. Emergent mass spectrometry-based proteomics methodologies for novel biomedical applications. *Biochemical Society Transactions*. 2020, **48**(5), 1953-1966. Dostupné z: doi:10.1042/BST20191091
- [89] LEWIS, Patrick A. Assaying the Kinase Activity of LRRK2 *in vitro*. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (59). Dostupné z: doi:10.3791/3495
- [90] BEHRENDT, Raymond, Peter WHITE a John OFFER. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*. 2016, **22**(1), 4-27. Dostupné z: doi:10.1002/psc.2836
- [91] GRUNHAUS, Dana, Estefanía MOLINA, Roni COHEN, Tamar STEIN, Assaf FRIEDLER a Mattan HUREVICH. Accelerated Multiphosphorylated Peptide Synthesis. *Organic Process Research & Development*. 2022, **26**(8), 2492-2497. Dostupné z: doi:10.1021/acs.oprd.2c00164
- [92] SRBOVÁ, Jana, Marcela SLOVÁKOVÁ, Zuzana KŘÍPALOVÁ, Monika ŽÁRSKÁ, Martin ŠPAČKOVÁ, Denisa STRÁNSKÁ a Zuzana BÍLKOVÁ. Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymer*. 2016, **104**, 38-44. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009
- [93] ŠŤOVÍČKOVÁ, Eliška. *Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními a imobilizovanými kinázami*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice; Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
- [94] SANTIAGO-CARDONA, Pedro, Jaileene PÉREZ-MORALES a Jonathan GONZÁLEZ-FLORES. Detection of Retinoblastoma Protein Phosphorylation by Immunoblot Analysis. In SANTIAGO-CARDONA, Pedro G., ed., Pedro SANTIAGO-CARDONA. *The Retinoblastoma Protein*. New York, NY: Springer New York, 2018, s. 49-64. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-7564-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7565-5_6
- [95] Promega: Sequencing Grade Modified Trypsin. In: *Promega*. 2023. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/products/mass-spectrometry/trypsin/sequencing-grade-modified-trypsin/?catNum=V5111>
- [96] *Uniprot: P02687 · MBP_BOVIN*. Dostupné z: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02687/entry#ptm_processing
- [97] *Uniprot: P12931 · SRC_HUMAN*. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12931/entry>
https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12931/entry#ptm_processing
- [98] *Uniprot: P31995 · FCG2C_HUMAN*. Dostupné z: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P31995/entry#ptm_processing

- [99] *Uniprot: P02769 · ALBU_BOVIN*. Dostupné z: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry#ptm_processing
- [100] *Uniprot: P05814 · CASB_HUMAN*. Dostupné z: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05814/entry#ptm_processing
- [101] BRENDA: Enzyme database. In: *Brenda*. Dostupné z: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.21.4>
- [102] KIM, a LEE. Immobilization of Trypsin from Porcine Pancreas onto Chitosan Nonwoven by Covalent Bonding. *Polymers*. 2019, **11**(9). Dostupné z: doi:10.3390/polym11091462
- [103] NA, Chan, Gajanan SATHE, Liana ROSENTHAL, Abhay MOGHEKAR, Valina DAWSON Ted DAWSON a Akhilesh PANDEY. Development of a novel method for the quantification of tyrosine 39 phosphorylated α - and β -synuclein in human cerebrospinal fluid. *Clinical Proteomics*. 2020, **17**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s12014-020-09277-8
- [104] KIM, Mira, Dong-Sik SHIN, Jaehi KIM a Yoon-Sik LEE. Substrate screening of protein kinases: Detection methods and combinatorial peptide libraries. *Biopolymers*. 2010, **94**(6), 753-762. Dostupné z: doi:10.1002/bip.21506