

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemické stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované
proteinkinázy A
Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical-technology

Electrochemical determination of kinetic parameters of soluble and immobilized
protein kinase A

Master thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristina Malíková**
Osobní číslo: **C22374**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Elektrochemické stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A**
Téma práce anglicky: **Electrochemical Determination of Kinetic Parameters of Soluble and Immobilized Protein Kinase A**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Proteinkináza A – struktura, funkce, katalytická aktivita
2. Metody imobilizace enzymů na magnetické částice se zaměřením na proteinkinázy – orientovaná a neorientovaná vazba
3. Příklady aplikací imobilizované proteinkinázy A
4. Stanovení aktivity imobilizované proteinkinázy A a stanovení kinetických parametrů katalyzované reakce pomocí elektroanalytických metod

Experimentální část:

1. Seznámení se s detekcí elektroaktivních nanočástic koloidního zlata metodou square-wave voltametrie s využitím tištěných tříelektrodových senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou (SPCE) a borem dopovanou diamantovou elektrodou (SPBDDE).
2. Optimalizace podmínek elektrochemické detekce zlatých nanočástic s využitím SPBDDE
3. Imobilizace proteinkinázy A (PKA) na magnetické částice, stanovení aktivity PKA s peptidovým substrátem biotin-Kemptide v přítomnosti adenosin thiotrifosfátu (ATP-S).
4. Stanovení kinetických parametrů imobilizované PKA

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

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázích *Web of Science, NCBI, PubMed, Google Scholar*, atd. Další dle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

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

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

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

LS.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Elektrochemické stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A 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 10. 5. 2024

Bc. Kristina Malíková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych moc poděkovala své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za její odborné vedení práce, trpělivost, ochotu, podporu a vstřícný přístup při zpracování diplomové práce, a také při práci na experimentální části v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Ondřeji Morávkovi za ochotu a pomoc. Poděkování patří také mým nejbližším, kteří mě podporovali po celou dobu mého magisterského studia.

ANOTACE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo popsat proteinkinázu A, metody imobilizace enzymů a elektroanalytické metody stanovení aktivity proteinkinázy A. V praktické části jsem se zabývala imobilizací proteinkinázy A na vybrané magnetické částice. Dále byla práce zaměřena na elektrochemické stanovení její enzymové aktivity pomocí nízkomolekulárního substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti adenosin thiotrifosfátu (ATP-S) a porovnání se solubilní formou enzymu. Dále stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A. Metoda stanovení je založena na detekci zlatých nanočástic square-wave voltametrií.

KLÍČOVÁ SLOVA

proteinkináza A, enzymová aktivita, imobilizace, magnetické částice, kinetické parametry enzymové reakce

TITLE

Electrochemical Determination of Kinetic Parameters of Soluble and Immobilized Protein Kinase A

ANNOTATION

The aim of the theoretical part of the master thesis was to describe protein kinase A, methods of enzyme immobilization and electroanalytical methods for determination of protein kinase A activity. In the practical part I focused on the immobilization of protein kinase A on selected magnetic particles. Furthermore, the work focused on the electrochemical determination of its enzyme activity using the low molecular weight substrate Biotin-Kemptide in the presence of adenosine thiotriphosphate (ATP-S) and comparison with the soluble form of the enzyme. In addition, determination of kinetic parameters of solubilized and immobilized protein kinase A. The method of determination is based on the detection of gold nanoparticles by square-wave voltammetry.

KEYWORDS

protein kinase A, enzyme activity, immobilization, magnetic particles, kinetic parameters of enzymatic reaction

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	15
2 TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1. Proteinkinázy a jejich funkce.....	16
2.1.1. Proteinkináza A.....	18
2.2. Metody imobilizace enzymů.....	21
2.2.1. Fyzikální adsorpce	22
2.2.2. Enkapsulace	22
2.2.3. Zesíťování	23
2.2.4. Kovalentní vazba	23
2.2.5. Imobilizace na magnetické částice	24
2.2.6. Orientovaná a neorientovaná vazba	25
2.3. Konkrétní příklady imobilizace proteinkinázy A	25
2.4. Metody stanovení aktivity proteinkináz a fosforylace proteinů	27
2.4.1. Elektrochemická stanovení ve spojení s nanomateriály	27
2.4.2. Nanomateriály působící jako elektroanalytická sonda	28
2.4.3. Nanomateriály působící na zesílení signálu.....	31
2.4.4. Elektrochemiluminiscenční senzory pro stanovení aktivity proteinkináz	33
2.4.5. Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce	34
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1. Přístroje a pomůcky	37
3.2. Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice.....	39
3.3. Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A	39
3.3.1. Fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A	40
3.3.2. Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetických částicích	40
3.4. Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu	41

3.4.1.	Podmínky elektrochemické detekce	41
3.4.2.	Elektrochemická detekce zlatých nanočástic na tištěných elektrodách	42
3.4.3.	Izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem	43
3.5.	Detekce fosforylovaného substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	44
3.5.1.	Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných POROS OLIGO™ R3 reverzní fází	45
3.5.2.	Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií.....	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1.	Elektrochemická detekce zlatých nanočástic na vybraných tištěných tříelektrodových senzorech	48
4.2.	Optimalizace podmínek elektrochemické detekce zlatých nanočástic	51
4.3.	Ověření fosforylace substrátu solubilní a imobilizovanou kinázou.....	58
4.3.1.	Ověření fosforylace substrátu solubilní kinázou pomocí MALDI/MS	59
4.3.2.	Imobilizace Proteinkinázy A	62
4.3.3.	Ověření fosforylace substrátu imobilizovanou kinázou pomocí MALDI/MS	62
4.4.	Stanovení aktivity Proteinkinázy A elektrochemicky	66
4.4.1.	Kalibrace solubilní proteinkinázy A elektrochemickou detekcí.....	66
4.5.	Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce – solubilní a imobilizovaná kinázy	67
5	ZÁVĚR	69
	POUŽITÁ LITERATURA	70

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Funkce proteinkináz.	16
Obrázek 2: Onemocnění spojená s dysregulací proteinkináz a potenciální inhibitory proteinkináz pro terapii.	17
Obrázek 3: Terciární struktura proteinkinázy A.	19
Obrázek 4: Reakční mechanismus proteinkinázy A.	20
Obrázek 5: Různé metody používané pro imobilizaci enzymů.	22
Obrázek 6: Separace magnetických částic.	24
Obrázek 7: Orientovaná vazba enzymu lipázy.	25
Obrázek 8: Aktivní fúzní protein PKA-HaloTag.	26
Obrázek 9: Elektrochemické stanovení fosforylovaného proteinu na bázi nanomateriálů.	28
Obrázek 10: Schématické znázornění principu pro detekci fosforylace proteinů na bázi zlatých nanočástic.	29
Obrázek 11: Uspořádání elektrochemického senzoru s využitím nanočástic stříbra pro stanovení aktivity a inhibice proteinkinázy A.	30
Obrázek 12: Uspořádání elektrochemického senzoru pro detekci aktivity PKA s využitím CdS kvantových teček.	31
Obrázek 13: Schéma elektrochemické detekce aktivity proteinkinázy A zesílením signálu pomocí AuNPs.	32
Obrázek 14: Schématické znázornění elektrochemické detekce aktivity PKA založené na strategii zesílení signálu pomocí DNA enzymu řízeného Zr^{4+}	33
Obrázek 15: Graf závislosti	35
Obrázek 16: Rovnice Michaelis-Mentenové.	36
Obrázek 17: Graf linearizace podle Lineweaver-Burka.	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Podmínky elektrochemického přečištění elektrody a podmínky měření cyklickou voltametrií na DRP-C110 a SP-BDDE elektrodách	41
Tabulka 2: Podmínky elektrochemického přečištění elektrody a podmínky měření Square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na DRP-C110 elektrodách	42
Tabulka 3: Podmínky elektrochemického přečištění elektrody a podmínky měření Square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na SP-BDDE elektrodách.	42
Tabulka 4: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na DRP-C110 elektrodách cyklická voltametrie	52
Tabulka 5: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na SP-BDDE elektrodách cyklická voltametrie	53
Tabulka 6: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na DRP-C110 elektrodách SWCSV	56
Tabulka 7: Porovnání míry fosforylace 5 různých reakčních směsí se solubilní PKA	61
Tabulka 8: Porovnání míry fosforylace různých reakčních směsí s imobilizovanou PKA	65

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (10 a 20 μ l) na tištěných tříelektrokových senzorech DRP-C110.....	49
Graf 2: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (10 μ l) na tištěných tříelektrokových senzorech DRP-110STR.....	50
Graf 3: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (20 μ l) na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	51
Graf 4: Cyklický voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrokových senzorech DRP-C110.....	52
Graf 5: Cyklický voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	53
Graf 6: Optimalizace depozičního potenciálu pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	54
Graf 7: Optimalizace frekvence pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	55
Graf 8: Optimalizace depozičního času pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	55
Graf 9: Square-wave voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrokových senzorech DRP-C110.....	56
Graf 10: Square-wave voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	57
Graf 11: Square-wave voltamogram za optimalizovaných podmínek na tištěných tříelektrokových senzorech DRP-C110.....	57
Graf 12: Square-wave voltamogram za optimalizovaných podmínek na tištěných tříelektrokových senzorech SP-BDDE.....	58
Graf 13: Hmotnostní spektrum fosforylace substrátu solubilní PKA v čase MALDI/MS.....	60
Graf 14: Porovnání míry fosforylace 5 různých reakčních směsí s různým množstvím solubilní PKA, Biotin-Kemptide a ATP-S MALDI/MS.....	61
Graf 15: Hmotnostní spektrum fosforylace substrátu Biotin-Kemptide imobilizovanou PKA s ATP-S v čase MALDI/MS.....	63
Graf 16: Porovnání míry fosforylace substrátu Biotin-Kemptide imobilizovanou PKA s ATP-S v čase MALDI/MS.....	64
Graf 17: Porovnání míry fosforylace různých reakčních směsí substrátu Biotin-Kemptide s ATP-S a imobilizovanou PKA MALDI/MS.....	65
Graf 18: Kalibrace solubilní proteinkinázy A měřená elektrochemicky square-wave voltametrií.....	67
Graf 19: Kinetické parametry solubilní proteinkinázy A měřené elektrochemicky square-wave voltametrií.....	68
Graf 20: Kinetické parametry imobilizované proteinkinázy A měřené elektrochemicky square-wave voltametrií.....	68

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADP	adenosindifosfát
AGC	proteinkinázy A, G a C
AgNPs	nanočástice stříbra
ALK	kináza anaplastického lymfomu
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
ATP-S	adenosin 5'-[γ -thio]trifosfát tetralithná sůl
AuNPs	zlaté nanočástice (Au nanoparticles)
BTK	Brutonova tyrosinkináza
CaMK	proteinkinázy závislé na kalmodulinu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDK	cyklin-dependentní kinázy
CLK	Cdc2-like kinázy
CML	chronická myeloidní leukémie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
ECL	elektrochemiluminiscence
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FITC	fluorescein isothiokyanát
g-C ₃ N ₄	nitrid uhlíku
GSK	glykogen syntázy kinázy
GTP	guanosintrifosfát
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
JAK	inhibitory Janusových kináz
Lys	lysin
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MB-hpDNA	vlásečková DNA značená methylenovou modří
MPA	kyselina 3-merkaptopropionová
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non-small-cell lung cancer)
PEG	polyethylenglykol
PKA	proteinkináza A
QD	kvantové tečky
RGC	receptorová guanylátcykláza
SPR	povrchová plasmonová resonance
STE-MAPKs	sterilní mitogenem aktivované proteinkinázy
SWV	square-wave voltametrie
SyK	tyrosinová proteinkináza (u člověka kódována genem SyK)
TK	tyrosinkinázy
TKL	skupina podobná tyrosinkinázám
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
WD	walker DNA

ÚVOD

Proteinkinázy patří mezi jednu z největších rodin proteinů. Proteinkináza A (cyklický AMP – dependentní proteinkináza neboli PKA) patří do skupiny intracelulárních serin/threoninových kináz, které katalyzují fosforylaci na hydroxylové skupině aminokyselin serinu nebo threoninu. Proteinkináza A je ubikvitárně exprimována v savčích buňkách a podílí se na řadě významných buněčných signálních procesů.

Pro zachování aktivity a substrátové specifity proteinkinázy A je výhodné ji imobilizovat. Imobilizované enzymy nabízejí jedinečné výhody jako je lepší stabilita, opětovné použití a snadné oddělení enzymů z reakční směsi, což umožňuje kontrolu průběhu reakce. Imobilizace enzymů se široce využívá k modifikaci a zlepšení vlastností enzymů, jako je specifita, aktivita a kinetické parametry.

Patologické změny fosforylace proteinů a proteinkinázové aktivity jsou úzce spojeny s mnoha lidskými chorobami. Stanovení proteinkinázové aktivity a její inhibice má proto zásadní význam pro základní biochemický výzkum a objevování léčiv cílených na proteinkinázy. Stanovení proteinkinázové aktivity kombinací nanomateriálů a elektrochemické detekce představuje slibnou kombinaci pro vývoj vysoce citlivých a praktických biosenzorů. Elektrochemické biosenzory mají vysokou citlivost, rychlou odezvu na signál, široký lineární rozsah a nízké náklady na analýzu. Proto mohou být používány při studiu fosforylace a detekci aktivity kináz, čímž položily důležitý základ pro výzkum chorob a léčiv souvisejících s kinázami.

Pro stanovení aktivity a charakterizaci imobilizovaného enzymu proteinkinázy A z pohledu kinetických parametrů Michaelisovy konstanty (K_M) a mezní rychlosti (v_{max}) je třeba využít metodu, která umožňuje kvantifikaci produktu. Pro tyto účely není vhodné využití hmotnostní spektrometrie, která je konfirmační metodou potvrzující úroveň fosforylace. Informace dostupné v literatuře naznačují možnost využití elektrochemické detekce pro tyto účely. Pro elektrochemickou detekci lze využít biotinylovaný substrát, který po fosforylaci může být z reakční směsi oddělen pomocí specifické interakce se streptavidinem. Jako donor fosfátové skupiny lze použít ATP-S (adenosin 5'-[γ -thio]trifosfát tetralithná sůl). Detekční zlaté nanočástice spontánně reagují s thiolovou skupinou fosfátové skupiny přenesené na substrát z ATP-S. Navázané AuNPs lze následně elektrochemicky detekovat pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV). Detekce zlatých nanočástic je založena na monitorování signálu tetrachlorzlatitých iontů, které vzniknou působením kyseliny chlorovodíkové (0,1 M HCl).

1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

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

- proteinkináze A (PKA) se zaměřením na její strukturu, funkci, a katalytickou aktivitu
- metodách imobilizace enzymů a imobilizaci enzymů na magnetické částice
- konkrétních příkladech aplikací imobilizované proteinkinázy A
- elektroanalytických metodách stanovení aktivity proteinkinázy A a stanovení kinetických parametrů katalyzované reakce

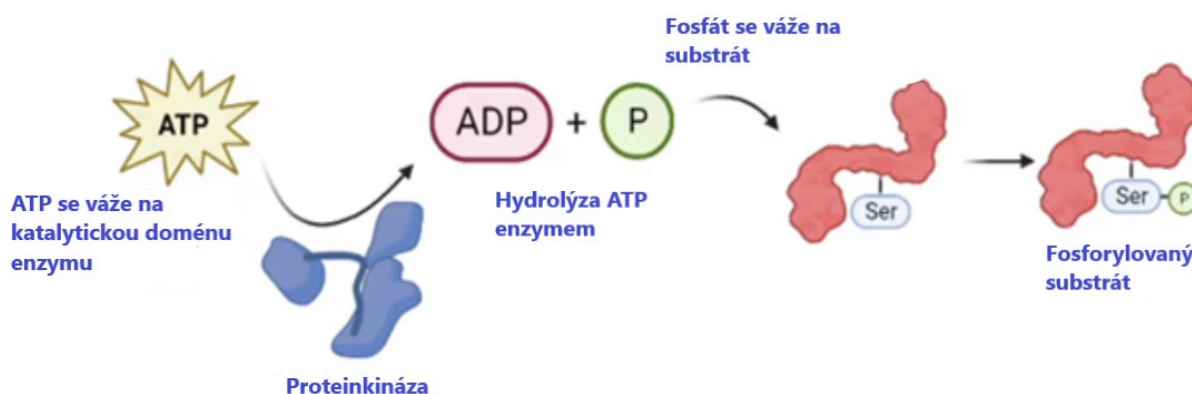
Cílem experimentální části diplomové práce bylo:

- detekce elektroaktivních zlatých nanočástic metodou square-wave voltametrie s využitím tištěných tříelektrodoých senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou (SPCE) a borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (SPBDDE)
- optimalizace podmínek elektrochemické detekce zlatých nanočástic s využitím SPBDDE
- imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice
- elektrochemické stanovení aktivity proteinkinázy A s využitím peptidového substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti adenosin thiotrifosfátu (ATP-S)
- ověření účinnosti fosforylace proteinkinázou A metodou hmotnostní spektrometrie
- stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Proteinkinázy a jejich funkce

Proteinkinázy patří mezi jednu z největších rodin proteinů. Jsou rozdělovány do různých skupin podle substrátu, struktury nebo funkce (Liu *et al.*, 2023). Proteinkinázy jsou enzymy, které katalyzují fosforylaci buněčných proteinových substrátů (Xerxa *et al.*, 2024). Patří mezi důležité signální posly v metabolických procesech (Liu *et al.*, 2023).



Obrázek 1: Funkce proteinkináz. Převzato a upraveno dle (Suresh *et al.*, 2022)

Proteinkinázy přenášejí fosfátovou skupinu, kterou poskytuje adenosintrifosfát (ATP) nebo guanosintrifosfát (GTP), na své substráty, čímž způsobují jejich fosforylaci (viz Obrázek 1). Fosforylace proteinů je jeden z nejdůležitějších procesů regulace patofyziologických procesů v organismu. Proteinkinázy, zajišťující fosforylaci, působí v koordinaci s fosfatázami, zajišťujícími defosforylaci (Liu *et al.*, 2023). Tyto enzymy regulují míru fosforylace a aktivity svých cílových proteinů (Sojka *et al.*, 2023). Cílové proteiny se převážně podílejí na přenosu signálu, kdy kaskáda fosforylací a defosforylací proteinů zesiluje a šíří extracelulární signály (Li *et al.*, 2023, Zhang *et al.*, 2023, Gul *et al.*, 2024).

Fosforylací proteinů dochází k regulaci apoptózy (Takarada *et al.*, 2024), průběhu buněčného cyklu (Zhao *et al.*, 2024), přestavby cytoskeletu, diferenciaci a vývoje buněk (Sojka *et al.*, 2023), imunitní odpovědi (Roskoski *et al.*, 2023), funkce nervového systému (Gajeswski-Kurdziel *et al.*, 2024) a transkripce (Roskoski *et al.*, 2014). Fosforylace proteinů je jedna z nejběžnějších posttranslačních modifikací proteinů, která způsobuje změnu jejich funkce v buněčných procesech (Pang *et al.*, 2022).

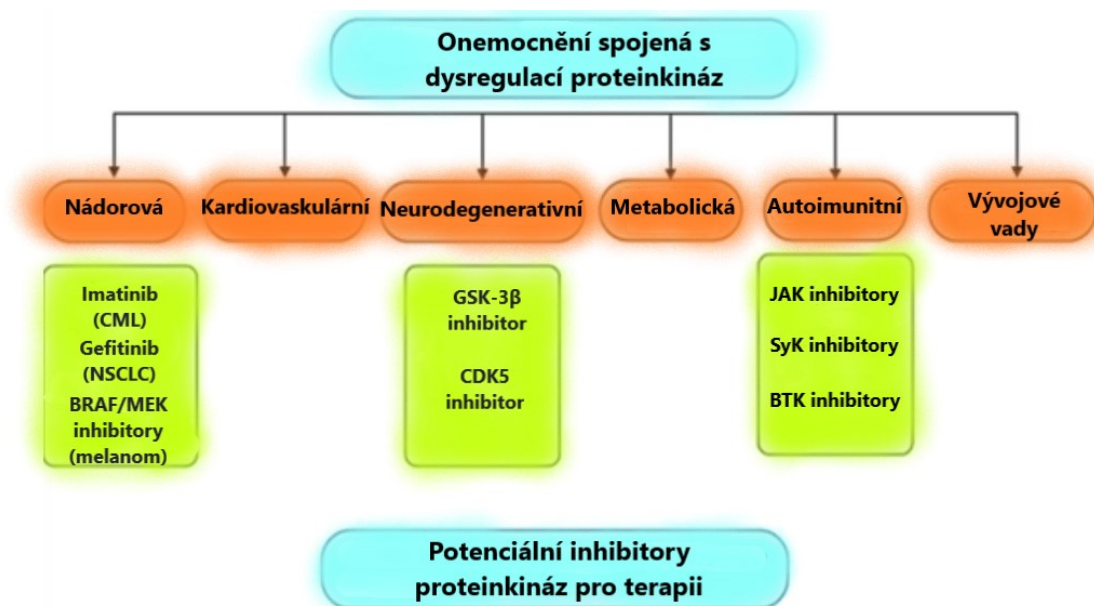
Fosforylace se podílí i na patologických reakcích (viz Obrázek 2) spojených s řadou onemocnění (např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba) (Sato *et al.*, 2023). Nadměrná exprese nebo mutace některých proteinkináz může vést až k rozvoji rakoviny.

Některé proteinkinázy představují cíle pro chemoterapii v léčbě rakoviny. Mezi tyto cíle patří například serin/threoninová Raf proteinkináza, tyrosinová proteinkináza receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) nebo tyrosinová proteinkináza anaplastického lymfomu (ALK) (Roskoski *et al.*, 2014).

U chronické myeloidní leukémie vede reciproká translokace mezi chromozomy 9 a 22 (známá jako Filadelfský chromozom) k chimérickému vytvoření části genu Bcr a genu Abl. Produktem této translokace je tyrosinová proteinkináza p210bcr/abl se zvýšenou aktivitou, vedoucí k proliferaci, diferenciaci, přežívání a odolnosti buněk vůči apoptóze (Roy *et al.*, 2015). Léčivý přípravek Imatinib, analog ATP, je kompetitivní inhibitor proteinkinázy Bcr – Abl, který se používá k léčbě chronické myeloidní leukémie (Stagno *et al.*, 2008).

Proteinkinázy se staly potenciálním cílem pro budoucí léčbu např. Alzheimerovy choroby. V současnosti je nastíněn vývoj různých inhibitorů proteinových kináz jako možných léčiv neurodegenerativních i nádorových chorob. Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které se vyznačuje poruchami paměti, mentální retardací, poruchami motorické rovnováhy a nesoběstačností (Li *et al.*, 2023).

Mezi komplexními a různorodými patologickými změnami u Alzheimerovy choroby se proteinkinázy podílejí na abnormální fosforylaci Tau proteinů za vzniku intracelulárních spleť neuronálních vláken, ztrátě neuronů, extracelulárních depozitech β -amyloidu za vzniku amyloidních plaků a poruchách synaptických funkcí (Li *et al.*, 2023).



Obrázek 2: Onemocnění spojená s dysregulací proteinkináz a potenciální inhibitory proteinkináz pro terapii. Převzato a upraveno dle (Suresh *et al.*, 2022).

U člověka bylo identifikováno 518 typů proteinkináz, které lze na základě fosforylovaných aminokyselinových zbytků substrátu rozdělit na tyrosinové, serin/threoninové, histidinové, tryptofanové, protein-aspartyl a protein-glutamyl kinázy (Goel *et al.*, 2013). Nejvíce studovanými proteinkinázami jsou tyrosinkinázy a serin/threoninové kinázy (Liu *et al.*, 2023).

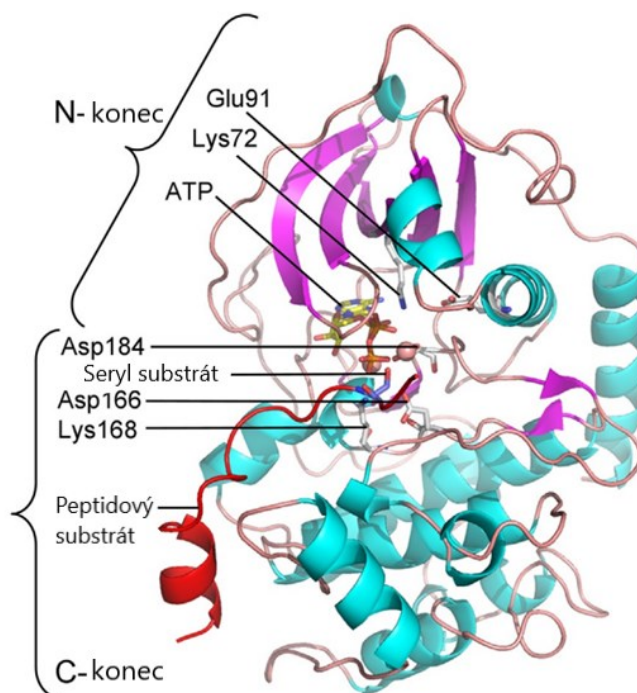
Lidské proteinkinázy lze dále také rozdělit na základě jejich struktury a funkce do rodin, podrodin a skupin. Hlavní skupiny jsou proteinkinázy A, G a C (AGC) a receptorová guanylátcykláza (RGC), skupina proteinkináz závislých na kalmodulinu (CaMK), cyklin-dependentní kinázy (CDK), mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), Glykogen syntázy kinázy (GSK) a Cdc2-like kinázy (CLK), skupina sterilních (STE)-MAPKs, skupina tyrosinkináz (TK), skupina podobná tyrosinkinázám (TKL), atypická skupina a další skupiny (Pang *et al.*, 2022).

2.1.1. Proteinkináza A

Proteinkináza A (cyklický AMP – dependentní proteinkináza neboli PKA) patří do skupiny intracelulárních serin/threoninových kináz, které katalyzují fosforylaci na hydroxylové skupině aminokyselin serinu nebo threoninu. Aktivita enzymu je regulována hladinou cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňkách. Proteinkináza A je ubikvitárně exprimována v savcích buňkách a podílí se na řadě významných buněčných signálních procesů (Chakraborty *et al.*, 2023).

Tento tetramerní enzym se skládá ze dvou regulačních a dvou katalytických podjednotek (Chakraborty *et al.*, 2023). Katalytické jádro se skládá z přibližně 300 aminokyselinových zbytků (Hereng *et al.*, 2012).

Jádro proteinkinázy A se skládá ze dvou laloků: malého N – koncového laloku, který váže ATP, a velkého C – koncového laloku, který váže proteinový substrát (viz Obrázek 3). N – koncový lalok se skládá převážně z β – skládaných listů a smyček. C – koncový lalok je tvořen zejména α – helixy a smyčkami. Dusíkatá báze ATP (adenin) se váže do hydrofobní kapsy pomocí vodíkových vazeb a Van der Waalsových sil spolu s glycinovými zbytky a amidovými skupinami vnitřní struktury enzymu (Roskoski *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Terciární struktura proteinkinázy A. Světle modře jsou zbarveny α – helixy, β – skládané listy fialově, smyčky hnědě a peptidový substrát červeně. Převzato a upraveno dle (Roskoski *et al.*, 2014).

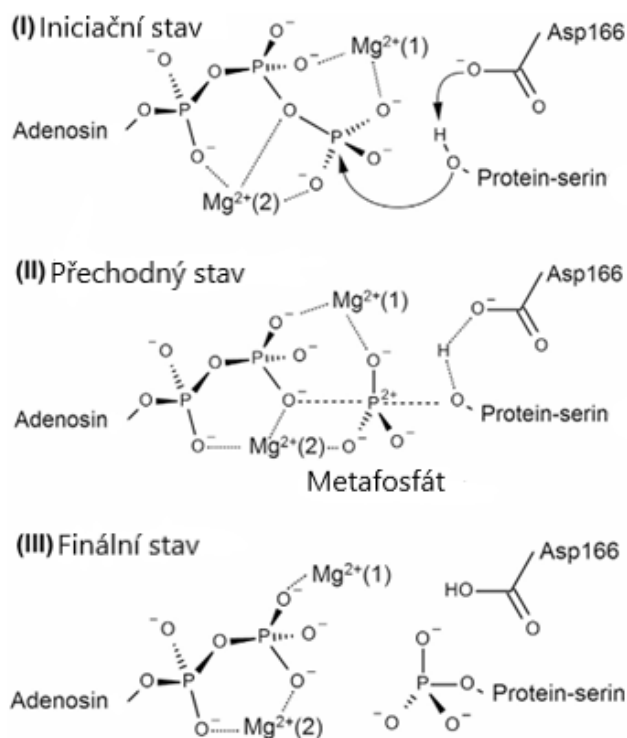
Substrátovou specifitu proteinkinázy A zajišťuje několik glutamylových zbytků v C – koncovém laloku (Roskoski *et al.*, 2014). Část proteinového substrátu, která obsahuje serin/threonin, se váže na mělkou drážku ve velkém C – koncovém laloku jádra proteinkinázy (Hereng *et al.*, 2012).

Enzym zůstává v neaktivním tetramerním stavu, dokud není aktivován v reakci na zvýšenou buněčnou hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), což vede k uvolnění aktivních katalytických podjednotek z holoenzymu (Pieles *et al.*, 2022).

Enzymatická aktivita proteinkinázy A je aktivována signální dráhou, která je regulována pomocí cAMP. Signální cAMP – dependentní dráha proteinkinázy A je iniciována katecholaminy (noradrenalinem i adrenalinem), které stimulují β -adrenergní receptory. β -adrenergní receptor aktivuje enzym adenylátcyklázu pomocí stimulační podjednotky G proteinu, a tím se indukuje syntéza cAMP z ATP. Druhý posel cAMP se váže na obě regulační podjednotky proteinkinázy A, což vede k uvolnění katalytických podjednotek proteinkinázy A. Následně může kináza katalyzovat fosforylaci substrátu (Chakraborty *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022).

Mechanismus funkce aktivované proteinkinázy A začíná navázáním ATP a proteinového substrátu. Po navázání na proteinkinázu A dochází k přilnutí hydroxyskupiny serinu

proteinového/peptidového substrátu ke g-fosfátu ATP. Asp166, invariantní zbytek všech proteinkináz, působí jako obecná báze a odstraňuje proton z hydroxyskupiny serinu zbytku. Lys168 neutralizuje záporný náboj g-fosfátu. Kyslík na serinovém zbytku napadá terminální fosfátovou skupinu za vzniku metafosfátového meziprojektu (viz Obrázek 4). Je vytěsněn ADP a vzniká protein – serin fosfát. Protože fosfoserin vzniká na opačné straně fosfodiesterové vazby než b – fosfát, nazývá se tento proces tzv. in-line mechanismus. Produkty se uvolňují z aktivního místa (Roskoski *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Reakční mechanismus proteinkinázy A. Převzato a upraveno dle (Roskoski *et al.*, 2014).

Pro zachování aktivity a substrátové specifity proteinkinázy A by bylo výhodné ji imobilizovat. Imobilizace PKA by umožňovala cílenou fosforylaci bez rušivých vlivů kontaminace jinými proteinkinázami nebo autofosforylace kináz v citlivých testech. Funkční imobilizovaná katalytická podjednotka PKA by mohla být využita v biotechnologii, proteomice a buněčné biologii (Deane *et al.*, 2023).

2.2. Metody imobilizace enzymů

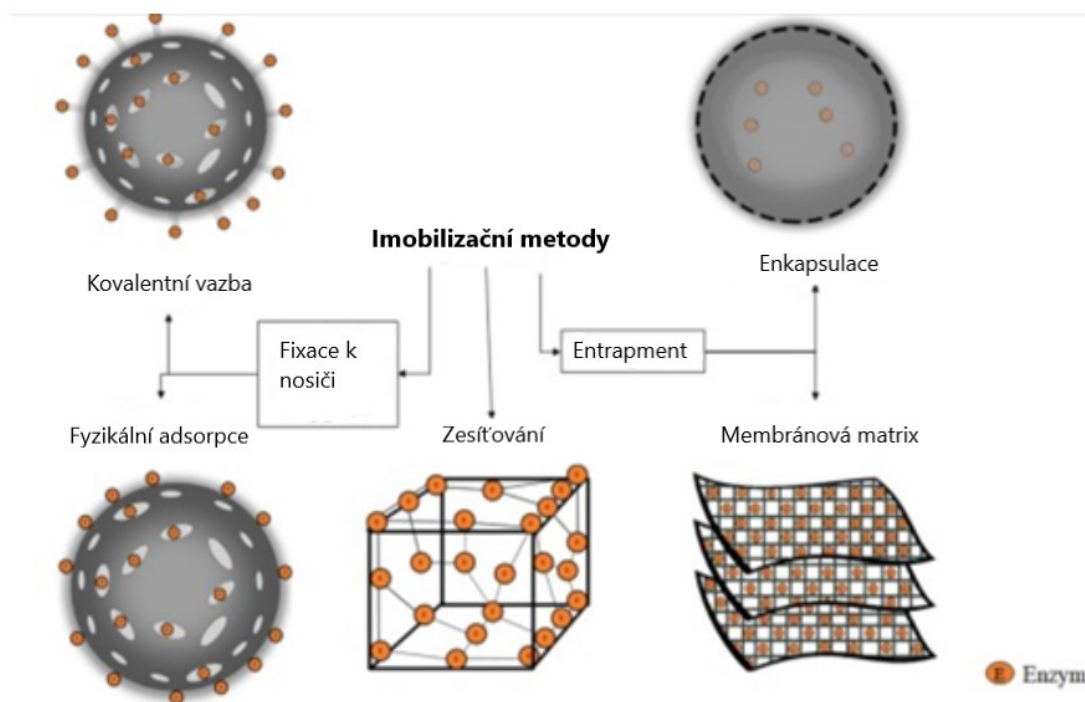
Imobilizované enzymy lze definovat jako enzymy, které byly fyzicky lokalizovány nebo omezeny v určité vymezené oblasti prostoru se zachováním jejich katalytické aktivity, které lze používat opakovaně a nepřetržitě (Tan *et al.*, 2010).

Technologie imobilizovaných enzymů je od svého vzniku v 60. letech 20. století široce využívána v různých oblastech enzymové katalýzy. Mezi různými materiály pro imobilizace jsou široce ceněny a vyvíjeny nanočástice, a to hlavně díky jejich vysokému specifickému povrchu a možnosti snadné modifikace povrchu (Zhu *et al.*, 2024).

Imobilizace enzymů byla zavedena jako technologie pro výrazné zvýšení odolnosti enzymů (Zhu *et al.*, 2024). Imobilizované enzymy nabízejí jedinečné výhody jako je lepší stabilita, opětovné použití a snadné oddělení enzymů z reakční směsi, což umožňuje kontrolu průběhu reakce (Wang *et al.*, 2024). Imobilizace enzymů se široce využívá k modifikaci a zlepšení vlastností enzymů, jako je specifita, aktivita a kinetické parametry. V biotechnologických procesech zjednodušuje použití imobilizovaných enzymů místo solubilních jejich oddělení od finálního produktu reakce (Remonatto *et al.*, 2022).

Imobilizovaný enzym se skládá ze dvou základních složek: nekatalytická matrice, která má usnadnit separaci a zvýšit stabilitu katalyzátoru, a funkční složky, tedy enzymu. Konečné chování jakýchkoli imobilizovaných enzymových systémů je ovlivněno nejen vazbou molekul a ustálením konformace enzymu, ale také jeho aktivitou a selektivitou (Gao *et al.*, 2012).

Imobilizační metody se neomezují pouze na vazbu enzymů na pevné a sférické částice, ať už porézní nebo neporézní. Alternativní strategie jsou založené na polyakrylamidových a křemíkových sol – gelových sítích, membránách z bavlněných vláken, a dokonce i na imobilizaci bez nosičů. Imobilizační techniky lze rozdělit do tří kategorií (viz Obrázek 5): fixace k nosiči (fyzikální adsorpce a kovalentní vazba), zachycení inkluzí nebo do membránové sítě (enkapsulace) a provázání enzymů bez nosiče (zesítování) (Remonatto *et al.*, 2022).



Obrázek 5: Různé metody používané pro imobilizaci enzymů. Převzato a upraveno dle (Remonatto *et al.*, 2022).

2.2.1. Fyzikální adsorpce

Adsorpce je jedna z nejstarších, nejjednodušších a široce používaných imobilizačních technik. Při technice fyzikální adsorpce je enzym imobilizován na nosiče prostřednictvím slabých vazeb, jako jsou van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Kvůli těmto vazbám patří mezi významné nevýhody této metody desorpce enzymu v průběhu reakce vlivem různých parametrů (např. koncentrace činidel a produktů). Tuto nevýhodu lze do určité míry omezit použitím hydrofobních nosičů, aby se dosáhlo výraznějších hydrofobních interakcí (Abdulmalek *et al.*, 2022).

Dále se také může jednat o afinitní adsorpci prostřednictvím ligandu interagujícího s enzymem, jako je například koordinační interakce mezi molekulami proteinů a kovově-organickými sítěmi (Xu *et al.*, 2021).

2.2.2. Enkapsulace

Enkapsulace je technika přitahující značnou pozornost díky svým výhodám, mezi které patří nízká cena, rychlost, jednoduchost metody imobilizace a potřeba mírných podmínek (Abdulmalek *et al.*, 2022). Enzymová enkapsulace zahrnuje uzavření enzymů do matrice (potahovaného/podpůrného materiálu), aby se minimalizovaly strukturní změny a zabránilo

se degradaci enzymů (Weng *et al.*, 2023). Enzymy jsou uzavřeny v polymerní matici (jako jsou vlákna nebo gely) nebo v mikrokapslích, které umožňují průtok substrátu a produktů kolem uzavřených enzymů (Abdulmalek *et al.*, 2022).

Enkapsulované enzymy jsou za různých podmínek stabilnější než nativní formy. Enkapsulace může zvýšit enzymovou aktivitu změnou hydrofobních interakcí, zvětšením reakčního povrchu a zvýšením lokální koncentrace meziproduktů. Enkapsulované enzymy se široce využívají v různých odvětvích, například biokatalýzy, enzymoterapie nebo biomedicíny (Weng *et al.*, 2023).

2.2.3. Zesíťování

Při chemickém zesíťování (cross-linking) se nejdříve vysráží protein pomocí přídavku srážedla, jako jsou soli, organická rozpouštědla nebo polymery a následně dochází mezi molekulami enzymů pomocí bifunkčních nebo polyfunkčních síťovacích činidel k vytvoření dvourozměrného zesíťovaného agregátu, který je nerozpustný ve vodě a nazývá se jako zesíťovaný enzym (Ramos *et al.*, 2019).

Tato metoda je považována za slibnou metodu imobilizace enzymů díky jejím výhodám, jako je technická jednoduchost, zvýšená stabilita enzymů, vysoká objemová aktivita enzymu v imobilizované formě, nízké výrobní náklady, protože není zapotřebí nosič, dále také možnost použití částečně přečištěného enzymu a imobilizace různých enzymů společně. Jedná se o techniku bez nosiče zahrnující zesíťované krystaly enzymů a zesíťované agregáty enzymů (Ramos *et al.*, 2019).

Nejčastěji používaným síťovacím činidlem pro tuto metodu je glutaraldehyd. Při této technice je enzym imobilizován prostřednictvím chemické vazby, podobně jako při technice kovalentní interakce. Rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že tato technika využívá síťovací činidlo a nepoužívá nosič (Abdulmalek *et al.*, 2022).

2.2.4. Kovalentní vazba

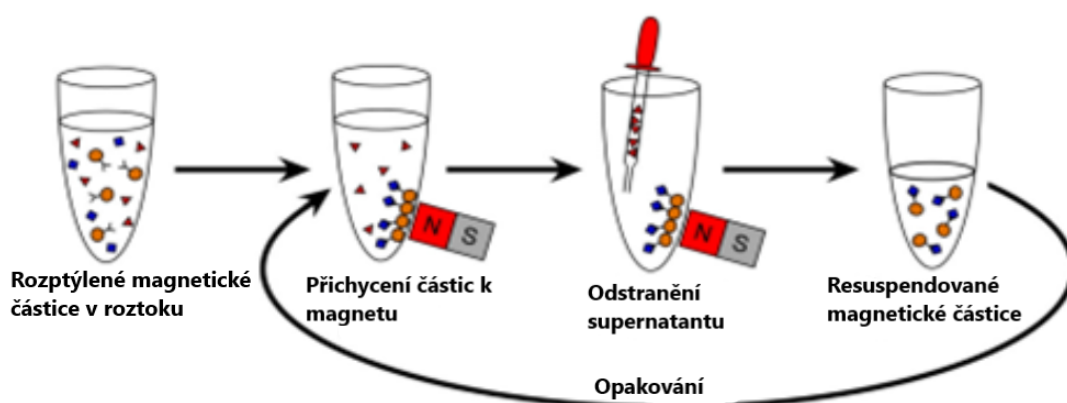
Další široce používanou metodou je kovalentní vazba, při níž pevné spojení mezi enzymem a nosičem zabraňuje desorpci na rozdíl od fyzikální adsorpce (Luo *et al.*, 2023). Jedná se o chemickou imobilizační techniku, při které vzniká kovalentní vazba mezi funkční skupinou na povrchu enzymu a reaktivní funkční skupinou na povrchu nosiče. Používané funkční skupiny pro kovalentní vazbu na reaktivní skupiny nosiče jsou zejména aldehydové, aminoskupiny, hydroxylové a karboxylové skupiny (Santos *et al.*, 2019).

Kovalentní vazba je neúčinnější imobilizační technika díky velmi silným interakcím mezi materiály nosiče a enzymem, také zabraňuje uvolnění enzymu z vazby, snižuje difuzní omezení produktů nebo substrátu a zlepšuje aktivitu a stabilitu enzymu (Abdulmalek *et al.*, 2022). Nevýhodou této metody může být vyšší cena nosiče, potřeba vyšší koncentrace enzymů kvůli jejich občasné inaktivaci po chemickém ošetření a celý proces je složitější než u fyzikální adsorpce (Rezaie *et al.*, 2024).

Při použití některých typů pevných matric, které na povrchu nemají aktivní funkční skupinu, je nutné provést modifikaci na povrchu těchto materiálů vložením specifické funkční skupiny před imobilizačním procesem enzymu. Pro své snadné provedení a možnost zvýšení aktivity enzymu se často využívá modifikace pomocí glutaraldehydu (Santos *et al.*, 2019).

2.2.5. Imobilizace na magnetické částice

Mezi nejčastější dva typy metod imobilizace enzymů patří: imobilizace zesíťováním a imobilizace na bázi nosiče. Imobilizace na pevný nosič je mnohem více rozšířená. Z mnoha nosičů používaných pro imobilizaci enzymů se získaly oblibu magnetické částice, protože umožňují snadné oddělení imobilizovaného enzymu od reakčního média působením vnějšího magnetického pole (viz Obrázek 6) a lze je získat relativně efektivními metodami syntézy v požadované velikosti částic za nízké náklady. Imobilizace enzymů na magnetické materiály vyžaduje modifikaci magnetických částic zavedením funkční skupiny na jejich povrch (Wang *et al.*, 2024). Běžně se k tomuto účelu využívají látky jako je polyethylenglykol (PEG) (Han *et al.*, 2018), kyselina 3-merkaptopropionová (MPA) (Jiang *et al.*, 2023) či kyselina propionová (Zhuo *et al.*, 2024).



Obrázek 6: Separace magnetických částic. Převzato a upraveno dle (Tarn *et al.*, 2009).

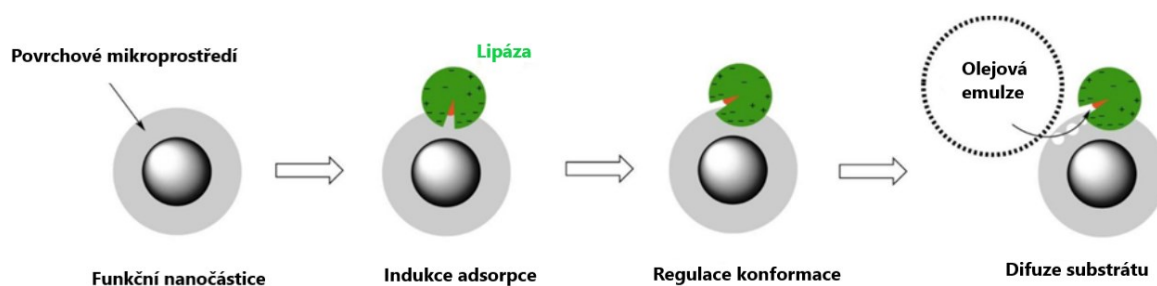
2.2.6. Orientovaná a neorientovaná vazba

Orientace molekuly enzymu na povrchu nosiče ovlivňuje jeho aktivitu. Řízené navození orientace enzymu na povrchu neboli orientovaná vazba na nosič (viz Obrázek 7), zlepšuje účinnost imobilizovaného enzymu vhodným přístupem k jeho aktivnímu místu (Luo *et al.*, 2023).

Imobilizace neorientovanou vazbou enzymu na pevný nosič může mít negativní dopady na aktivitu enzymu, způsobené nevhodnou konformací, omezeným přístupem k aktivnímu místu enzymu a obtížným přenosem látek k enzymu. Z toho důvodu je potřeba navrhnout nejlepší imobilizační podmínky a protokol pro konkrétní enzym. Vhodná orientace enzymu na povrchu nosiče s předem určeným místem připojení může zlepšit stabilitu imobilizovaných enzymů a minimalizovat nežádoucí interakce (Schöffler *et al.*, 2017).

Pro návrh vhodných nosičů a imobilizačních metod pro enzym má velký význam povrchové mikroprostředí nosiče, které má vliv na orientaci enzymů na povrchu nosiče a na konformaci enzymů (Gao *et al.*, 2012).

Vlastnosti nosiče ovlivňující enzym jsou hydrofobnost/hydrofilnost povrchu, pórovitost, kompatibilita enzymu s nosičem a povrchový náboj nosiče. Povrchové pH, náboj a hydrofobní vlastnosti pevného nosiče ovlivní lokální mikroprostředí navázaného enzymu a enzym v tomto mikroprostředí může provádět konformační změny, aby splňoval stav s nejnižší energií (Luo *et al.*, 2023).

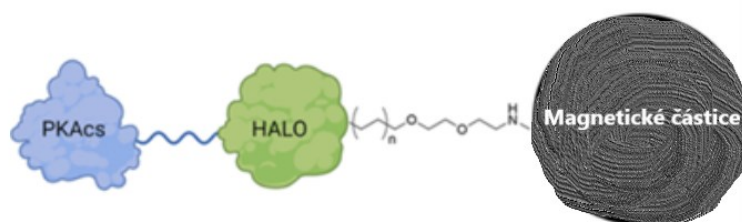


Obrázek 7: Orientovaná vazba enzymu lipázy. Převzato a upraveno dle (Luo *et al.*, 2023).

2.3. Konkrétní příklady imobilizace proteinkinázy A

Deane *et al.* (2023) ve své studii pracovali s katalytickou podjednotku cAMP-dependentní proteinkinázy A, začlenili ji do imobilizované proteinové fúze a vytvořili aktivní fúzní protein PKA-HaloTag (viz Obrázek 8). Pro vytvoření imobilizovaného fúzního proteinu PKA si vybrali protein HaloTag, což je modifikovaná haloalkan dehalogenáza.

HaloTag katalyzuje tvorbu kovalentních vazeb enzymu s pevným nosičem (magnetické částice) funkčně upraveným chloralkanovými ligandy specifickými právě pro tento protein. HaloTag se osvědčil jako kompatibilní fúzní partner s více třídami enzymů, což vedlo k imobilizovaným enzymům s požadovanými vlastnostmi zvýšené aktivity a možností opakovaného použití.



Obrázek 8: Aktivní fúzní protein PKA-HaloTag. Převzato a upraveno dle (Deane *et al.*, 2023).

Herberg *et al.* (2000) představili nový přístup využívající povrchovou plasmonovou resonanci (SPR) k přímému zkoumání asociace a disociace A – kinázových kotevních proteinů se všemi čtyřmi izoformami regulační podjednotky proteinkinázy A imobilizovanými na modifikovaném povrchu cAMP (kovalentní vazba 8-azido- ^{32}P cAMP) s vysokou přesností. K imobilizaci regulačních podjednotek PKA byl použit analog cAMP, 8-AHA-cAMP, kovalentně spojený pomocí linkeru v poloze 8'adeninového kruhu s čipem CM5 aminovou vazbou. Tyto cAMP čipy vážaly velmi specificky a pevně všechny čtyři typy regulační podjednotky PKA. Po navázání regulační podjednotky bylo možné sledovat asociaci a disociaci A – kinázových kotevních proteinů. Imobilizace regulačních podjednotek PKA byla přínosná při následné kinetické studii při stanovení zdánlivých rychlostních a rovnovážných vazebných konstant pro interakci všech izoform PKA s jakýmkoli A – kinázovými kotevními proteiny.

Ve studiích se často objevuje imobilizace substrátu pro proteinkinázu A za účelem stanovení její aktivity. Tan *et al.* (2013) sledovali aktivitu a inhibici proteinkinázy A fluorometrickou metodou. V experimentu se při fosforylaci peptidového substrátu značeného fluorescein-izothiokyanátem (FITC) adsorbují a koncentrují produkty fosforylace na povrchu magnetických částic potažených kyselinou nitrilotrioctovou. Nejdříve dochází k vazbě iontů Zr^{4+} na kyselinu nitrilotrioctovou na povrchu magnetických částic a poté ionty Zr^{4+} vážou fosfátovou skupinu prostřednictvím chelatace. Po magnetické separaci se intenzita fluorescence homogenního roztoku výrazně mění. Fluorescenční odezva umožňuje

touto metodou založenou na magnetických částicích snadno detekovat kinázovou aktivitu pomocí spektrofotometru. Magnetické částice potažené kyselinou nitrilotrioctovou jsou pro tuto metodu znovu použitelné po odstranění jejich vazby k Zr^{4+} iontů a následně opětovným chelátováním. Tato metoda představuje možnost pro efektivní test kinázové aktivity a screening inhibitorů.

2.4. Metody stanovení aktivity proteinkináz a fosforylace proteinů

Patologické změny fosforylace proteinů a kinázové aktivity jsou úzce spojeny s mnoha lidskými chorobami. Stanovení kinázové aktivity a její inhibice má zásadní význam pro základní biochemický výzkum a objevování léčiv cílených na kinázy (Liu *et al.*, 2014).

V minulosti se obvykle používaly radioizotopové metody pro měření aktivity proteinkináz, které ke sledování fosforylačních reakcí používaly radioaktivní ATP. Tyto metody byly sice dostatečně citlivé pro detekci aktivity proteinkináz, ovšem bylo zapotřebí specifických přístrojů a byly nebezpečné pro vysoké riziko radioaktivní kontaminace (Yin *et al.*, 2015).

Následně se začaly používat méně rizikové novější metody, jako je rezonanční rozptyl světla (Wang, *et al.*, 2005), technika zobrazování povrchovou plazmovou rezonancí (Cheng *et al.*, 2009), Ramanova spektroskopická analýza (Li *et al.*, 2009), fluorescenční metoda (Zhou *et al.*, 2013), kolorimetrická metoda (Kitazaki *et al.*, 2012), fotoluminiscenční metoda (Nonga *et al.*, 2020), elektrochemiluminiscenční metoda (Liu *et al.*, 2015), kvantitativní hmotnostní spektrometrie (Zhang, Schneider *et al.*, 2020).

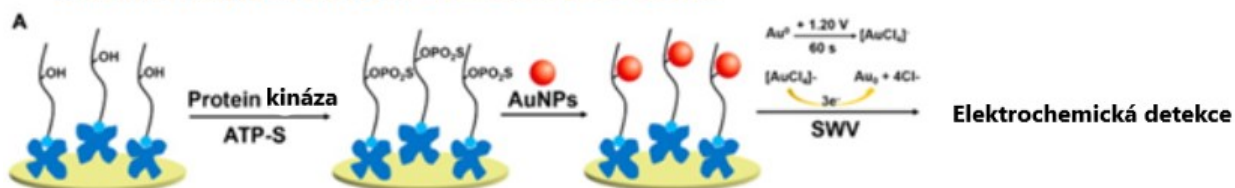
Nevýhodou těchto metod je drahé a složité technické vybavení a časově náročné pracovní postupy včetně zpracování vzorků. V porovnání s předchozími metodami se ukázaly elektrochemické metody jako levnější, jednodušší na obsluhu a dostatečně citlivé pro stanovení aktivity proteinkináz (Yin *et al.*, 2015, Chang *et al.*, 2023, Liu *et al.*, 2014).

2.4.1. Elektrochemická stanovení ve spojení s nanomateriály

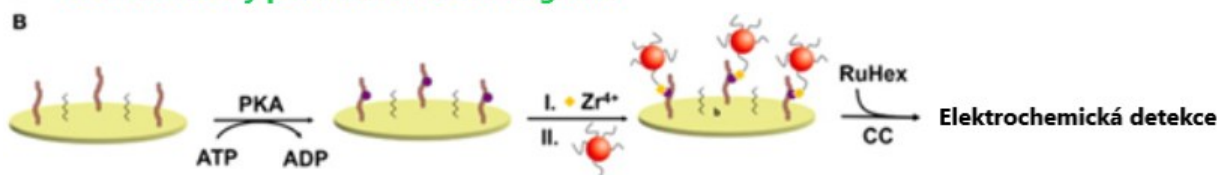
Nanomateriály mají oproti běžným materiálům řadu důležitých výhod, jako je vynikající vodivost a katalytická aktivita, díky nimž jsou vhodné pro výrobu elektrochemických biosenzorů s možností zlepšení jejich vlastností (Liu *et al.*, 2014). Elektrochemické biosenzory mají vysokou citlivost, rychlou odezvu na signál, široký lineární rozsah a nízké náklady na analýzu. Proto mohou být používány při studiu fosforylace a detekci aktivity kináz, čímž položily důležitý základ pro výzkum chorob a léčiv souvisejících s kinázami (Tan *et al.*, 2019).

Elektrochemické stanovení kináz

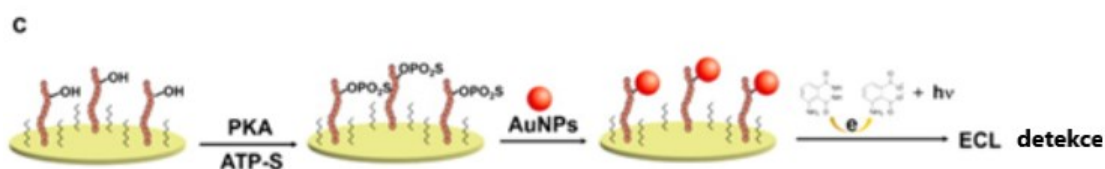
Nanomateriály působící jako elektroanalytická sonda



Nanomateriály působící na zesílení signálu



Elektrochemiluminiscenční detekce



Obrázek 9: Elektrochemické stanovení fosforylovaného proteinu na bázi nanomateriálů. Převzato a upraveno dle (Liu *et al.*, 2014).

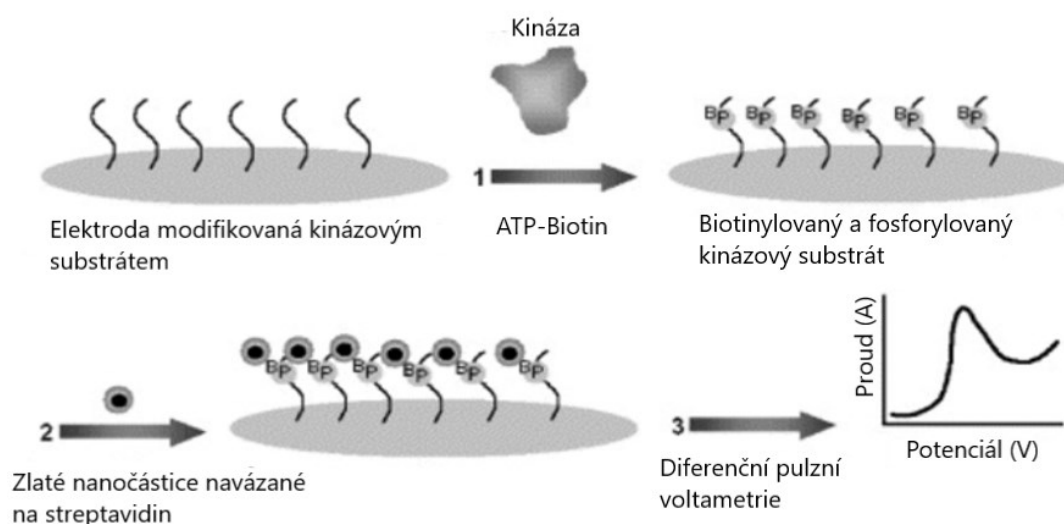
Spojení nanomateriálů a elektrochemické detekce (viz Obrázek 9) představuje slibnou kombinaci pro vývoj vysoce citlivých a praktických biosenzorů. Mezi možnosti elektrochemických senzorů patří spojení s nanomateriály působícími jako elektroanalytická sonda. Na obrázku 9A je jako příklad znázorněna elektrochemická detekce thiofosforylace katalyzované proteinkinázou pomocí ATP-S a AuNPs, které zde působí jako elektroanalytická sonda pro detekci signálu. Další možností elektrochemických senzorů je využití nanomateriálů k zesílení signálu. Na obrázku 9B je jako příklad uvedena elektrochemická detekce aktivity proteinkinázy pomocí Zr^{4+} a DNA-AuNPs. Jako poslední možnost je uveden elektrochemiluminiscenční biosenzor. Na obrázku 9C je jako příklad popsán test aktivity proteinkinázy s použitím AuNPs pro zesílení signálu luminolu (Liu *et al.*, 2014).

2.4.2. Nanomateriály působící jako elektroanalytická sonda

Zlaté nanočástice (AuNPs) mohou být použity jako účinné elektroanalytické značky v elektrochemických biosenzorech díky svým jedinečným elektroaktivním a elektrokatalytickým vlastnostem (Liu *et al.*, 2014).

Kerman *et al.* (2009) navrhli metodu elektrochemického biosenzoru založenou na thiofosforylaci za použití adenosin 5'-[γ -thio] trifosfátu (ATP-S) jako ko-substrátu (schéma viz Obrázek 9A). Po thiofosforylaci peptidů, které jsou imobilizované na povrchu pracovní elektrody z oxidu cíničitého, se AuNPs vážou pomocí ATP-S na povrchu elektrody. Elektrochemicky se detekují AuNPs v 0,1 M HCl médiu sledováním oxidace Cl⁻ na povrchu AuNPs. Pro elektrochemickou detekci byla využita chloridová redoxní chemie metodou square-wave voltametrie (SWV). Touto metodou se ve studii stanovovala aktivita klinicky významné tyrosinové proteinkinázy Abl-T315I, která se podílí na terapii chronické myeloidní leukémie (CML).

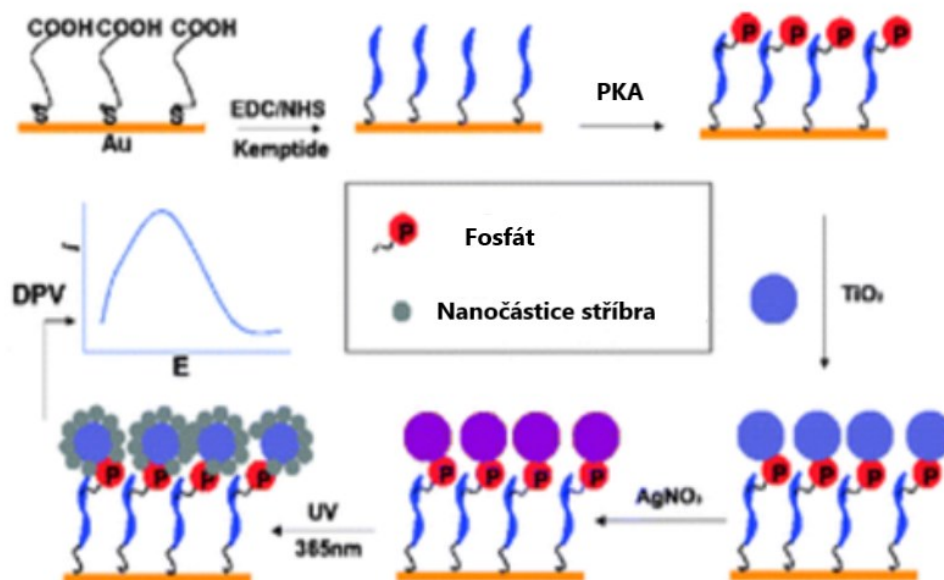
Ve studii od Kerman, Chikae *et al.* (2007) byla použita metoda, která je založená na značení fosforylovaných proteinů pomocí zlatých nanočástic (AuNPs) a následné elektrochemické detekci (viz Obrázek 10) diferenčně pulzní voltametrií (DPV). Detekce fosforylovaného substrátu na elektrodě modifikované substrátem se zakládá na biotinylní substrátu specifického pro kinázu s ATP-biotinem jako ko-substrátem. Následně byl fosforylovaný a biotinylovaný substrát specifický pro kinázu vystaven AuNPs konjugované se streptavidinem. Vysoká afinita mezi streptavidinem a biotinem vede k navázání AuNPs na substrát specifický pro kinázu. Elektrochemická odezva získaná z AuNPs umožňuje sledovat aktivitu kinázy. Kinázová aktivita je sledována pomocí elektrochemické detekce redukce tetrachlorzlatitých iontů vzniklých elektrochemickou oxidací AuNPs v 0,1 M HCl médiu.



Obrázek 10: Schématické znázornění principu pro detekci fosforylace proteinů na bázi zlatých nanočástic. (1) Fosforylace a biotinylní imobilizace imobilizovaného peptidu na uhlíkové elektrodě (SPCE) (2) připojení zlatých nanočástic konjugovaných se streptavidinem (3) redukční signál AuNPs byl sledován pomocí diferenční pulzní voltametrie. Převzato a upraveno dle (Kerman, Chikae *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2024) vyvinuli jednoduchý a citlivý přístup k homogenní detekci aktivity proteinkináz založený na nanoimpaktní elektrochemii, která sleduje stupeň agregace nanočástic stříbra (AgNPs) před fosforylací a po ní. Fosforylace katalyzovaná proteinkinázami vnáší do peptidového substrátu dva záporné náboje, což vede ke změnám elektrostatických interakcí mezi fosforylovaným substrátem a záporně nabitými AgNPs. Změny elektrostatických interakcí ovlivňují míru agregace AgNPs. Prostřednictvím přímé elektrooxidace AgNPs v nanoimpaktních elektrochemických experimentech lze kvantifikovat aktivitu proteinkináz. Senzor vykazoval široký detekční rozsah, nízký detekční limit (0,0048 U/ μ l) pro proteinkinázu A, a také umožňuje sledovat procesy fosforylace katalyzované PKA.

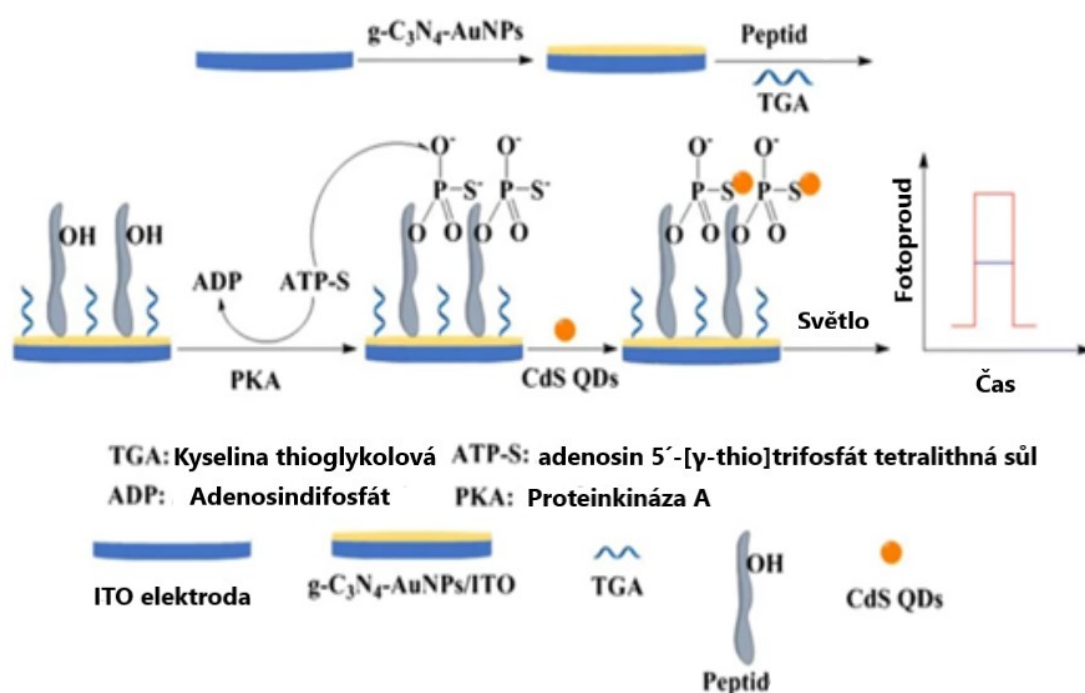
Ji *et al.* (2009) vyvinuli elektrochemický biosenzor pro stanovení aktivity a inhibice proteinkinázy A (viz Obrázek 11). Metoda se zaměřuje na využití nanočástic TiO_2 k selektivní vazbě na fosforylované peptidy. Nanočástice TiO_2 se využívají také jako senzitizer pro světlem indukované redoxní procesy k přípravě nanočástic stříbra (AgNPs). Pod UV zářením dochází fotokatalytickou cestou k redukci Ag^+ excitovanými elektrony na AgNPs a následuje jejich navázání na povrch TiO_2 nanočástic. Navázané AgNPs se používají k produkci signálu a během elektrochemických měření se dále oxidují na ionty Ag^+ .



Obrázek 11: Uspořádání elektrochemického senzoru s využitím nanočástic stříbra pro stanovení aktivity a inhibice proteinkinázy A. Převzato a upraveno dle (Ji *et al.*, 2009).

2.4.3. Nanomateriály působící na zesílení signálu

Sui *et al.* (2018) popsali citlivou a selektivní fotoelektrochemickou metodu (viz Obrázek 12) pro detekci aktivity proteinkinázy A založenou na použití nitridu uhlíku podobného grafitu ($g-C_3N_4$) a kvantových teček CdS (QD, nanokrystaly). Nejprve došlo k syntéze komplexu nitridu uhlíku a zlatých nanočástic (AuNPs). Tento komplex byl použit jako fotoelektrochemicky aktivní materiál a zároveň jako nosič pro imobilizaci peptidů, které jsou fosforylovány kinázou. Imobilizované peptidy byly připojeny k ITO elektrodě modifikované $g-C_3N_4$ -AuNPs komplexem a poté fosforylovány PKA v přítomnosti ATP-S. Nakonec byly přidány kvantové tečky CdS, aby se zvýšila elektrochemická odezva $g-C_3N_4$ na základě vazby Cd-S mezi kvantovými tečkami a thiolovými skupinami. Metoda byla použita ke kvantifikaci inhibičního účinku kyseliny ellagové na PKA a ke sledování aktivity enzymu v buněčných lyzátech.



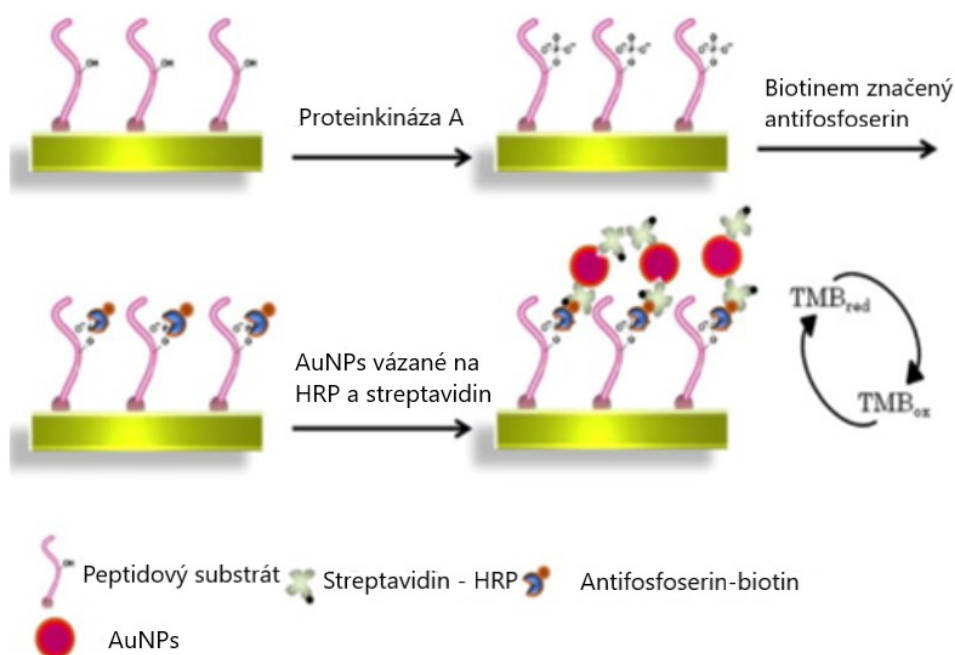
Obrázek 12: Uspořádání elektrochemického senzoru pro detekci aktivity PKA s využitím CdS kvantových teček. Převzato a upraveno dle (Sui *et al.*, 2018).

Uhlíkové nanotrubičky mají vynikající elektrochemické vlastnosti, proto se začaly v elektrochemické detekci používat elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami k podpoře přenosu elektronů během redoxního procesu. Výhodou je zesílení detekčního signálu a zvýšení citlivosti měření. Cílový substrát pro kinázu tyrosin může být oxidován na uhlíkových elektrodách, jak bylo popsáno již na počátku 80. let 20. století (Liu *et al.*, 2014).

Oxidace tyrosinu umožňuje jasně rozlišit fosforylované a nefosforylované formy peptidů elektrochemicky. Fosforylace tyrosinového zbytku může potlačit odezvu oxidačního proudu a posunout ho na vyšší oxidační potenciál než nefosforylovaný zbytek. Integrací vysoce citlivé elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami a signální odezvy oxidačního proudu tyrosinu před a po fosforylaci umožňuje nový přístup (bez nutnosti značení peptidů) pro kvantitativní elektrochemickou detekci fosforylace peptidů tyrosinu diferenční pulzní voltametří (Kerman, Vestergaard *et al.*, 2007).

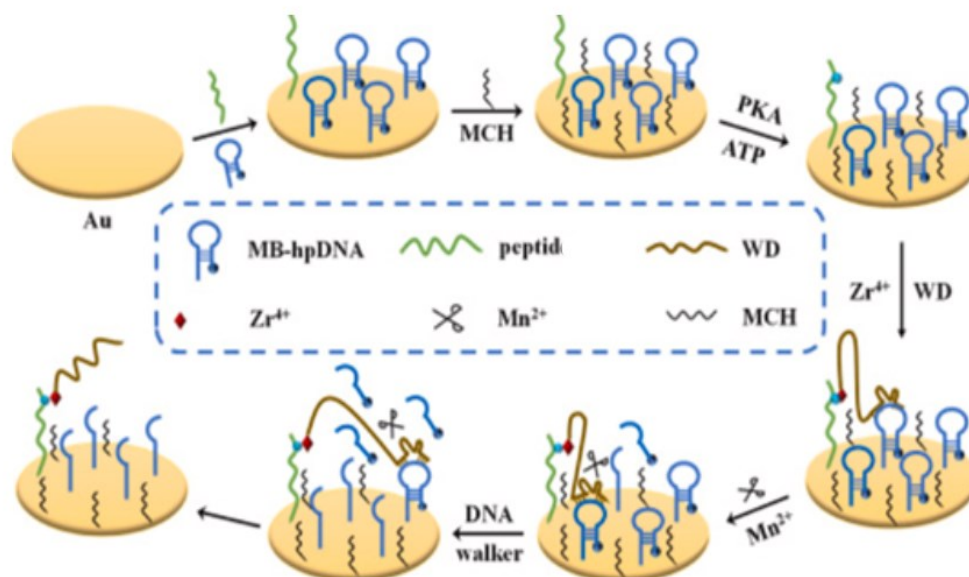
Zlaté nanočástice (AuNPs) se také ukázaly jako vhodné nanomateriály, které se mohou využít pro zesílení signálu při elektrochemické detekci, a to hlavně díky svému velkému povrchu, na který lze vložit velké množství biomolekul nebo signálních sond (Liu *et al.*, 2014).

Wang *et al.* (2011) vyvinuli biosenzor (viz Obrázek 13), v němž je substrát imobilizovaný na povrchu zlaté elektrody nejdříve fosforylován proteinkinázou A, a poté je k němu připojena specifická protilátka značená biotinem. Následně jsou na povrch elektrody imobilizovány zlaté nanočástice modifikované křenovou peroxidázou (HRP) s navázaným streptavidinem prostřednictvím interakce biotin-avidin. Křenová peroxidáza může poté na povrchu elektrody katalyzovat oxidaci 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) a získané elektrochemické signály se mohou využít ke sledování fosforylace. Takto navrženou elektrochemickou strategii lze použít pro detekci kinázové aktivity, a také pro studování inhibice proteinkináz.



Obrázek 13: Schéma elektrochemické detekce aktivity proteinkinázy A zesílením signálu pomocí AuNPs. Převzato a upraveno dle (Wang *et al.*, 2011).

Liao *et al.* (2023) vyvinuli pro detekci aktivity PKA novou elektrochemickou metodu (viz Obrázek 14) založenou na strategii zesílení signálu pomocí DNA enzymu řízeného Zr^{4+} ionty. Tato strategie umožňuje speciálně navržený peptidový substrát a thiolovanou vlásečkovou DNA značenou methylenovou modří (MB-hpDNA) ukotvit na povrchu zlaté elektrody pomocí vazby Au-S. V přítomnosti ATP a PKA byl peptidový substrát fosforylován a spojen s walkerovou DNA prostřednictvím Zr^{4+} -fosfátové chemie. Navázaná Walker DNA (WD) hybridizovala s oblastí smyčky vlásečkové DNA značené methylenovou modří. Došlo ke vzniku Mn^{2+} -dependentního DNA enzymu, který štěpil DNA vlásečku na fragment značený methylenovou modří uvolňující se z povrchu elektrody. Štěpení DNA vlásečky vedlo k velkému poklesu elektrochemického signálu a poskytlo možnost elektrochemické detekce aktivity PKA. Navrženou metodu lze také použít pro hodnocení inhibice a stanovení aktivity PKA ve vzorcích buněk. Navrhovaný biosenzor je velmi slibný pro diagnostiku a výzkum léčiv pro onemocnění související s PKA.



Obrázek 14: Schématické znázornění elektrochemické detekce aktivity PKA založené na strategii zesílení signálu pomocí DNA enzymu řízeného Zr^{4+} . Převzato z (Liao *et al.*, 2023).

2.4.4. Elektrochemiluminiscenční senzory pro stanovení aktivity proteinkináz

Elektrochemiluminiscence (ECL) je proces, při němž dochází k vyzařování světla při redoxní reakci elektrogenerovaných reaktantů. Tato technika představuje spojení elektrochemie a luminiscenčních technik. Díky tomuto spojení má tato technika výhody

elektrochemie i luminiscence, mezi které patří vysoká citlivost a široký dynamický rozsah koncentrační odezvy (Liu *et al.*, 2014).

Xu *et al.* (2010) vyvinuli nový elektrochemiluminiscenční biosenzor (viz Obrázek 9C) využívající zlaté nanočástice jako sondy pro přenos signálu pro detekci aktivity kináz. AuNPs byly specificky konjugovány s thiofosfátovou skupinou po procesu fosforylace v přítomnosti ko-substrátu ATP-S. Díky dobré vodivosti, velkému povrchu a vynikající elektroaktivitě vůči oxidaci luminolu AuNPs extrémně zesilovaly elektrochemiluminiscenční signál luminolu a nabízely vysoce citlivý ECL biosenzor pro detekci kinázové aktivity. Navržený biosenzor vykazoval vysokou citlivost, nízký detekční limit (0,07 U/ml), široký lineární rozsah a vynikající stabilitu. Tento biosenzor lze navíc použít i pro kvantitativní analýzu inhibice kináz. Jednoduchý a citlivý biosenzor je slibný při vývoji testu aktivity kináz *in vitro* a screeningu inhibitorů pro klinickou diagnostiku a vývoj léčiv.

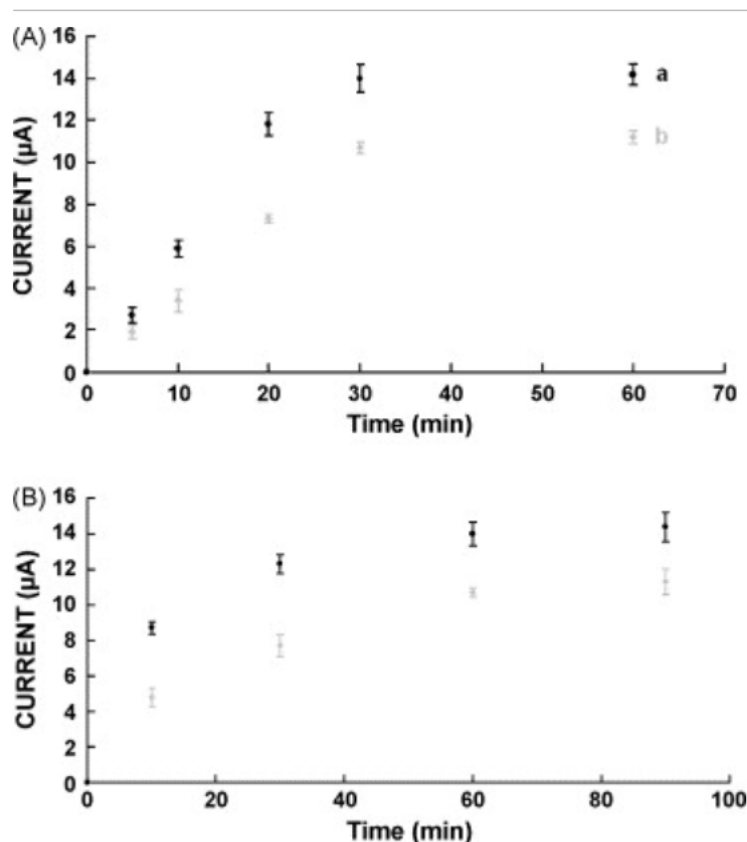
Zhao *et al.* (2012) vyvinuli jednoduchý elektrochemický biosenzor pro monitorování aktivity a inhibice proteinkinázy A, založený na technologii magnetických částic a zesílení signálu pomocí AuNPs. V této strategii založené na ECL byly připraveny nanosondy ECL konjugací AuNPs s fosforylovanými záchytnými sondami DNA. Zr^{4+} zprostředkoval vazbu mezi biotinem modifikovanými fosforylovanými peptidy a nanosondami ECL. Komplexy byly poté zachyceny a obohaceny na povrchu elektrody magnetickými částicemi potaženými streptavidinem pro detekci ECL. Spojení AuNPs a techniky ECL poskytuje možnost vysoce citlivého testu. Využití magnetických částic a Zr^{4+} vede ke zjednodušenému a opakovatelnému použití protokolu.

2.4.5. Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

Ve studii Kerman, Chikae *et al.* (2007), jejíž princip byl popsán v kapitole 2.4.2., byla elektrochemická odezva získána z Au nanočástic umožňující sledovat aktivitu kinázy, a také inhibici malých molekul inhibitorů na fosforylaci proteinů. Ve studii stanovili aktivitu proteinkinázy A v kombinaci s jejím vysoce specifickým peptidovým substrátem Kemptide (LRRASLG). Detekční limit pro substrát Kemptide byl stanoven na 10 μ M a detekční limit pro kinázovou aktivitu proteinkinázy A byl stanoven na 10 U/ml. Inhibice aktivity PKA na Kemptide pomocí kyseliny ellagové byla sledována s IC_{50} (poloviční maximální inhibiční koncentrace) 3,5 μ M.

V této zmíněné studii byla kinetika fosforylační reakce sledována zastavením reakce v různých časových intervalech a měřením signálu redukce Au (viz Obrázek 15 A). Pozorovali,

že 200 U/ml PKA dosáhlo úrovně nasycení přibližně po 30 minutách inkubace. Když se po 1 hodině kinázová reakce zastavila, a poté se fosforylované a biotinylované peptidy nechaly reagovat s nanočásticemi Au potaženými streptavidinem, nebylo pozorováno žádné výrazné zvýšení odezvy redukčního píku enzymu. Ověřovala se také závislost redukčního signálu Au na době inkubace s Au nanočásticemi potaženými streptavidinem (viz Obrázek 15 B). Redukční signály získané z Au nanočástic se postupně zvyšovaly až po 1 h a poté zůstaly stabilní. Z toho důvodu se ve studii dále používalo 30 minut kinázové reakce s následnou 1 h inkubací s Au nanočásticemi potaženými streptavidinem (Kerman, Chikae *et al.*, 2007).



Obrázek 15: Graf závislosti (A) doby kinázové reakce na odezvě Au nanočástic, (B) doby inkubace s Au nanočásticemi monitorován proud při vloženém potenciálu. Převzato z (Kerman, Chikae *et al.*, 2007).

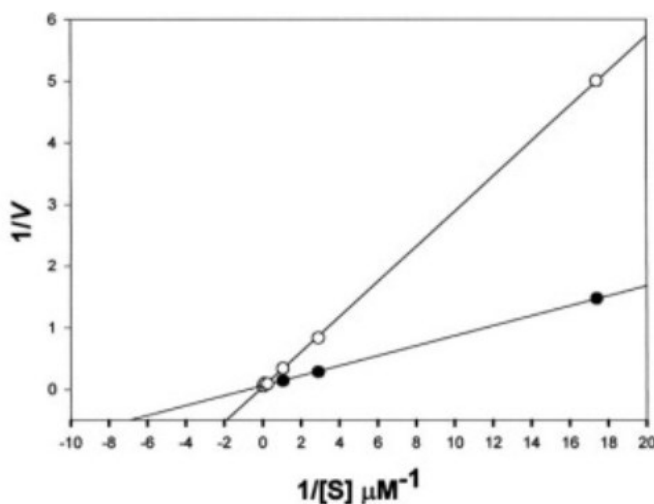
Enzymová kinetika solubilních enzymů je popsána rovnicí Michaelis-Mentenové (viz Obrázek 16), kde V je počáteční reakční rychlost enzymem katalyzované reakce ($\mu\text{mol}/\text{min}$), S je koncentrace substrátu ($\mu\text{mol}/\text{ml}$), V_{max} je maximální reakční rychlost enzymem katalyzované reakce ($\mu\text{mol}/\text{min}$) a K_M je konstanta Michaelis-Mentenové ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) (Bhattacharya *et al.*, 2004).

$$v = v_{\max} \frac{s}{K_m + s}$$

Obrázek 16: Rovnice Michaelis-Mentenové. Převzato z (Bhattacharya et al., 2004).

Kinetické parametry enzymů imobilizovaných na pevných nosičích se mění v důsledku omezení přenosu látek, zejména pokud je nosič porézní. Účinný přenos substrátu do katalytického místa v enzymu a stanovení kinetických parametrů se stává nezbytné pro přesný popis imobilizovaného systému (Bhattacharya et al., 2004).

Jednoduchými úpravami lze rovnici Michaelis-Mentenové (rovnice hyperboly) převést na rovnici přímky pomocí metody linearizace podle Lineweaver-Burka. V grafu Lineweaver-Burka (viz Obrázek 17) jsou reakční rychlosti vyneseny proti různým koncentracím substrátu, aby se získala lineární transformace. Z grafu lze odhadnout parametr enzymu Michaelisova konstanta (K_M) (Gasic et al., 2001).



Obrázek 17: Graf linearizace podle Lineweaver-Burka. Převzato z (Gasic et al., 2001).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a pomůcky

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- pH metr Orion 420A+ (Orion, USA)
- Mini Rotátor PTR – 25 Grant-bio (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor MPC-S (Invitrogen ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Termostat Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- Termoblok – bloková digitální lázeň pro mikrozkušavky BTD Grant-bio (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Vortex WX (Velp Scientifica, Usmate Velate, Itálie)
- Zařízení pro výrobu ultračisté vody HALIOS (Neptec, Montabaur, Německo)
- Multipotenciostat MultiEmStat3 se 4 nezávislými potenciostaty + software MultiTrace 4 (PalmSens, GA Houten, Nizozemí)
- Tištěné tříelektrodové senzory DropSens Metrohm DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou, argentchloridovou referenční elektrodou a pomocnou uhlíkovou elektrodou (plocha pracovní elektrody 11 mm²) (Metrohm DropSens, Švýcarsko)
- Tištěné tříelektrodové senzory DropSens Metrohm DRP-110STR s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem, argentchloridovou referenční elektrodou a pomocnou uhlíkovou elektrodou (plocha pracovní elektrody 11 mm²) (Metrohm DropSens, Švýcarsko)
- Tištěné tříelektrodové senzory SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou, argentchloridovou referenční elektrodou a pomocnou diamantovou elektrodou (plocha pracovní elektrody 7,07 mm²) (Ústav fotoniky a elektroniky, Slovenská technická Univerzita v Bratislavě, Slovensko)
- Zlaté nanočástice o velikosti 5, 10, 20, 30 a 50 nm, stabilizované v citrátovém pufru (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Nosič OLIGO™ R3 Reversed-Phase Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- MALDI destička Opti-TOFTM 384 Well Insert (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, USA)
- MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Použité magnetické částice:

- Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovou funkční skupinou (Carboxylate modified microparticles) o velikosti 0,816 µm (Seradyn Inc., Indianapolis, Indiana, USA)
- Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 o velikosti 1 µm, magnetické částice modifikované Streptavidinem C1 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva)
- Dynabeads^R M-270 Streptavidin o velikosti 2,7 µm, magnetické částice modifikované Streptavidinem (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva)

Speciální biochemikálie:

- Proteinkináza A (PKA) podjednotka Cα lidská, rekombinantní, systém exprese *E. coli*, uchovávací roztok: 20 mM MOPS pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 50% glycerol, čistota > 95 % (SDS-PAGE), teoretická molekulová hmotnost 41 kDa, aktivita > 8 000 000 U/mg (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo), dále používán název PKA
- Adenosin 5'-[γ-thio]trifosfát tetralithná sůl, čistota ≥ 75 %, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Kemptide (Biotin) o sekvenci biotin-LRRASLG, čistota ≥ 95 % (Abbexa Ltd, Cambridge, UK)

3.2. Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice

Použité chemikálie:

- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)

Použité roztoky:

- 50 mM MES pufr, pH 6,0
- 50 mM MES pufr, pH 6,0 s 0,05 % BSA

Postup:

Na 1,2 mg (24 μ l) magnetických částic SeraMag Carboxylate (zásobní 5% suspenze) bylo imobilizováno 6 μ g PKA. Magnetické částice byly odebrány do 2 ml Protein LoBind mikrozkušavek. Následovalo promytí magnetických částic pomocí magnetického separátoru 5 \times 1,2 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0. K promytým částicím bylo přidáno 9 mg EDAC v 600 μ l MES pufru, pH 6,0 a 1,5 mg sulfo-NHS v 600 μ l MES pufru, pH 6,0. Tato reakční směs byla inkubována 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl odstraněn supernatant a k magnetickým částicím bylo přidáno 6 μ g PKA v 50 mM MES pufru, pH 6,0 s 0,05 % BSA v celkovém objemu 1,2 ml. Poté následovala inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru. Následující den byl odstraněn supernatant a magnetické částice byly promyty 5 \times 1,2 ml 50 mM MES pufru, pH 6,0. Pro pozdější použití byly magnetické částice s imobilizovanou PKA skladovány v 50 mM MES pufru, pH 6,0 při teplotě 4 °C. Pro ověření imobilizace byly vzorky analyzovány také hmotnostní spektrometrií MALDI LTQ Orbitrap XL.

3.3. Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A

Použité chemikálie:

- 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)
- Dithiotreitol (DTT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Chlorid hořečnatý (MgCl₂, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- 50 mM MES pufr, pH 6,0
- 40 mM HEPES pufr, pH 7,2
- Reakční pufr, pH 7,2: 40 mM HEPES, 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl₂

3.3.1. Fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A

Postup:

Bylo smícháno 94 µl reakčního pufru, odpovídající koncentrace zásobního roztoku ATP-S (použitá množství ATP-S: 5; 7,5 µl), odpovídající koncentrace PKA (použitá množství PKA: 0,5; 0,68; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 µg) a odpovídající koncentrace zásobního roztoku substrátu Biotin-Kemptide (použitá množství substrátu: 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 µl). Takto připravená reakční směs byla inkubována při 30 °C na rotátoru. Inkubace probíhala 1, 3, 5 a 20 hodin. Po fosforylaci mohou být vzorky uskladněny při -20 °C. Vzorky byly po fosforylaci analyzovány Square-wave voltametrií na tištěných tříelektrodových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou (DRP-C110) podle podmínek popsanych v kapitole 3.4.1. Pro ověření fosforylace byly vzorky analyzovány také hmotnostní spektrometrií MALDI LTQ Orbitrap XL.

3.3.2. Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetických částicích

Postup:

Magnetické částice s imobilizovanou PKA byly promyty 2× 1,2 ml HEPES pufru, pH 7,2. Ze suspenze magnetických částic s imobilizovanou PKA bylo odebráno takové množství magnetických částic odpovídající 1 µg imobilizované PKA použité do reakce. Supernatant byl odebrán od magnetických částic. K magnetickým částicím bylo přidáno 94 µl reakčního pufru, odpovídající koncentrace zásobního roztoku substrátu Biotin – Kemptide

(použitá množství substrátu: 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 μ l) a odpovídající koncentrace zásobního roztoku ATP-S (použitá množství ATP-S: 5; 7,5 μ l). Takto připravená reakční směs byla inkubována 1, 3, 5 nebo 20 hodin při 30 °C na rotátoru. Po odebrání supernatantu byly magnetické částice promyty 5 \times 300 μ l 50 mM MES pufru, pH 6,0 ve kterém byly skladovány při teplotě 4 °C. Vzorky byly po fosforylaci analyzovány Square-wave voltametrií na tištěných tříelektrokových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou (DRP-C110) podle podmínek popsanych v kapitole 3.4.1. Pro ověření fosforylace byly vzorky analyzovány také hmotnostní spektrometrií MALDI LTQ Orbitrap XL.

3.4. Elektrochemická detekce fosforylovaného substrátu

Metoda stanovení aktivity je založena na detekci zlatých nanočástic (AuNPs) zachycených pomocí ATP-S na substrátu cíleně fosforylovaném proteinkinázou A.

3.4.1. Podmínky elektrochemické detekce

Tabulka 1: Podmínky elektrochemického přečištění elektrody a podmínky měření cyklickou voltametrií na DRP-C110 a SP-BDDE elektrodách

C110 i BDD	Cyklická voltametrie
Podmínky přečištění	
$E_{\text{kond.}}$	-0,15 V
$t_{\text{kond.}}$	12 s
$E_{\text{dep.}}$	1,2 V
$t_{\text{dep.}}$	120 s
Podmínky Cyklické voltametrie	
$t_{\text{ekv.}}$	8 s
$E_{\text{poč.}}$	1,2 V
$E_{\text{vertex 1}}$	1,2 V
$E_{\text{vertex 2}}$	0,0 V
E_{krok}	0,005 V
Rychlost skenu	0,1 V/s
Počet skenů	3

Tabulka 2: Podmínky elektrochemického přechištění elektrody a podmínky měření Square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na DRP-C110 elektrodách

C110	Square-wave voltametrie
Podmínky přechištění	
E _{kond.}	0,15 V
t _{kond.}	10 s
E _{dep.}	1,2 V
t _{dep.}	120 s
Podmínky Square-wave voltametrie	
t _{ekv.}	2 s
E _{poč.}	0,8 V
E _{konc.}	0,0 V
E _{krok}	0,003 V
amplituda	0,02805 V
frekvence	25 Hz

Tabulka 3: Podmínky elektrochemického přechištění elektrody a podmínky měření Square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na SP-BDDE elektrodách

BDD	Square-wave voltametrie
Podmínky přechištění	
E _{kond.}	0,15 V
t _{kond.}	10 s
E _{dep.}	1,5 V
t _{dep.}	80 s
Podmínky Square-wave voltametrie	
t _{ekv.}	2 s
E _{poč.}	0,8 V
E _{konc.}	0,0 V
E _{krok}	0,003 V
amplituda	0,02805 V
frekvence	25 Hz

3.4.2. Elektrochemická detekce zlatých nanočástic na tištěných elektrodách

Použité chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková 35 % (HCl, Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)

- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4 , Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan didraselný (K_2HPO_4 , Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid sodný, p.a (NaCl , Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný, p.a (KCl , Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citrónová monohydrát (Lachema, Brno, ČR)
- Citronan trisodný dihydrát (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M HCl
- 10 mM citrátový pufr, pH 3,0

Postup:

Pro měření byly použity tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (DRP-C110), uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (DRP-110STR) nebo borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (SP-BDDE). Nejdříve bylo na elektrodu napipetováno 100 μl 0,1 M HCl. Pro měření bylo smícháno 25 μl AuNPs (o velikosti 5, 10, 20, 30 a 50 nm) a 75 μl citrátového pufru, pH 3,0, směs byla promíchána. Dále bylo smícháno 40 μl připravené směsi s 60 μl 0,1 M HCl. Celkový měřený objem směsi byl 100 μl . Připravená směs byla promíchána a 3 minuty inkubována na rotátoru při laboratorní teplotě. HCl byla opatrně odstraněna z elektrody a na elektrodu bylo napipetováno 100 μl směsi 0,1 M HCl, AuNPs a citrátového pufru. Detekce square-wave voltametrií s Multipotenciostatem MultiEmStat3 se 4 nezávislými potenciostaty ovládaným softwarem MultiTrace 4 probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 2 a 3 kapitoly 3.4.1. Stejný postup byl použit i pro cyklickou voltametrii za podmínek uvedených v Tabulce 1 kapitoly 3.4.1.

3.4.3. Izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem

Použité chemikálie:

- Citronan trisodný dihydrát (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citrónová monohydrát (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 35 % (HCl, Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo)

Použité roztoky:

- 10 mM citrátový pufr, pH 3,0
- 0,1 M HCl

Postup:

Fosforylace peptidového substrátu byla provedena postupem uvedeným v kapitole 3.3.1. pro solubilní PKA a 3.3.2 pro imobilizovanou PKA. Byl použit substrát Biotin-Kemptide a ATP-S, fosforylace probíhala 1 a 5 hodin. U imobilizované PKA byly pomocí magnetického separátoru magnetické částice odděleny od supernatantu. Supernatant byl zpracováván dvěma různými způsoby. Solubilní PKA byla také zpracovávána dvěma různými způsoby stejně jako supernatant imobilizované PKA.

Postup 1: K supernatantu byla přidána směs 50 μ l 20 nm AuNPs a 150 μ l citrátového pufru, pH 3,0. Následovala inkubace 20 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Poté byla směs přidána k 0,25 mg magnetických částic se streptavidinem Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Magnetické částice byly předem promyty 5 \times 200 μ l PBS pufru, pH 7,4. Připravená směs byla inkubována 20 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl supernatant odstraněn a magnetické částice byly 5 \times promyty 100 μ l citrátového pufru, pH 3,0. Magnetické částice byly smíchány s 100 μ l 0,1 M HCl a následně byla směs promíchána a 12 minut inkubována na rotátoru při laboratorní teplotě. Následně byla směs pipetována na elektrodu DRP-C110. Měření probíhalo square-wave voltametrií za podmínek uvedených v Tabulce 2 kapitoly 3.4.1 pro DRP-C110 elektrody.

Postup 2: K supernatantu bylo přidáno 0,25 mg magnetických částic se streptavidinem Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, které byly 3 \times promyty 100 μ l PBS pufru, pH 7,4. Následovala inkubace 20 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl supernatant odstraněn a k magnetickým částicím bylo přidáno 20 μ l 20 nm AuNPs a 80 μ l citrátového pufru, pH 3,0. Připravená směs byla inkubována 20 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Supernatant byl odebrán a magnetické částice byly 1 \times promyty 100 μ l citrátového pufru, pH 3,0. Magnetické částice byly smíchány s 100 μ l 0,1 M HCl a následně byla směs promíchána a 3 minuty inkubována na rotátoru při laboratorní teplotě. Následně byla směs pipetována na elektrodu DRP-C110. Měření probíhalo square-wave voltametrií za podmínek uvedených v Tabulce 2 kapitoly 3.4.1. pro DRP-C110 elektrody.

3.5. Detekce fosforylovaného substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie

Použité chemikálie:

- Acetonitril 99,8 % (ACN, Sigma-Aldrich CHEMIE, GmbH, Steinheim, Německo)

- Kyselina trifluoroctová 99 % (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB, LaserBio Labs SARL, Valbonne, Francie)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 , Fluka, New Jersey, USA)

Použité roztoky:

- 80 % ACN/0,1 % TFA
- 0,1 % TFA
- 5 % TFA
- Matrice pro fosforylované substráty DHB 10 mg/ml v 50 % ACN/0,1 % TFA s 1 % H_3PO_4
- Suspenze fáze OLIGO™ R3 Reversed-Phase Resin v 80 % ACN/0,1 % TFA

3.5.1. Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných POROS OLIGO™ R3 reverzní fází

Postup:

2–3 mm na konci GELoaderu byly stlačeny tak, aby v něm zůstala zachycena R3 fáze, ale aby nedošlo k jeho úplnému zneprůchodnění. Do připraveného GELoaderu bylo napipetováno 10 μ l homogenizované suspenze fáze. Fáze byla opatrně tlačena pomocí insulinové stříkačky. Pipetovaná hustota homogenizované suspenze fáze byla optimalizována tak, aby délka kolonky byla ideálně 1 cm. Do připravené kolonky bylo napipetováno 10 μ l 80 % ACN/0,1 % TFA a následně bylo vše protlačeno skrz. Poté bylo napipetováno 15 μ l 0,1 % TFA k promytí kolonky, aby nad fází zůstalo 5 μ l. Vzorky byly okyseleny 5 % TFA (vzorku 2:1 TFA) a nanášeny do kolonky po 10 μ l bez ředění. Následovalo promytí fáze s navázaným vzorkem 1 \times 15 μ l 0,1 % TFA a zbytkový vzduch byl protlačen přes fázi, aby se vzorek vysušil a nedošlo k ředění elučního roztoku. Do špičky byly přidány 4 μ l matrice a následná eluce probíhala přímo na MALDI destičku. Analýza vzorků proběhla na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL, který analyzuje v pozitivním módu s rozlišovací schopností 100000 (FWHM u $m/z = 400$).

3.5.2. Vyhodnocení dat získaných hmotnostní spektrometrií

Z hmotnostního spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL byla získána hmotnostní spektra. Poměr hmotnosti a náboje (m/z) nefosforylovaného substrátu Biotin-Kemptide odpovídá hodnotě m/z 998,54. Fosforylovaný substrát Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S odpovídá hodnotě m/z 1094,48. Z hmotnostních spekter byly odečteny relativní intenzity píků,

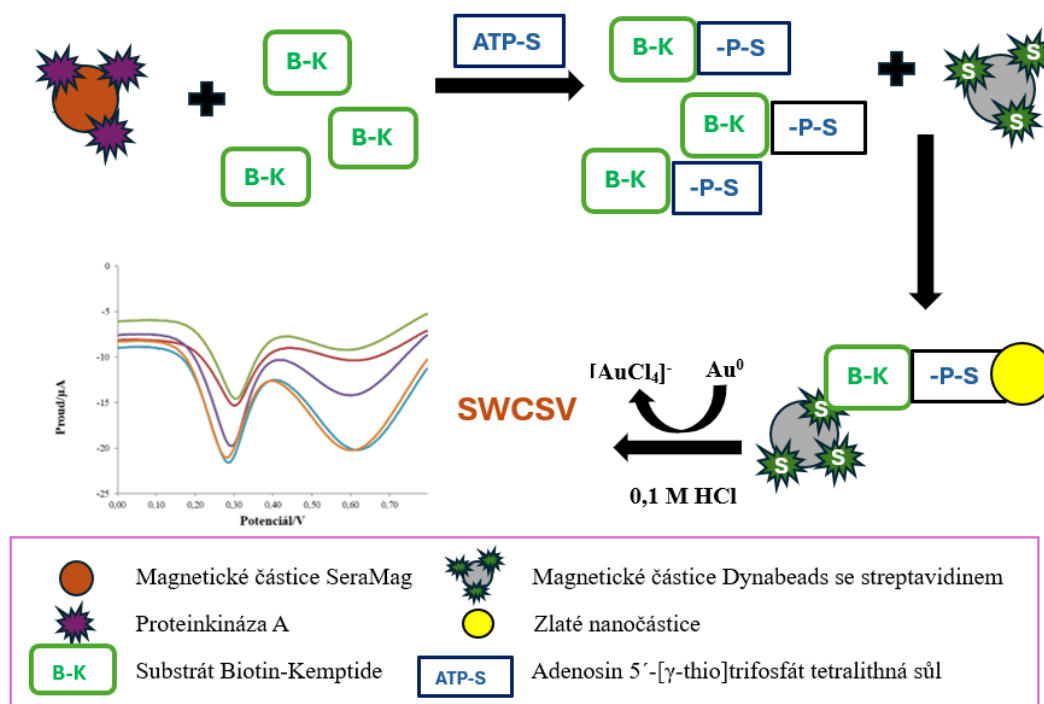
které odpovídaly nefosforylované a fosforylované formě substrátu Biotin-Kemptide. Z odečtených intenzit píků byla vypočtena procentuální míra fosforylace substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S podle vztahu:

$$\begin{aligned} \text{Míra fosforylace [\%]} \\ = \frac{\text{fosforylovaný substrát}}{\text{fosforylovaný substrát} + \text{nefosforylovaný substrát}} \times 100 \end{aligned}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Michaely Šislerové (2022), která zaváděla metodu elektrochemické detekce pro stanovení aktivity proteinkinázy A. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo ověřit, zda zavedená metoda bude, v navrženém uspořádání, použitelná a vhodná pro stanovení enzymové aktivity proteinkinázy A imobilizované na vybrané magnetické částice a pro charakterizaci imobilizovaného enzymu z pohledu kinetických parametrů, tedy pro experimentální stanovení Michaelisovy konstanty (K_M) a mezní rychlosti (v_{max}). Cílem bylo porovnat imobilizovaný a solubilní enzym.

Pro stanovení aktivity proteinkinázy A byl použit nízkomolekulární substrát Biotin-Kemptide (aminokyselinová sekvence Biotin-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly), u kterého dochází k fosforylaci na aminokyselině serinu. Jako elektrochemická detekční metoda byla použita square-wave katodická rozpouštěcí voltametrie s tištěnými tříelektrodovými senzory DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou, DRP-110STR s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem a SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou. Metoda stanovení aktivity enzymu, která je založena na detekci zlatých nanočástic (AuNPs) zachycených na substrátu cíleně fosforylovaném proteinkinázou A. Navržené uspořádání experimentu s využitím detekčních nanočástic vychází z práce Kerman, Kraatz *et al.* (2007) a je uvedeno na Obrázku 18.



Obrázek 18: Schéma uspořádání experimentu

V prvním kroku experimentu proběhne fosforylace substrátu Biotin-Kemptide proteinkinázou A imobilizovanou na vybraných magnetických částicích nebo její solubilní formou pro porovnání. Jako substrát byl zvolen nízkomolekulární peptidový substrát Biotin-Kemptide s aminokyselinovou sekvencí biotin-L-R-R-A-S-L-G a molekulovou hmotností 998.19 Da. Biotin-Kemptide má místo pro fosforylaci na hydroxylové skupině aminokyseliny serinu. Biotinylovaný substrát byl zvolen z toho důvodu, aby mohl být fosforylovaný produkt oddělen od reakční směsi pomocí specifické interakce se streptavidinem. To je zajištěno použitím tištěným tříelektrodových senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (DRP-110STR) nebo magnetickými částicemi modifikovanými streptavidinem Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Jako donor fosfátové skupiny je použit ATP-S (adenosin 5'-[γ -thio]trifosfát tetralithná sůl), ten byl zvolen z toho důvodu, aby bylo možné v posledním kroku experimentu zachytit detekční zlaté nanočástice vazbou na síru, která se nachází v molekule ATP-S. AuNPs spontánně reagují s thiolovou skupinou fosfátové skupiny přenesené na substrát. Navázané AuNPs lze následně elektrochemicky detekovat pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV).

Pro elektrochemickou detekci bylo zapotřebí vybrat vhodné elektrody, vhodnou velikost detekčních zlatých nanočástic a optimalizovat podmínky pro detekci a reakční podmínky enzymatické reakce. Následně bylo zkoušeno experimentální stanovení kinetických parametrů enzymové reakce pro solubilní a imobilizovanou formu enzymu a hodnotilo se, jestli bude metoda vhodná a efektivní.

Pro ověření detekce fosforylace peptidového substrátu solubilní a imobilizovanou proteinkinázou A elektrochemickou metodou square-wave voltametrie byly vzorky také analyzovány na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL. Hmotnostní spektrometrie se standardně používá, neboť je možné detekovat fosforylovaný nízkomolekulární substrát enzymu a rozlišit jej od nefosforylované formy.

4.1. Elektrochemická detekce zlatých nanočástic na vybraných tištěných tříelektrodových senzorech

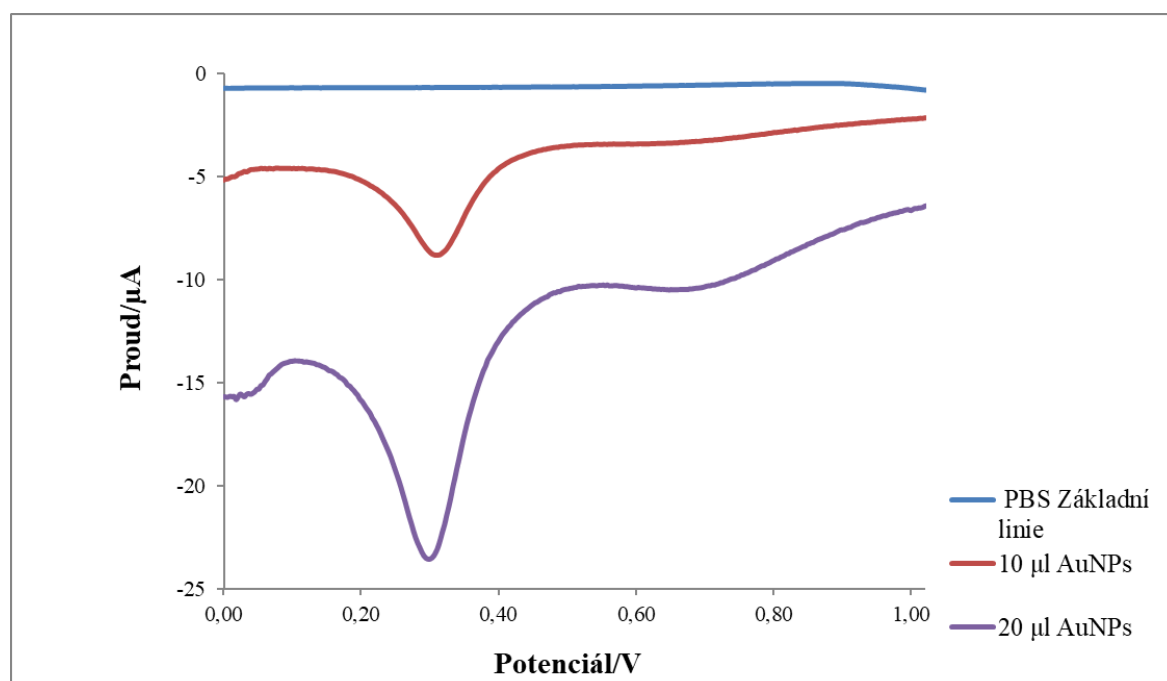
Pro elektrochemickou detekci zlatých nanočástic byly použity tři typy tištěných tříelektrodových senzorů: DRP-C110 (Metrohm DropSens, Švýcarsko) s uhlíkovou pracovní elektrodou, argentschloridovou referenční elektrodou a pomocnou uhlíkovou elektrodou. Dále DRP-110STR (Metrohm DropSens, Švýcarsko) s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem, argentschloridovou referenční elektrodou a pomocnou uhlíkovou elektrodou a SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou,

argentchloridovou referentní elektrodou a pomocnou diamantovou elektrodou (Ústav fotoniky a elektroniky, Slovenská technická Univerzita v Bratislavě, Slovensko). Tištěný tříelektrodový senzor s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (DRP-110STR) byl zvolen z důvodu specifické interakce s biotinylovaným substrátem biotin-streptavidin. Pro práci byla použita elektrochemická metoda square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie pro detekci zlatých nanočástic (AuNPs), resp. komplexu zlatých iontů po rozpuštění AuNPs v kyselém prostředí.

Podmínky zavedené v předchozí práci, byly použity pro první testy elektrod a zlatých nanočástic uvedených v této kapitole 4.1. Pro další práci musely být podmínky optimalizovány pro získání lepších výsledků s námi zvolenými elektrodami. Měnily se původní podmínky depozičního potenciálu a depozičního času. Nejvhodnější optimalizované podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.

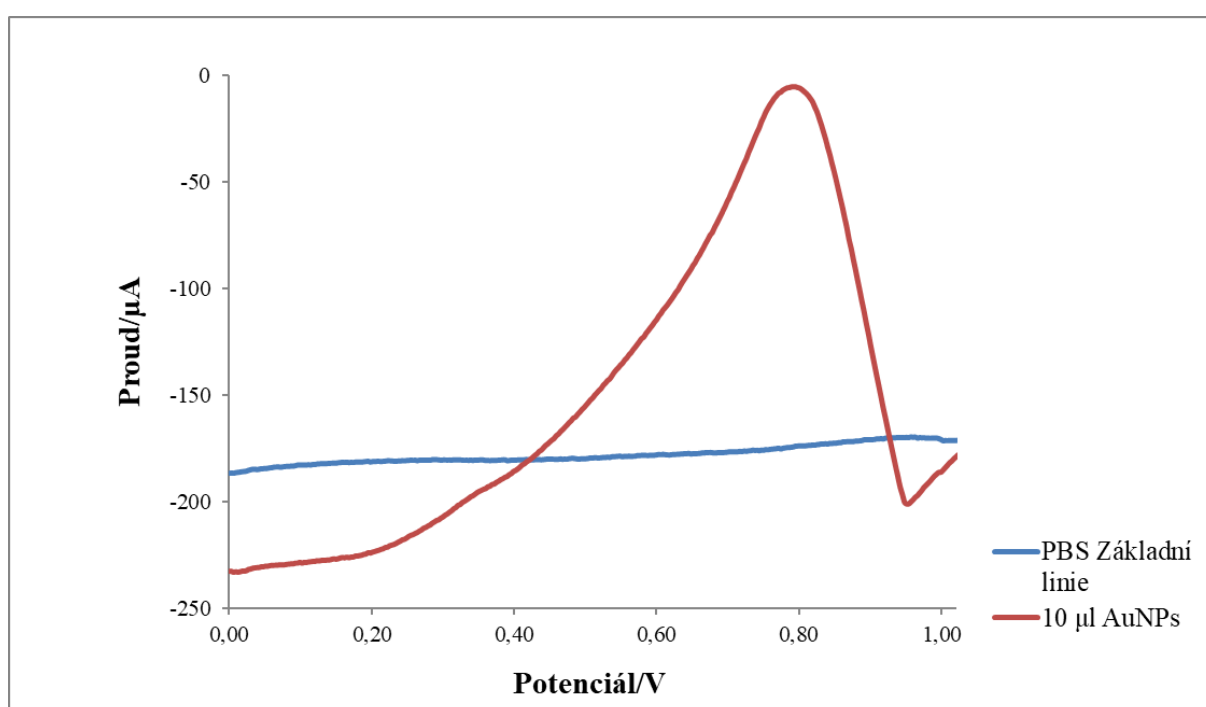
Detekce zlatých nanočástic je založena na monitorování signálu tetrachlorzlatitých iontů, které vzniknou působením kyseliny chlorovodíkové (0,1 M HCl). Jako signál je odečítána proudová odezva při potenciálu odpovídajícímu maximu píku (+0,35 V).

Nejprve byla analyzována různá množství nanočástic o velikosti 20 nm, kde s rostoucím množstvím částic bylo dosaženo vyšší proudové odezvy (pro 10 μl -4,79 μA a 20 μl -11,32 μA). Výsledky měřené na elektrodách DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou jsou zobrazeny v Grafu 1.

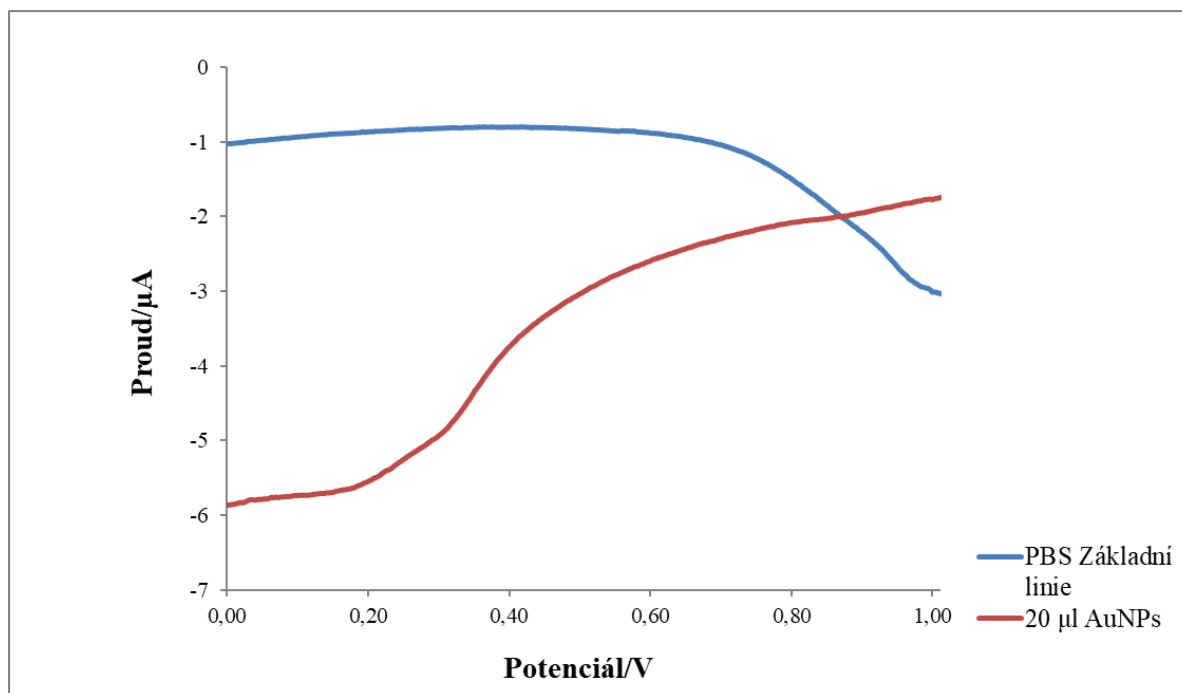


Graf 1: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (10 a 20 μl) na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-C110

U elektrody DRP-110STR s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (Graf 2) a u elektrody SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (Graf 3) nebyl zaznamenán charakteristický pík. Charakteristický pík nebyl detekován ani při opakovaném měření. Elektrody DRP-110STR nejsou pro tuto detekci vhodné. Mohlo to být způsobeno i tím, že elektrody byly po expiraci uvedené výrobcem. Z dalšího testování byly vyřazeny a hledaly se alternativní možnosti izolace biotinylovaného substrátu, jako je izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem. Pro elektrody SP-BDDE jsme měly informaci od výrobce, že zlaté nanočástice na nich lze stanovit. Proto jsme u těchto elektrod přistoupili k optimalizaci detekčních podmínek.



Graf 2: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (10 μl) na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-110STR



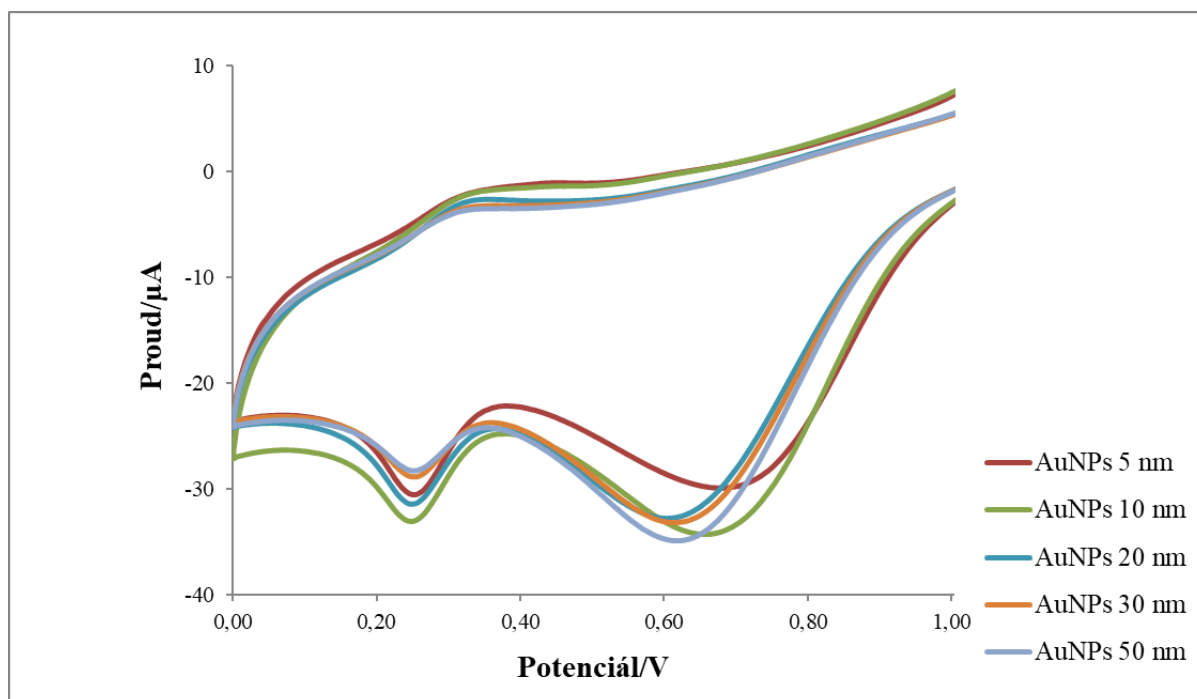
Graf 3: Square-wave voltamogram 20 nm AuNPs (20 μ l) na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

4.2. Optimalizace podmínek elektrochemické detekce zlatých nanočástic

Pro experimenty byly vybrány zlaté nanočástice (AuNPs) různých velikostí (5, 10, 20, 30 a 50 nm). Vybrané zlaté nanočástice byly nejdříve testovány pomocí cyklické voltametrie. Cyklická voltametrie se při optimalizaci používala, aby byly získány informace o celém průběhu elektrodového děje oxidace-redukce.

Měření probíhalo za podmínek uvedených v kapitole 3.4.1. na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou a SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou. Postup měření detekčních zlatých nanočástic je uveden v kapitole 3.4.2. Proudová odezva odečítána při potenciálu odpovídajícímu maximu píku (+0,35 V).

Pík měl charakteristický tvar u AuNPs o velikosti 5, 10 a 20 nm na elektrodách DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 4 a proudové odezvy v Tabulce 4.

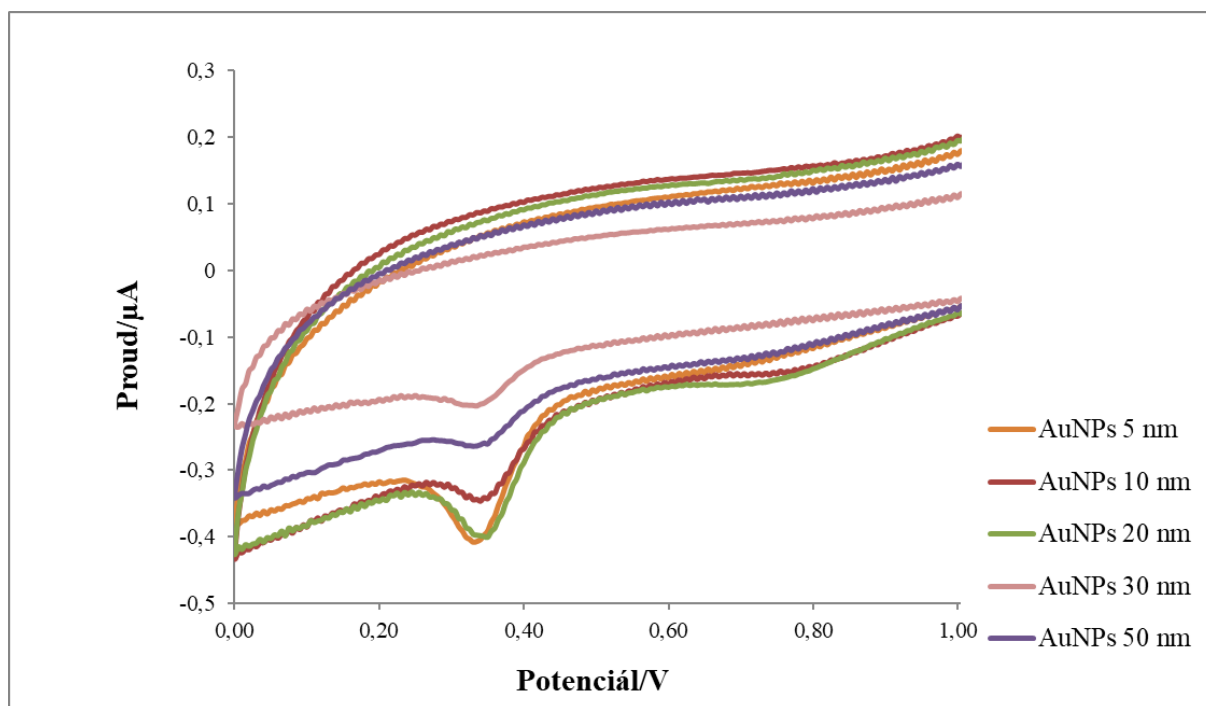


Graf 4: Cyklický voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-C110

Tabulka 4: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na DRP-C110 elektrodách cyklická voltametrie

AuNPs	E/V	I/μA
5 nm	0,25	-7,92
10 nm	0,25	-7,61
20 nm	0,25	-7,27
30 nm	0,25	-5,25
50 nm	0,25	-4,30

Pík měl charakteristický tvar u AuNPs o velikosti 5, 10 a 20 nm na elektrodách SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 5 a proudové odezvy v Tabulce 5.



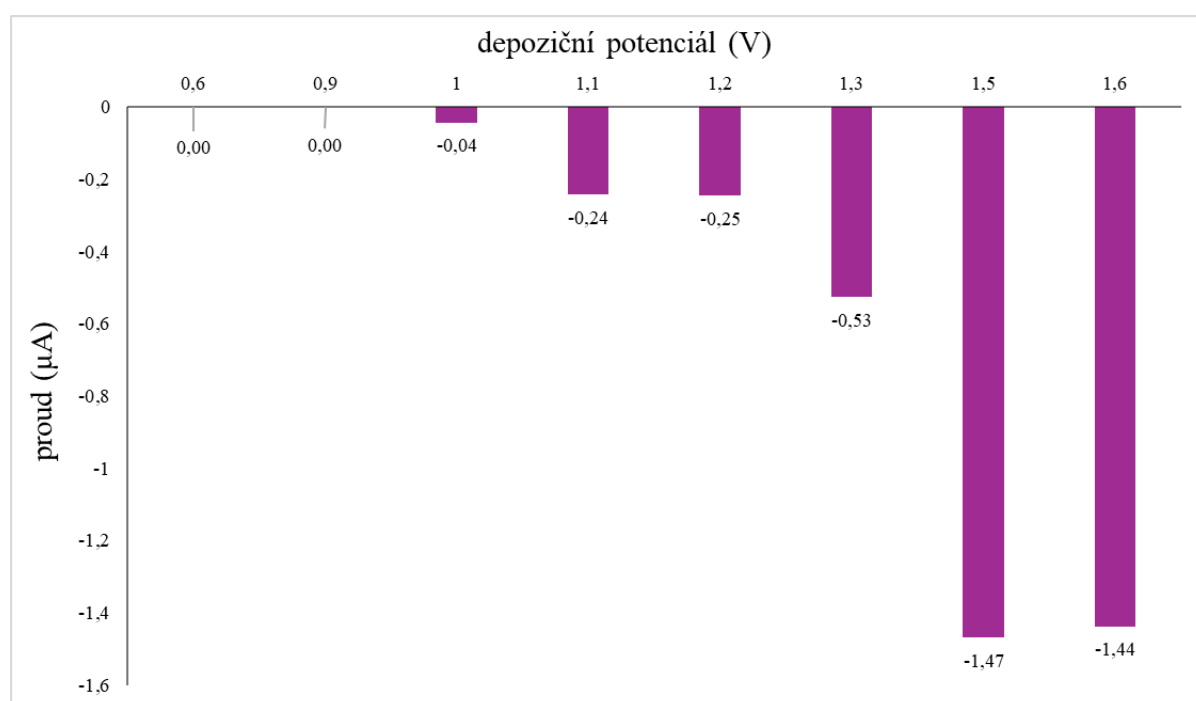
Graf 5: Cyklický voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

Tabulka 5: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na SP-BDDE elektrodách cyklická voltametrie

AuNPs	E/V	I/μA
5 nm	0,33	-0,16
10 nm	0,35	-0,08
20 nm	0,35	-0,13
30 nm	0,33	-0,05
50 nm	0,35	-0,04

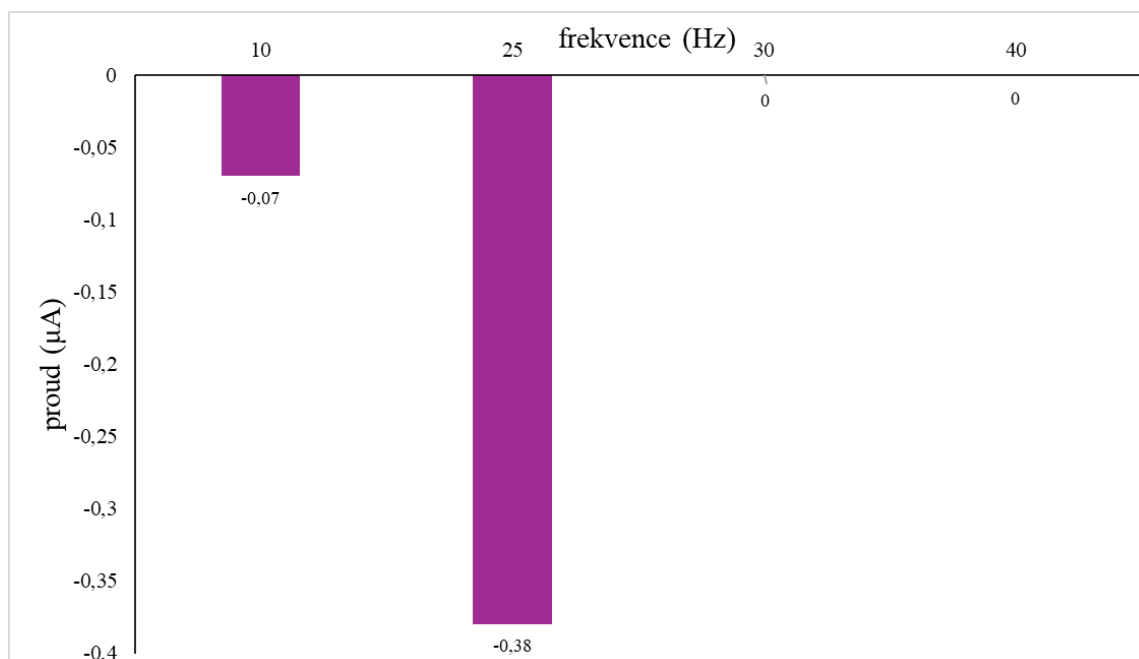
V dalších experimentech byly pro měření square-wave voltametrií optimalizovány podmínky detekce. Měnily se původní podmínky depozičního času ($t = 180$ s) pro tištěné tříelektrodové senzory DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou. Pro tištěné tříelektrodové senzory SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou se měnily původní podmínky depozičního potenciálu ($E = 1,2$) a depozičního času ($t = 180$ s). Finální optimalizované podmínky pro DRP-C110 a SP-BDDE jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.

Pro optimalizaci depozičního potenciálu byly testovány hodnoty od 0,6 do 1,6 V na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE. Nejvyšší proudová odezva ($-1,47 \mu\text{A}$) byla při depozičním potenciálu 1,5 V (viz Graf 6). Z toho důvodu byl zvolen jako optimální pro další měření.



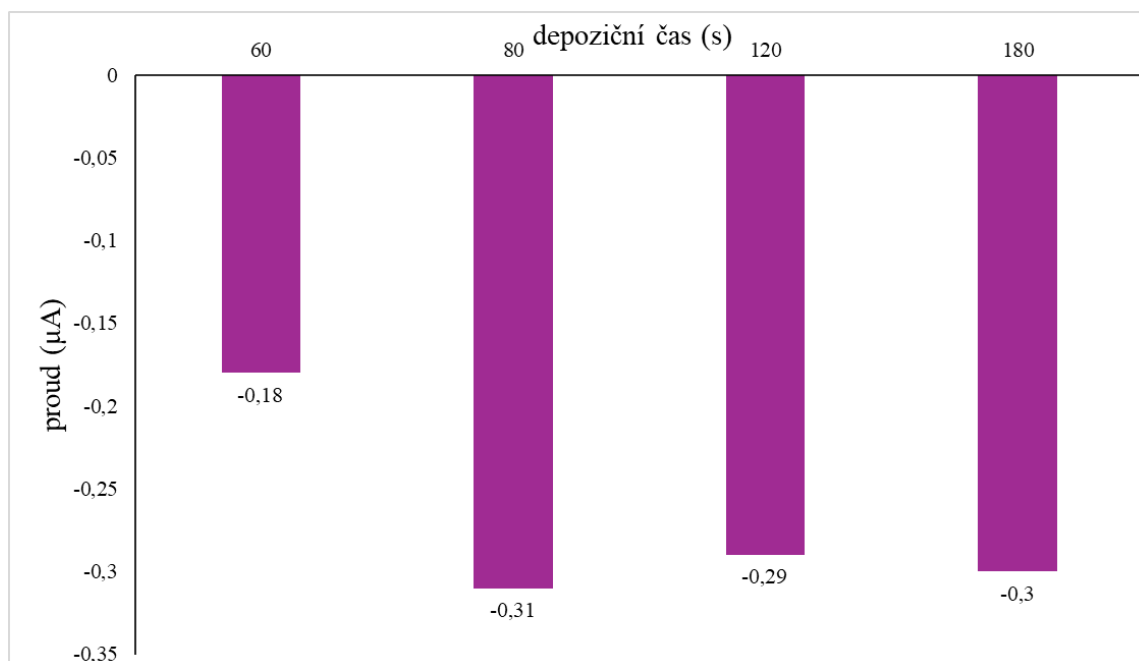
Graf 6: Optimalizace depozičního potenciálu pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

Pro optimalizaci frekvence byly testovány hodnoty od 10 do 40 Hz (viz Graf 7) na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE. Nejvyšší proudová odezva ($-0,38 \mu\text{A}$) byla při frekvenci 25 Hz. Při vyšších hodnotách frekvence nebyl detekován charakteristický pík.



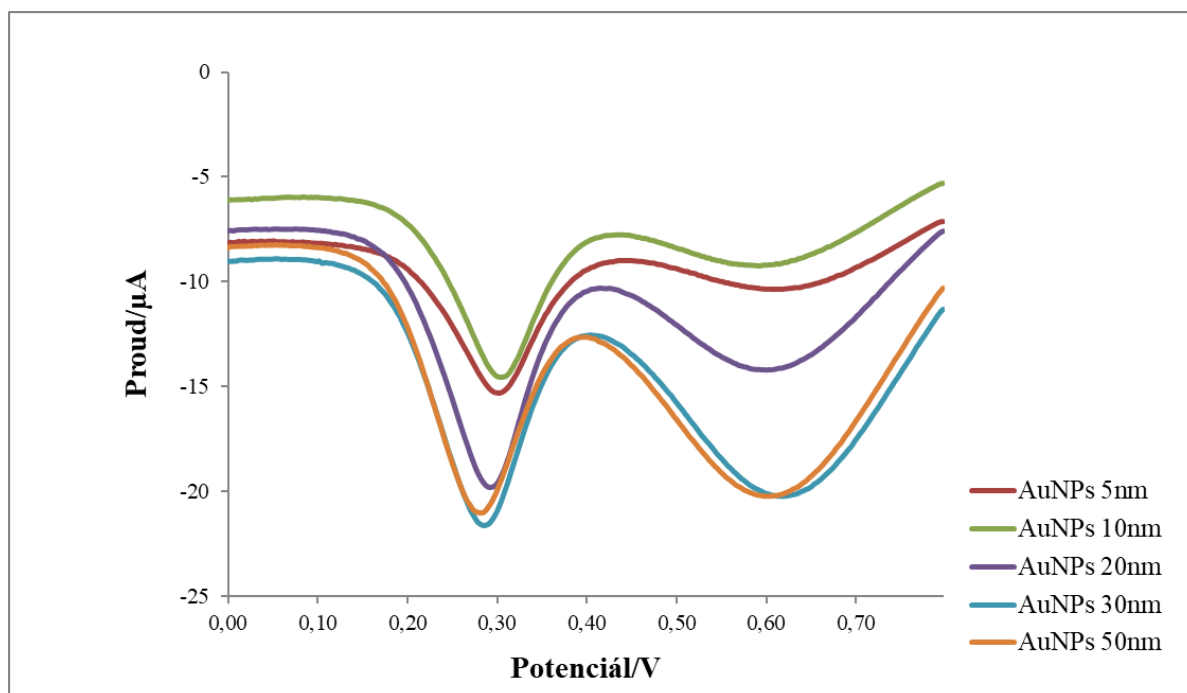
Graf 7: Optimalizace frekvence pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

Pro optimalizaci depozičního času byly testovány hodnoty od 60 do 180 s (viz Graf 8) na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE. Nejvyšší proudová odezva ($-0,31 \mu\text{A}$) byla u depozičního času 80 s.



Graf 8: Optimalizace depozičního času pro měření AuNPs square-wave voltametrií na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

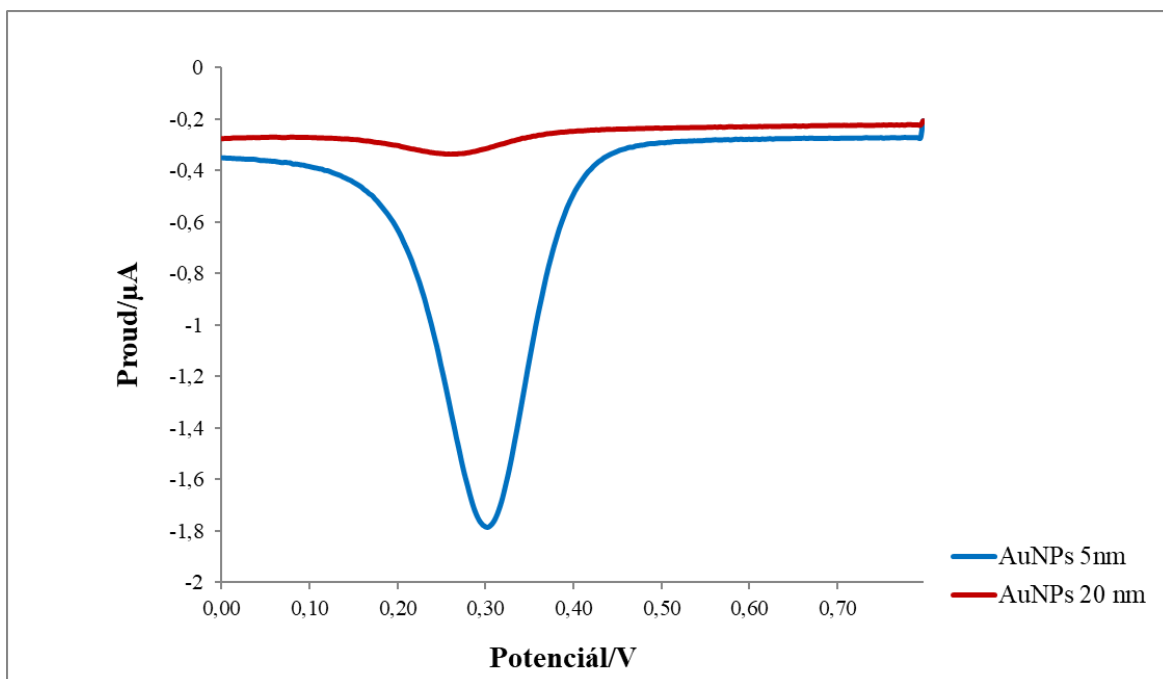
Následně byly za optimalizovaných podmínek změřeny AuNPs různých velikostí square-wave voltametrií na SP-BDDE a DRP-C110 elektrodách a porovnány s původními (Graf 9 a 10). Nejvyšší proudová odezva byla u AuNPs o velikosti 20 nm (-10,64 μA) pro DRP-C110 elektrody (Tabulka 6). Pro SP-BDDE elektrody byla nejvyšší proudová odezva u AuNPs o velikosti 5 nm (-1,47 μA) oproti AuNPs o velikosti 20 nm (-0,08 μA). Po vyhodnocení naměřených hodnot se vybíraly vhodné zlaté nanočástice pro další analýzu.



Graf 9: Square-wave voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-C110

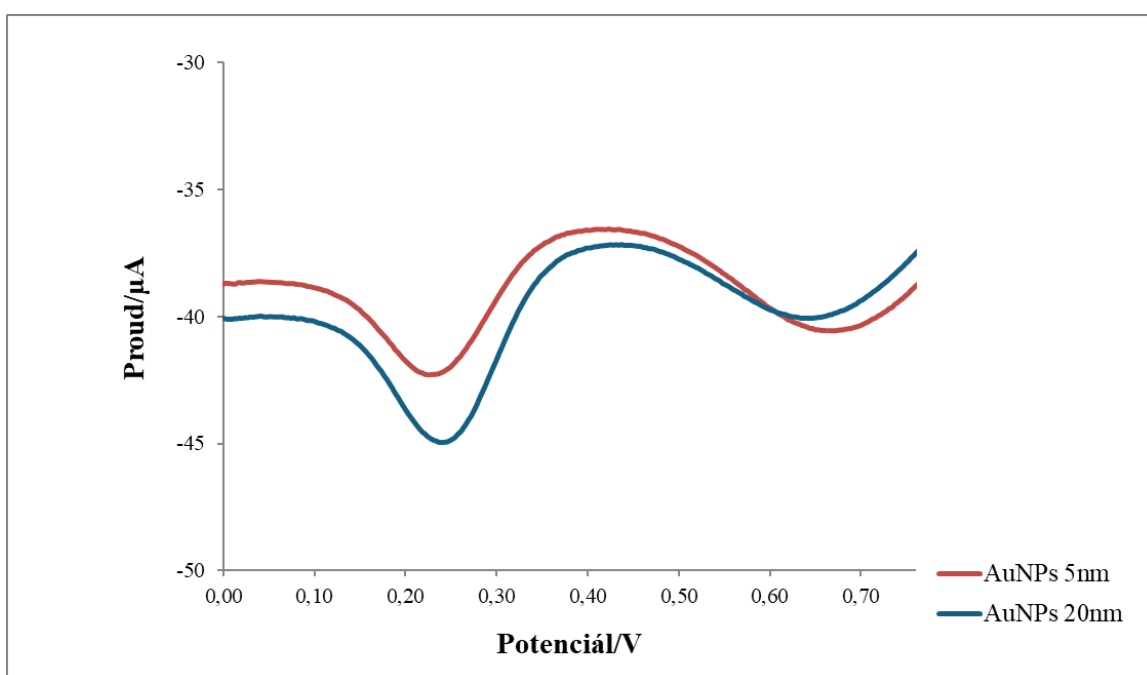
Tabulka 6: Naměřené proudové odezvy AuNPs různých velikostí měřených na DRP-C110 elektrodách SWCSV

AuNPs	E/V	I/ μA
5 nm	0,30	-6,65
10 nm	0,30	-7,53
20 nm	0,29	-10,64
30 nm	0,28	-10,54
50 nm	0,28	-10,19



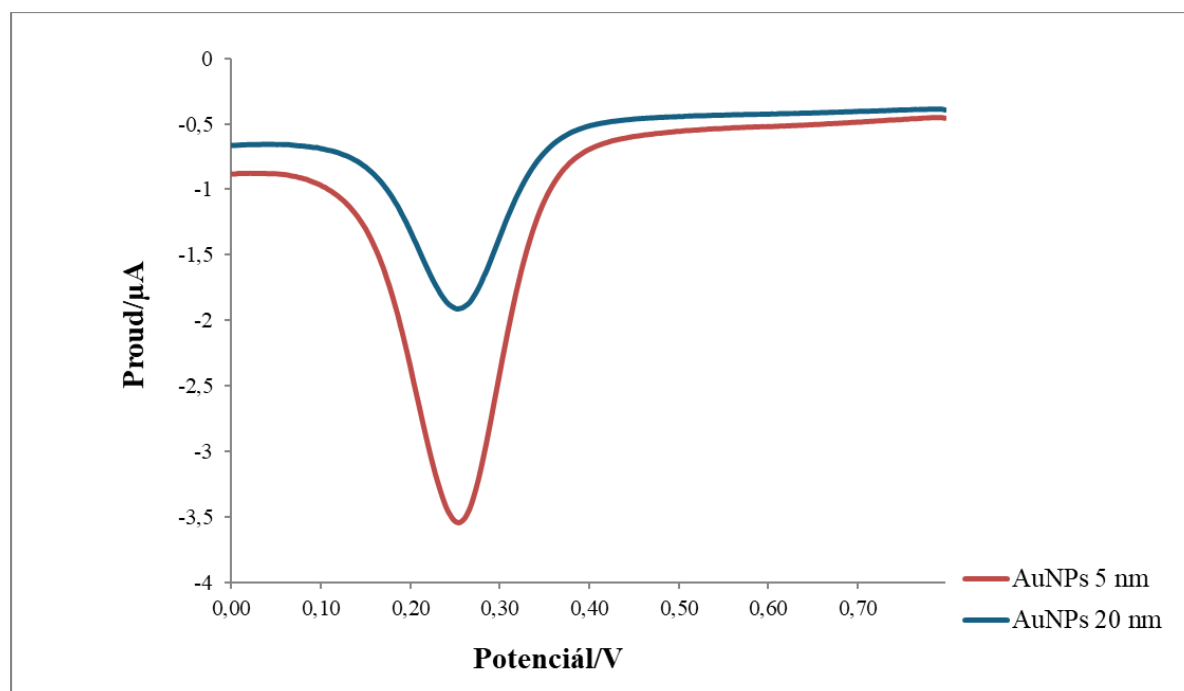
Graf 10: Square-wave voltamogram AuNPs různých velikostí na tištěných tříelektrodových senzorech SP-BDDE

Následně byly za optimalizovaných podmínek změřeny vybrané AuNPs o velikosti 5 a 20 nm pro potvrzení na elektrodách DRP-C110. Nejvyšší proudová odezva byla u AuNPs o velikosti 20 nm (-6,26 μA) oproti AuNPs o velikosti 5 nm (-4,73 μA) na elektrodách DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 11. Finální optimalizované podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.



Graf 11: Square-wave voltamogram za optimalizovaných podmínek na tištěných tříelektrodových senzorech DRP-C110

Za optimalizovaných podmínek byly změřeny vybrané AuNPs o velikosti 5 a 20 nm na elektrodách SP-BDDE pro potvrzení. Nejvyšší proudová odezva byla u AuNPs o velikosti 5 nm (-2,81 μA) oproti AuNPs o velikosti 20 nm (-1,36 μA) na elektrodách SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 12. Finální optimalizované podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.



Graf 12: Square-wave voltamogram za optimalizovaných podmínek na tiskových tříelektrodových senzorech SP-BDDE

Na základě výše uvedených výsledků byly vybrány pro další experimenty částice AuNPs o velikosti 20 nm a elektrody DRP-C110.

4.3. Ověření fosforylace substrátu solubilní a imobilizovanou kinázou

Vzhledem k zavádění metody elektrochemické detekce bylo nezbytné použít i standardní konfirmační metodu, která potvrdila, že používaný enzym proteinkináza A (aktivita > 8 000 000 U/mg, Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo) účinně fosforyluje substrát. Pro standardní systém využívající substrát Kemptide a ATP je fosforylace účinná, jak bylo potvrzeno ve studii Hromádková *et al.* (2018) pro solubilní i imobilizovaný enzym. V mé diplomové práci byl využíván pro elektrochemickou detekci substrát Biotin-Kemptide (o sekvenci biotin-LRRASLG, Abbexa Ltd, Cambridge, UK) a ATP-S (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo), proto bylo nutné potvrdit, že k fosforylaci dochází i s těmito reagensy. Jako standardní konfirmační metoda byla použita hmotnostní

spektrometrie MALDI/MS. Bylo potvrzeno, že je fosforylace substrátu Biotin-Kemptide účinná a byla stanovena míra fosforylace substrátu.

4.3.1. Ověření fosforylace substrátu solubilní kinázou pomocí MALDI/MS

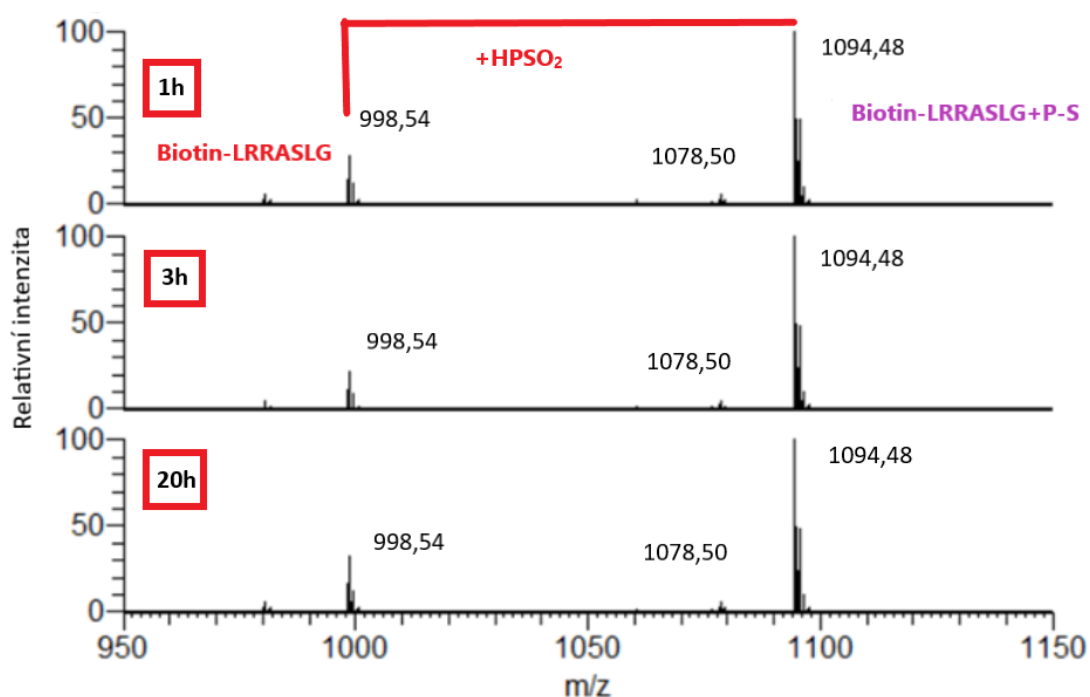
Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1. byla provedena fosforylace peptidového substrátu solubilní proteinkinázou A v 5 různých reakčních směsích. V reakčních směsích se měnilo množství enzymu proteinkinázy A, substrátu Biotin-Kemptide a koenzymu ATP-S. Kombinace množství jednotlivých složek v reakčních směsích jsou uvedeny v Tabulce 7. Fosforylace vzorků probíhala 1, 3 a 20 hodin.

Před analýzou vzorků hmotnostní spektrometrií bylo nutné vzorky odsolit na mikrokolonkách plněných POROS OLIGOTM R3 reverzní fází postupem uvedeným v kapitole 3.5.1. Jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. Analýza vzorků proběhla na hmotnostním spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) v pozitivním módu s rozlišovací schopností 100000 (FWHM u $m/z = 400$). Analýza byla provedena Mgr. Ondřejem Morávkem a byly mi poskytnuty výsledky.

Získaná hmotnostní spektra byla vyhodnocena podle kapitoly 3.5.2. Míra fosforylace substrátu byla vypočítána podle vztahu uvedeného v kapitole 3.5.2. V hmotnostních spektrech byly odečteny relativní intenzity píků a sledován posun m/z odpovídající nefosforylované a fosforylované formě substrátu Biotin-Kemptide.

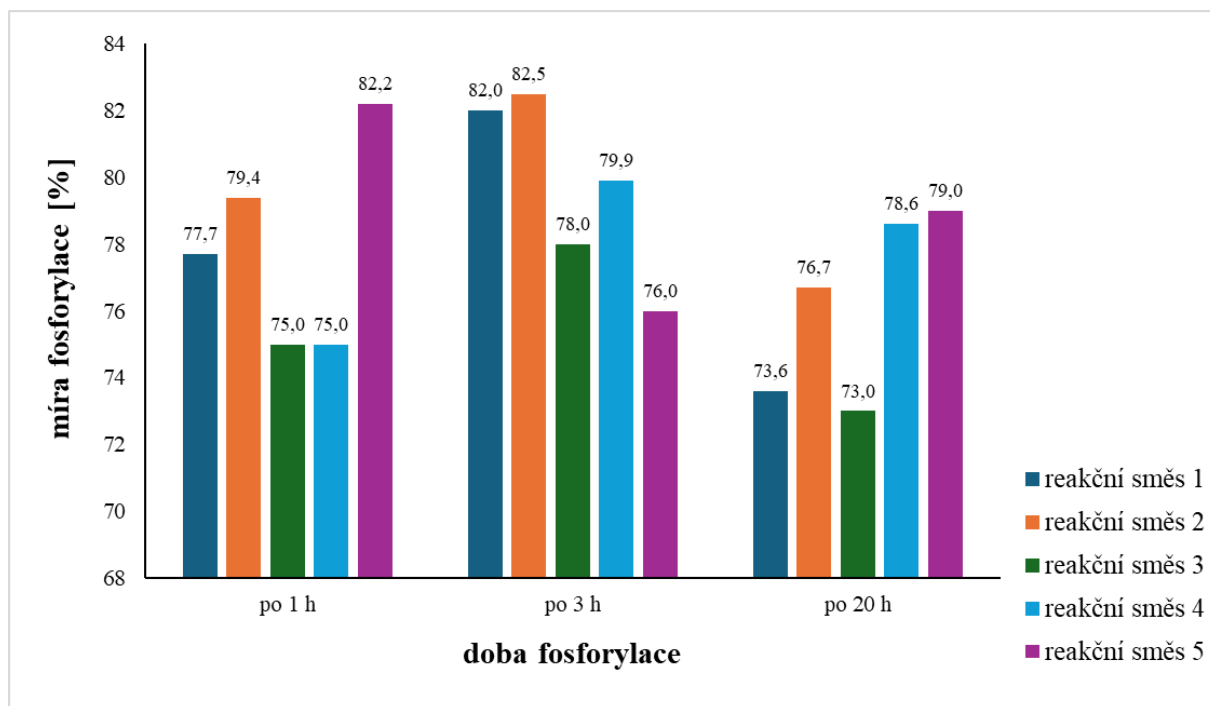
U fosforylované formy dojde v přítomnosti ATP-S k přírůstku $m/z + 96$, vlivem síry přítomné v molekule ATP-S (hmota odpovídá $HPSO_2$). Proto je při použití Biotin-Kemptide pozorován posun z $m/z 998,54$ (nefosforylovaný substrát) na hodnotu $m/z 1094,48$ ($HPSO_2$) v přítomnosti ATP-S (fosforylovaný substrát).

V hmotnostním spektru (viz Graf 13) reakční směsi 2 se zvýšeným množstvím substrátu 15 μg . lze vidět nárůst míry fosforylace substrátu Biotin-Kemptide. Po 1 hodině byla míra fosforylace 79,4 %, po 3 hodinách došlo k mírnému zvýšení míry fosforylace na 82,5 % a po 20 hodinách došlo k mírnému poklesu míry fosforylace na 76,7 %. Reakční směs 2 dosáhla ze všech reakčních směsí nejvyšší míry fosforylace, a to po 3 hodinách inkubace. Hodnocený pík m/z 998,54 patří nefosforylovanému substrátu a pík m/z 1094,48 patří fosforylovanému substrátu.



Graf 13: Hmotnostní spektrum fosforylace substrátu solubilní PKA v čase MALDI/MS

Ve spektru (viz Graf 14) je vidět, že míra fosforylace substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S se už po 1 hodině pohybovala u 5 různých reakčních směsí od 75 – 82,2 %, poté už nedocházelo k významnému zvýšení míry fosforylace. Po 1 hodině byla nejvyšší míra fosforylace 82,2 % pro reakční směs 5 s nejvyšší koncentrací ATP-S 0,75 mM. Po 3 hodinách došlo už jen k mírnému zvýšení míry fosforylace u reakční směsi 1–4 (78 – 82,5 %) a naopak k mírnému poklesu fosforylace u reakční směsi 5 (76 %). Po 20 hodinách došlo jen k mírnému poklesu míry fosforylace, ale hodnoty byly stále vysoké (73–79 %). Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 7.



Graf 14: Porovnání míry fosforylace 5 různých reakčních směsí s různým množstvím solubilní PKA, Biotin-Kemptide a ATP-S MALDI/MS

Tabulka 7: Porovnání míry fosforylace 5 různých reakčních směsí se solubilní PKA

PKA [μg]	Biotin-Kemptide [μg]	ATP-S [mM]		Míra fosforylace (%)			
				po 1 h	po 3 h	po 20 h	% průměr
0,68	10	0,5	reakční směs 1	77,7	82,0	73,6	77,8
0,68	15	0,5	reakční směs 2	79,4	82,5	76,7	79,5
0,68	7,5	0,5	reakční směs 3	75,0	78,0	73,0	75,3
0,75	10	0,5	reakční směs 4	75,0	79,9	78,6	77,8
0,68	10	0,75	reakční směs 5	82,2	76,0	79,0	79,1

Z výsledků vyplývá, že solubilní proteinkináza A je účinná pro fosforylaci substrátu Biotin-Kemptide. Doba fosforylace 1 hodina je dostačující pro vysokou úroveň fosforylace. Celkově nejvyšší míru fosforylace dosáhla po 3 hodinách reakční směs 2 se zvýšeným množstvím substrátu 15 μg. Toto množství substrátu bylo vybráno pro další experimenty.

4.3.2. Imobilizace Proteinkinázy A

Dalším cílem experimentální části práce byla imobilizace enzymu proteinkinázy A, a také zhodnocení aktivity solubilní a imobilizované formy enzymu. Pro enzym byla vybrána imobilizace kovalentní vazbou na magnetické částice karboxylovými funkčními skupinami. Postup imobilizace je popsán v kapitole 3.2. Mezi výhody imobilizace enzymu patří vyšší stabilita, zlepšení aktivity, možnost opakovaného použití a kontrolovaná fosforylace proteinů v *in vitro* proteomických studiích.

Obvykle se účinnost imobilizace enzymu hodnotí metodou SDS-PAGE elektroforézy (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného), ale vzhledem k nízkému množství proteinkinázy A, které je používáno pro imobilizaci, konkrétně 6 µg/1,2 mg částic, to není dostatečně citlivá metoda. Z toho důvodu byla odebrána vazebná frakce po imobilizaci proteinkinázy A na magnetické částice. Vazebná frakce byla zakoncentrována na objem cca 10 µl ve vakuovém koncentrátoru a následně byla provedena fosforylace substrátu. Vzorek vazebné frakce byl analyzován hmotnostní spektrometrií MALDI LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu s rozlišovací schopností 100000 (FWHM u $m/z = 400$), stejně jako všechny ostatní vzorky. Míra fosforylace u vazebné frakce byla zjištěna 3,4 %, ve frakci tedy byla zbytková aktivita proteinkinázy A, která se nenavázala na magnetické částice.

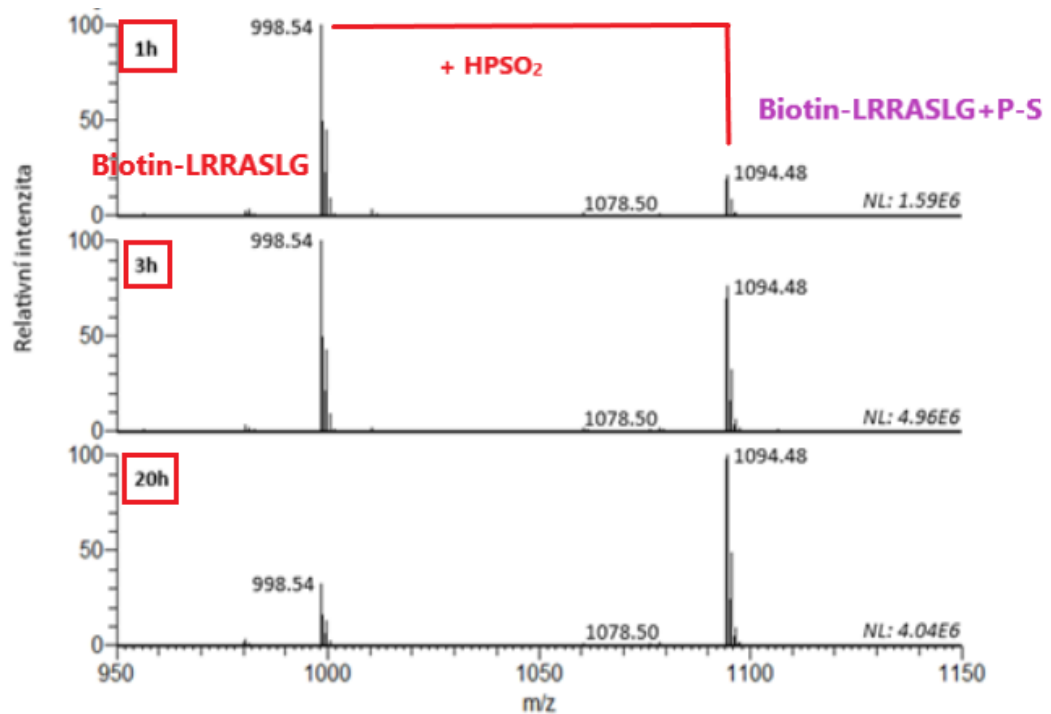
4.3.3. Ověření fosforylace substrátu imobilizovanou kinázou pomocí MALDI/MS

Pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI/MS byla ve dvou měřeních stanovena míra fosforylace nízkomolekulárního substrátu Biotin-Kemptide imobilizovanou proteinkinázou A. Postup imobilizace proteinkinázy A je uveden v kapitole 3.2.

Pro první měření byla fosforylace provedena imobilizovanou proteinkinázou A podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Imobilizovaná PKA na magnetických částicích Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovou funkční skupinou (Seradyn Inc., Indianapolis, Indiana, USA) v množství částic odpovídající množství enzymu 2 µg byla smíchána do reakční směsi s 10 µg substrátu Biotin-Kemptide a 0,5 mM ATP-S. Fosforylace vzorků probíhala 1, 3 a 20 hodin.

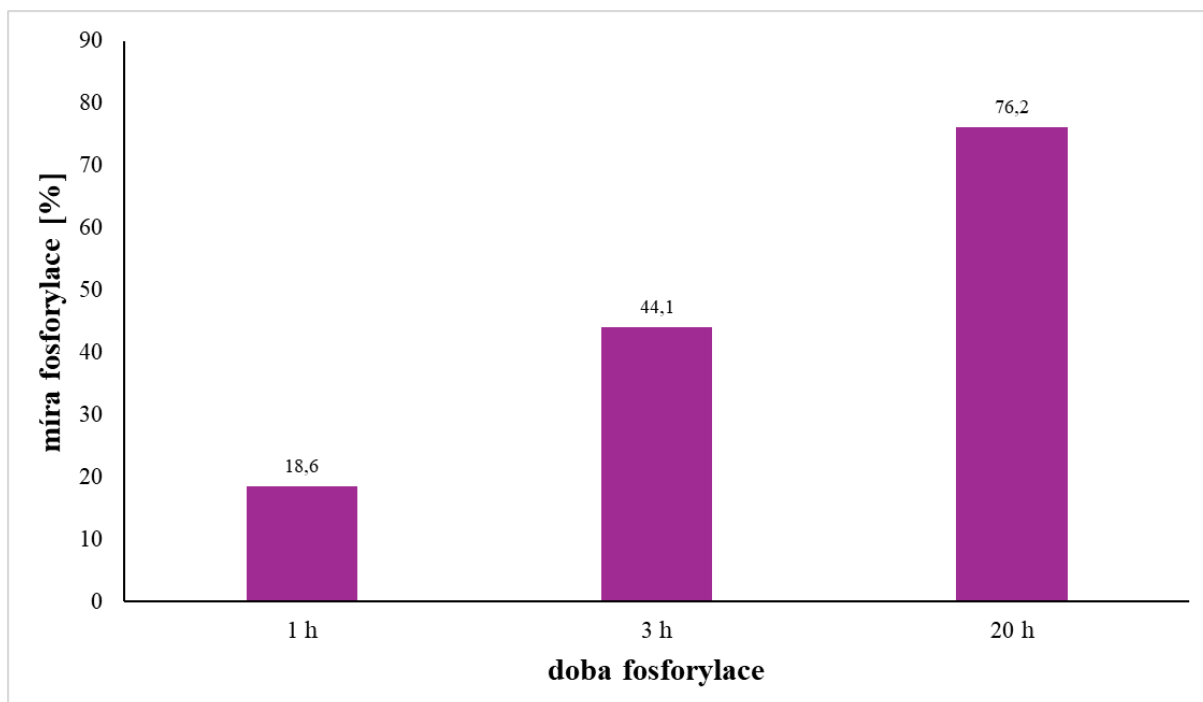
Získaná hmotnostní spektra byla vyhodnocena podle kapitoly 3.5.2. V hmotnostních spektrech byly odečteny relativní intenzity píků a sledován posun m/z odpovídající nefosforylované a fosforylované formě substrátu Biotin-Kemptide.

V hmotnostním spektru (viz Graf 15) lze vidět postupný nárůst míry fosforylace substrátu Biotin-Kemptide. Míra fosforylace se v průběhu času zdvojnásobovala. Hodnocený pík m/z 998,54 patří nefosforylovanému substrátu a pík m/z 1094,48 patří fosforylovanému substrátu.



Graf 15: Hmotnostní spektrum fosforylace substrátu Biotin-Kemptide imobilizovanou PKA s ATP-S v čase MALDI/MS

Na Grafu 16 je patrná zvyšující se míra fosforylace substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S v průběhu času. Po 1 hodině inkubace byla míra fosforylace substrátu 18,6 %. Po uplynutí 3 hodin se míra fosforylace substrátu zvýšila na 44,1 %. Následně po 20 hodinách dosahovala míra fosforylace peptidového substrátu Biotin-Kemptide 76,2 %.

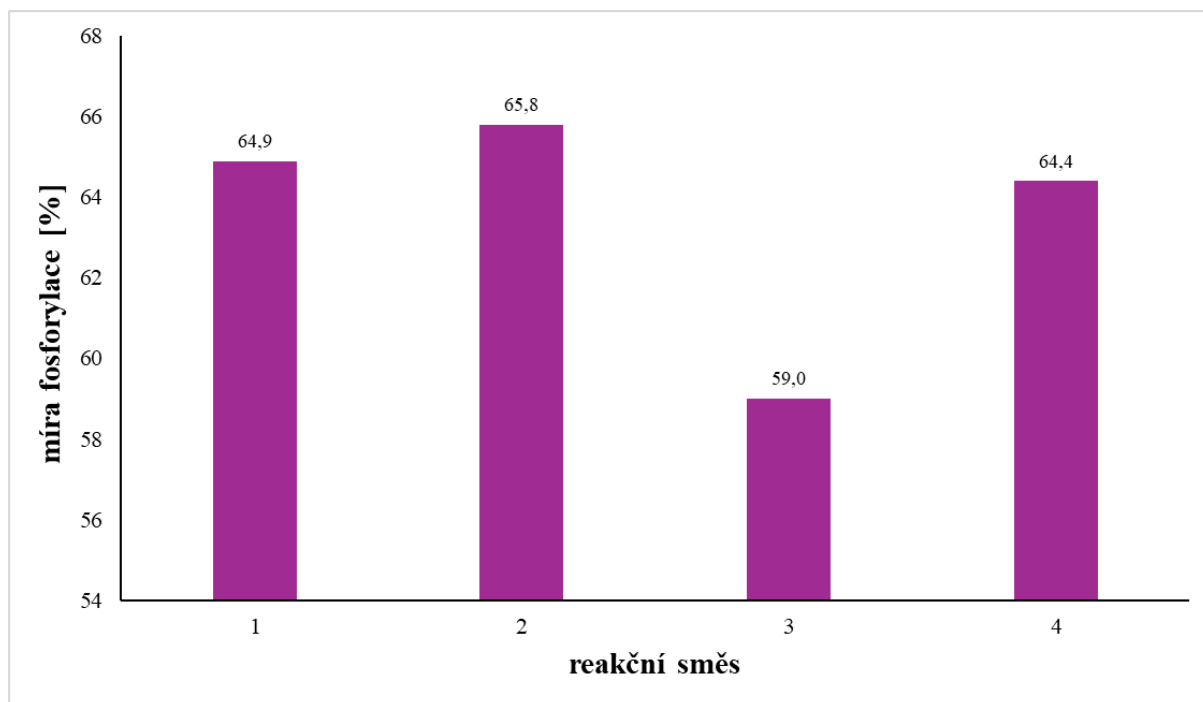


Graf 16: Porovnání míry fosforylace substrátu Biotin-Kemptide imobilizovanou PKA s ATP-S v čase MALDI/MS

Z výsledků vyplývá, že proteinkináza A imobilizovaná na magnetických částicích Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovými funkčními skupinami je účinná pro fosforylaci substrátu Biotin-Kemptide. Nejvyšší úroveň fosforylace měla doba fosforylace 20 hodin. Pro elektrochemickou detekci jsme chtěli využít dobu fosforylace kratší než 20 hodin, z toho důvodu byla vyzkoušena fosforylace 5 hodin a upraveny poměry substrátu Biotin-Kemptide a ATP-S.

Při druhém měření proběhla fosforylace peptidového substrátu imobilizovanou proteinkinázou A opět podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Imobilizovaná PKA na magnetických částicích Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovou funkční skupinou (Seradyn Inc., Indianapolis, Indiana, USA) v množství částic odpovídající množství enzymu 1,5 µg byla smíchána do 4 různých reakčních směsí se substrátem Biotin-Kemptide a koenzymem ATP-S. V reakčních směších se měnilo množství substrátu a ATP-S, jejich kombinace jsou uvedeny v Tabulce 8. Fosforylace probíhala 5 hodin.

Na Grafu 17 je vidět, že míra fosforylace substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S se při době fosforylace 5 hodin pohybovala u 4 různých reakčních směsí okolo 59-65,8 %. Míra fosforylace substrátu byla u všech čtyřech reakčních směsí podobná. Nejvyšší míru fosforylace měla reakční směs 2 (65,8 %), kde bylo 15 μg substrátu Biotin-Kemptide a 0,75 mM ATP-S.



Graf 17: Porovnání míry fosforylace různých reakčních směsí substrátu Biotin-Kemptide s ATP-S a imobilizovanou PKA MALDI/MS

Tabulka 8: Porovnání míry fosforylace různých reakčních směsí s imobilizovanou PKA

PKA [μg]	Biotin-Kemptide [μg]	ATP-S [mM]		Míra fosforylace po 5 hod (%)
1,5	15	0,5	reakční směs 1	64,9
1,5	15	0,75	reakční směs 2	65,8
1,5	10	0,5	reakční směs 3	59,0
1,5	10	0,75	reakční směs 4	64,4

Z výsledků je patrné, že proteinkináza A imobilizovaná na magnetických částicích Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovými funkčními skupinami je opět účinná pro fosforylaci substrátu Biotin-Kemptide. Doba fosforylace 5 hodin byla pro další experimenty zvolena jako dostatečná, přestože delší doba vede k nárůstu úrovně fosforylace.

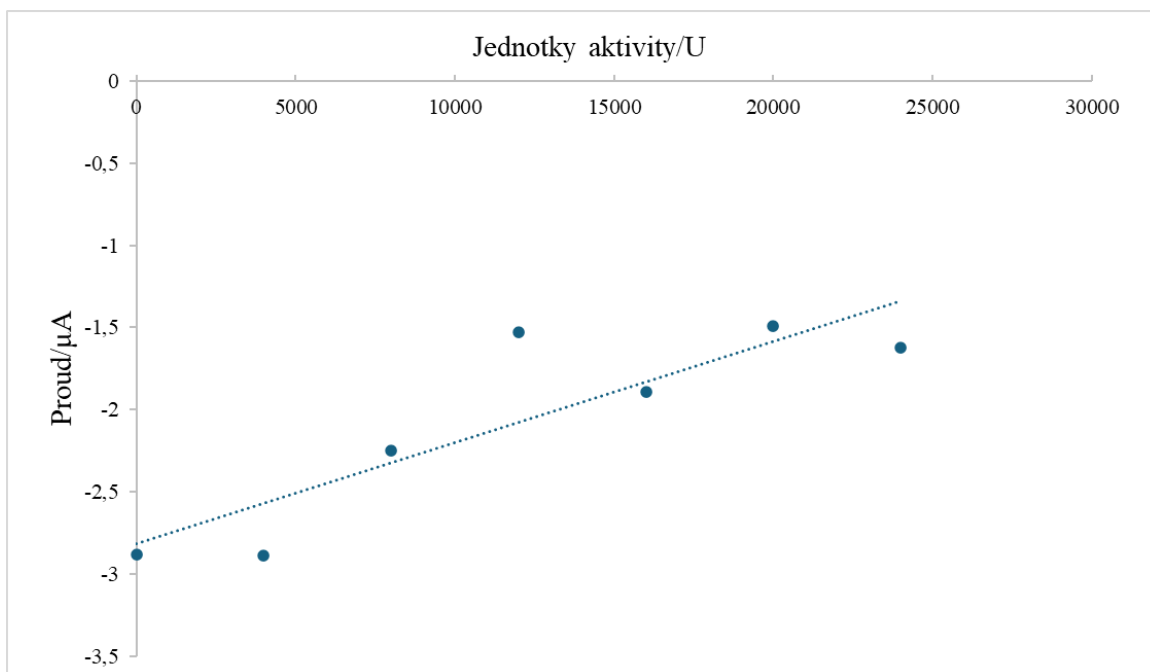
4.4. Stanovení aktivity Proteinkinázy A elektrochemicky

Pro stanovení aktivity solubilní a imobilizované proteinkinázy A elektrochemicky byly vyzkoušeny dva postupy izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem. Při prvním se nejdříve vážou AuNPs v citrátovém pufru na fosforylovaný substrát Biotin-Kemptide. Poté dochází k vazbě na magnetické částice Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, kdy se na sebe naváže streptavidin-biotin. Druhým postupem se nejdříve váže fosforylovaný substrát Biotin-Kemptide na magnetické částice se streptavidinem Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Následně byly na fosforylovaný substrát Biotin-Kemptide navázány AuNPs v citrátovém pufru. Oba Postupy jsou popsány v kapitole 3.4.3.

Pro měření byly vybrány magnetické částice modifikované streptavidinem Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (o velikosti 1 μm , Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva) a Dynabeads^R M-270 Streptavidin (o velikosti 2,7 μm , Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB Vilnius, Litva). Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3. s dobou fosforylace 1 a 5 hodin. Bylo použito množství 1 μg solubilní PKA pro fosforylační reakci.

4.4.1. Kalibrace solubilní proteinkinázy A elektrochemickou detekcí

Pro kalibraci elektrochemické detekce a stanovení aktivity proteinkinázy A se změřila kalibrační řada různých koncentrací enzymu. Analýza byla dvakrát zopakována a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Kalibrační závislost proudové odezvy PKA na jednotkách aktivity PKA je vynesena v Grafu 16. Fosforylace peptidového substrátu Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S byla provedena podle postupu v kapitole 3.3.1. s dobou fosforylace 1 hodina. Měření kalibrace probíhalo podle prvního postupu popsaného v kapitole 3.4.3. Kalibrační závislost solubilní PKA byla v rozmezí 0-24000 U enzymu. K enzymu bylo vždy přidáno 15 μg substrátu Biotin-Kemptide a 0,5 mM ATP-S. I když se analýza opakovala dvakrát, nebyly získány výsledky, ze kterých by šla sestavit kalibrační křivka. Trend kalibrační křivky by měl být klesající, protože proudové odezvy jsou záporné (viz Graf 18).



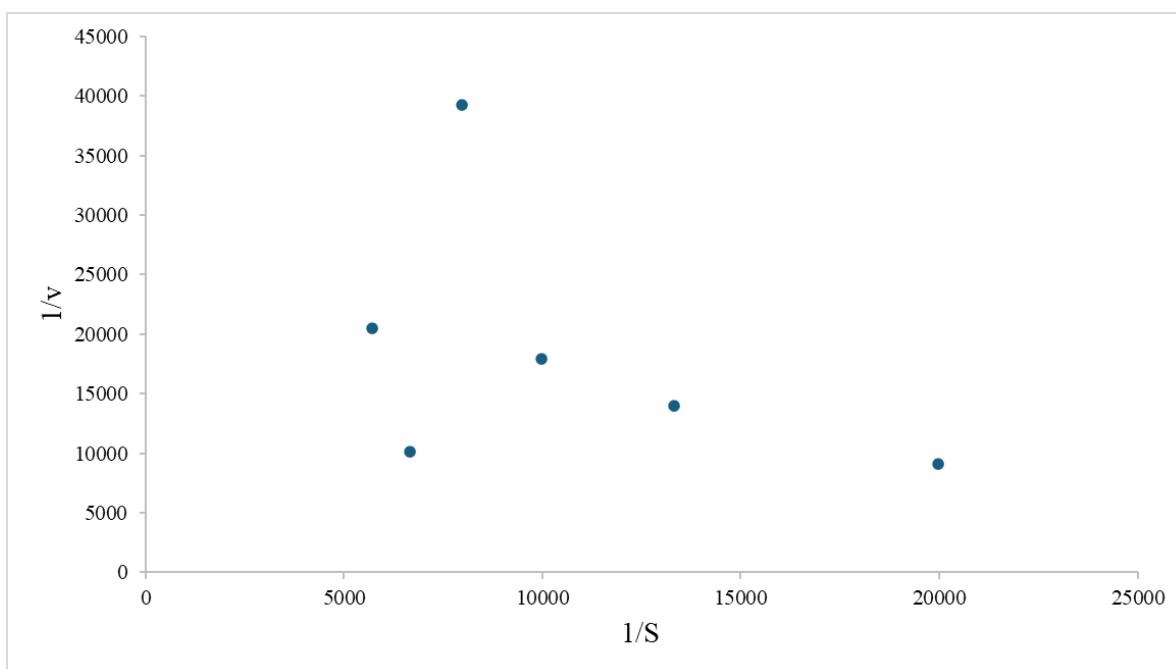
Graf 18: Kalibrace solubilní proteinkinázy A měřená elektrochemicky square-wave voltametrií

4.5. Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce – solubilní a imobilizovaná kinázy

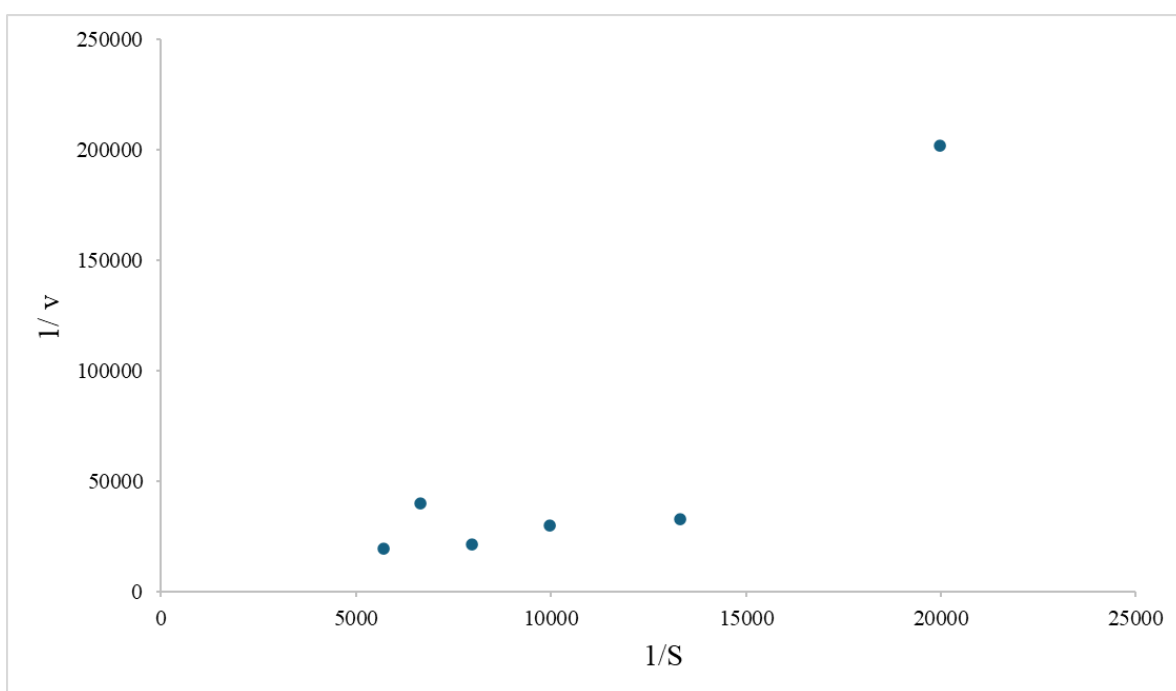
Pro stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A elektrochemicky byl pro izolaci fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem použit první postup popsáný v kapitole 3.4.3. Fosforylace peptidového substrátu proteinkinázou A byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1. pro solubilní enzym a v kapitole 3.3.2. pro imobilizovaný enzym s dobou fosforylace 1 a 5 hodin.

Jedním z cílů mé diplomové práce byla snaha o charakterizaci imobilizované proteinkinázy A z pohledu kinetických parametrů, tedy pro experimentální stanovení Michaelisovy konstanty (K_M) a mezní rychlosti (v_{max}). Cílem bylo porovnat imobilizovaný a solubilní enzym.

Trend křivek kinetických parametrů pro solubilní a imobilizovanou proteinkinázu A nebylo možné vyhodnotit (viz Graf 19 a 20). V tomto uspořádání se nepodařilo elektrochemicky kinetické parametry stanovit. V odborných studiích jsou i další přístupy pro stanovení kinetických parametrů např. Kerman, Chikae *et al.* (2007). V další práci se proto budou zkoušet další možnosti uspořádání, případně stejné uspořádání, ale s úpravou parametrů a podmínek fosforylace.



Graf 19: Kinetické parametry solubilní proteinkinázy A měřené elektrochemicky square-wave voltametrií



Graf 20: Kinetické parametry imobilizované proteinkinázy A měřené elektrochemicky square-wave voltametrií

5 ZÁVĚR

Pro elektrochemickou detekci zlatých nanočástic byly použity tři typy tištěných tříelektrodových senzorů: DRP-C110 (Metrohm DropSens, Švýcarsko), SP-BDDE (Ústav fotoniky a elektroniky, Slovenská technická Univerzita v Bratislavě, Slovensko) a DRP-110STR (Metrohm DropSens, Švýcarsko). Elektroda DRP-110STR byla zvolena z důvodu specifické interakce s biotinylovaným substrátem biotin-streptavidin, ale nakonec nebyla pro tuto detekci vhodná. Z dalšího testování byla vyřazena a byly hledány se alternativní možnosti izolace biotinylovaného substrátu, jako je izolace fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem. Podmínky zavedené v předchozí práci, byly použity pro první testy elektrod a zlatých nanočástic. Pro další práci byly podmínky optimalizovány pro získání lepších výsledků. Za optimalizovaných podmínek square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV) měly nejvyšší proudovou odezvu AuNPs o velikosti 5 nm na elektrodách SP-BDDE. Na elektrodách DRP-C110 měly nejvyšší proudovou odezvu AuNPs o velikosti 20 nm. Pro další experimenty byla vybrány částice AuNPs o velikosti 20 nm a elektrody DRP-C110.

Vzhledem k zavádění metody elektrochemické detekce byla použita i standardní konfirmační metoda, která potvrdila, že používaný enzym proteinkináza A účinně fosforyloval substrát Biotin-Kemptide v přítomnosti ATP-S. Fosforylace substrátu Biotin-Kemptide byla účinná a byla stanovena míra fosforylace substrátu. Doba fosforylace substrátu 1 hodina pro solubilní proteinkinázu A byla dostačující pro další analýzy. Proteinkináza A imobilizovaná na magnetických částicích Sera-Mag Double SpeedBeads s karboxylovými funkčními skupinami byla také účinná pro fosforylaci substrátu Biotin-Kemptide. U imobilizované proteinkinázy A byla jako nejvhodnější doba fosforylace substrátu stanovena 5 hodin pro další experimenty.

Metodou elektrochemické detekce a izolací fosforylovaného substrátu pomocí magnetických částic modifikovaných streptavidinem byly stanovovány kinetické parametry a kalibrační křivka. I když se analýza opakovala dvakrát, nebyly získány výsledky, ze kterých by šla sestavit kalibrační křivka. Trend křivek kinetických parametrů pro solubilní a imobilizovanou proteinkinázu A nebylo možné vyhodnotit. V tomto uspořádání se nepodařilo elektrochemicky kinetické parametry stanovit. V odborných studiích jsou i další přístupy pro stanovení kinetických parametrů např. Kerman, Chikae *et al.* (2007). V další práci se proto budou zkoušet další možnosti uspořádání, případně stejné uspořádání, ale s úpravou parametrů a podmínek fosforylace.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABDULMALEK, Saadiah A. a YAN, Yunjun. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2022, 16(4), s. 1062-1094. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bbb.2349>.
2. BHATTACHARYA, Sumana; SCHIAVONE, Marc; GOMES, James; BHATTACHARYA, Sanjoy K; TASKEN, Kjetil et al. Cascade of bioreactors in series for conversion of 3-phospho-d-glycerate into d-ribulose-1,5-bisphosphate: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *Journal of Biotechnology*. 2004, 111(2), s. 203-217. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.002>.
3. CHAKRABORTY, Praloy; PO, Sunny S.; YABLUCHANSKIY, Andriy a DASARI, Tarun W. Protein kinase A: A potential marker of sympathovagal imbalance in heart failure. *Life Sciences*. 2023, 331, 122069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122069>.
4. CHANG, Yong; GAO, Fengli; WU, Tong; PAN, Qiuzhi; LIU, Lin et al. Electrochemical detection of protein kinases with methylene blue-functionalized Zr-based metal-organic frameworks as signal labels. *International Journal of Electrochemical Science*. 2023, 18(11), s. 3335-3339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100338>.
5. CHEN, Chun-Teh; MARTIN-MARTINEZ, Francisco J.; JUNG, Gang Seob a BUEHLER, Markus J. Polydopamine and eumelanin molecular structures investigated with ab initio calculations. *Chemical Science*. 2017, 8(2), s. 1631-1641. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6SC04692D>.
6. CHENG, Cecilia Y.; YANG, Jie; TAYLOR, Susan S.; BLUMENTHAL, Donald K.; MURATA, Masaharu et al. Sensing Domain Dynamics in Protein Kinase A-I α Complexes by Solution X-ray Scattering. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(51), s. 35916-35925. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059493>.
7. DEANE, Dalton T.; COPE, Thomas A.; SCHULZ, Anna M.; BENNETT, Edward T. a HUGHES, Robert M. Design, Heterologous Expression, and Application of an Immobilized Protein Kinase. *Bioconjugate Chemistry*. 2023, 34(1), s. 204-211. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00485>.

8. GAO, F., MA, G. Effects of Microenvironment on Supported Enzymes. *Topics in Catalysis*. 2012, 55(16-18). 2012, 9902-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11244-012-9902-3>.
9. GAJESWSKI-KURDZIEL, Paula A.; WALSH, Allison E. a BLAKELY, Randy D. Functional and pathological consequences of being fast on the uptake: Protein kinase G and p38 α MAPK regulation of serotonin transporters. *Current Research in Physiology*. 2024, 7, 100117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.crphys.2024.100117>.
10. GASIC, Slavisa; NAGAMANI, Manubi; GREEN, Allan; URBAN, Randall J.; TASKEN, Kjetil et al. Troglitazone is a competitive inhibitor of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme in the ovary: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001, 184(4), s. 575-579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1067/mob.2001.111242>.
11. GOEL, Hira Lal a MERCURIO, Arthur M. VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*. 2013, 13(12), s. 871-882. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrc3627>.
12. GUL, Anam Rana; BAL, Jyotiranjana; XU, Ping; GHOSH, Subhadeep; YUN, Taehyun et al. Serodiagnosis of multiple cancers using an extracellular protein kinase A autoantibody-based lateral flow platform. *Biosensors and Bioelectronics*. 2024, 246, 115902. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115902>.
13. HAN, Juan; WANG, Li; WANG, Yun; DONG, Jian; TANG, Xu et al. Preparation and characterization of Fe₃O₄-NH₂@4-arm-PEG-NH₂, a novel magnetic four-arm polymer-nanoparticle composite for cellulase immobilization: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, 130(4), s. 90-98. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.11.008>.
14. HERBERG, Friedrich W; MALESZKA, Ariane; EIDE, Turid; VOSSEBEIN, Lutz; TASKEN, Kjetil et al. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *Journal of Molecular Biology*. 2000, 298(2), s. 329-339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3662>.
15. HERENG, Tuva H.; BACKE, Paul H.; KAHMANN, Jan; SCHEICH, Christoph; BJØRÅS, Magnar et al. Structure and function of the human sperm-specific isoform of protein kinase A (PKA) catalytic subunit C α 2. *Journal of Structural Biology*. 2012, 178(3), s. 300-310. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.03.013>.

16. HROMADKOVA, Lenka; KUPCIK, Rudolf; VAJRYCHOVA, Marie; PRIKRYL, Petr; CHARVATOVA, Andrea et al. Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *The Analyst*. 2018, 143(2), s. 466-474. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7AN01508A>.
17. JI, Ji; YANG, Hui; LIU, Yun; CHEN, Hui; KONG, Jilie et al. TiO₂-assisted silver enhanced biosensor for kinase activity profiling. *Chemical Communications*. 2009, 12, 820738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b820738k>.
18. JIANG, Xu; QIN, Yi; WANG, Xuchao; XIONG, Zhili; ZHAO, Longshan et al. Enzyme immobilized on magnetic fluorescent bifunctional nanoparticles for α -glucosidase inhibitors virtual screening from *Agrimonia pilosa* Ledeb extracts accompanied with molecular modeling: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *Journal of Chromatography A*. 2023, 1711(4), s. 90-98. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464433>.
19. KERMAN, Kagan; CHIKAE, Miyuki; YAMAMURA, Shohei a TAMIYA, Eiichi. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 588(1), s. 26-33. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.001>.
20. KERMAN, Kagan a KRAATZ, Heinz-Bernhard. Electrochemical detection of kinase-catalyzed thiophosphorylation using gold nanoparticles. *Chemical Communications*. 2007, (47), 5019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b713048a>.
21. KERMAN, Kagan a KRAATZ, Heinz-Bernhard. Electrochemical detection of protein tyrosine kinase-catalysed phosphorylation using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, 24(5), s. 1484-1489. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.024>.
22. KERMAN, Kagan; VESTERGAARD, Mun'delanji; CHIKAE, Miyuki; YAMAMURA, Shohei a TAMIYA, Eiichi. Label-free electrochemical detection of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of peptides based on tyrosine oxidation. *Electrochemistry Communications*. 2007, 9(5), s. 976-980. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.11.033>.
23. KITAZAKI, Hirotarō; MORI, Takeshi; KANG, Jeong-Hun; NIIDOME, Takuro; MURATA, Masaharu et al. A colorimetric assay of protein kinase activity based on peptide-induced coagulation of gold nanorods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 99(12), s. 7-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.028>.

24. LI, Tao; LIU, Dianjun; WANG, Zhenxin; BRUST, Mathias; WANG, Yonghong et al. Microarray-based Raman spectroscopic assay for kinase inhibition by gold nanoparticle probes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, 24(11), s. 3335-3339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.04.033>.
25. LI, Zhijia; YIN, Bo; ZHANG, Shuangqian; LAN, Zhigang a ZHANG, Lan. Targeting protein kinases for the treatment of Alzheimer's disease: Recent progress and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023, 261(2), s. 386-398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115817>
26. LIAO, Ying; ZHANG, Yingqin; SU, Aiwen; ZHANG, Yanli; WANG, Hongbin et al. Zr⁴ -mediated DNAzyme-driven DNA walker amplification strategy for electrochemical assay of protein kinase a activity and inhibition. *Talanta*. 2023, 260(1), s. 299-304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124612>.
27. LIEBSCHER, Jürgen; MRÓWCZYŃSKI, Radosław; SCHEIDT, Holger A.; FILIP, Claudiu; HÁDADE, Niculina D. et al. Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? *Langmuir*. 2013, 29(33), s. 10539-10548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la4020288>.
28. LIU, Yuening; CHEN, Jingrui; FONTES, Shayne K; BAUTISTA, Erika N a CHENG, Zhaokang. Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart. *Cardiovascular Research*. 2022, 118(2), s. 386-398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab008>.
29. LIU, Jinqian; HE, Xiaoxiao; WANG, Kemin; HE, Dinggeng; WANG, Yonghong et al. A highly sensitive electrochemiluminescence assay for protein kinase based on double-quenching of graphene quantum dots by G-quadruplex–hemin and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 70(51), s. 54-60. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.026>.
30. LIU, Xin; LI, Yong; XU, Xiahong; LI, Pei; NIE, Zhou et al. Nanomaterial-based tools for protein kinase bioanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, 58(11), s. 40-53. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.01.009>.
31. LIU, Rong; QIAN, Ming-Ping a CUI, Ying-Yu. Protein kinases: The key contributors in pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease-derived hepatocellular carcinoma. *Metabolism*. 2023, 147, 155665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155665>.
32. LIU, Meijuan; ZHAO, Xihan; LIANG, Xianghui; ZHOU, Yi-Ge a HUGHES, Robert. Homogeneous and Label-Free Detection and Monitoring of Protein Kinase Activity

- Using the Impact Electrochemistry of Silver Nanoparticles. *ACS Sensors*. 2024, 9(1), s. 110-117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c01703>.
33. LUO, Mianxing; WANG, Liang; CHEN, Guo a ZHAO, Jun. Performance of microenvironment-induced lipase immobilization on diversify surface of magnetic particle. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, 225, 113286. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113286>.
34. NONGA, Olivier Etebe; LAVOGINA, Darja; IVAN, Taavi; VIHT, Kaido; ENKVIST, Erki et al. Discovery of strong inhibitory properties of a monoclonal antibody of PKA and use of the antibody and a competitive photoluminescent orthosteric probe for analysis of the protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2020, 1868(8), s. 3335-3339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140427>.
35. PANG, Kun; WANG, Wei; QIN, Jia-Xin; SHI, Zhen-Duo; HAO, Lin et al. Role of protein phosphorylation in cell signaling, disease, and the intervention therapy. *MedComm*. 2022, 3(4), s. 1631-1641 Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mco2.175>.
36. PIELES, Oliver; REICHERT, Torsten E. a MORSCZECK, Christian. Protein kinase A is activated during bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of dental follicle stem cells via endogenous parathyroid hormone-related protein. *Archives of Oral Biology*. 2022, 138, 105409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105409>.
37. RAMOS, Margarita Díaz; MIRANDA, Leticia Passos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; KOPP, William a TARDIOLI, Paulo Waldir. Improving the Yields and Reaction Rate in the Ethanolysis of Soybean Oil by Using Mixtures of Lipase CLEAs. *Molecules*. 2019, 24(23), 24234392. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24234392>.
38. REMONATTO, Daniela; MIOTTI JR., Rodney H.; MONTI, Rubens; BASSAN, Juliana C. a DE PAULA, Ariela Veloso. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*. 2022, 114, s. 1-20. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.
39. REZAIE, Hosna; KAJANI, Abolghasem Abbasi; JAFARIAN, Faranak; ASGARI, Sina; TAHERI-KAFRANI, Asghar et al. Assessment of the efficiency and stability of enzymatic membrane reaction utilizing lipase covalently immobilized on a functionalized hybrid membrane: A review. *Journal of Biotechnology*. 2024, 387(5), s. 23-31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.03.012>.

40. ROSKOSKI, R.; WANG, Wei; QIN, Jia-Xin; SHI, Zhen-Duo; HAO, Lin et al. Enzyme Structure and Function☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, 3(4), s. 1631-1641. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05007-8>.
41. ROSKOSKI, Robert; YAN, Jun; HUANG, Lei; YANG, Xue; SANTIAGO, André S. et al. Rule of five violations among the FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: Protein kinase G and p38 α MAPK regulation of serotonin transporters. *Pharmacological Research*. 2023, 191, 106774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106774>.
42. ROY, Madhumita; SARKAR, Ruma; MUKHERJEE, Apurba a MUKHERJEE, Sutapa. Inhibition of crosstalk between Bcr-Abl and PKC signaling by PEITC, augments imatinib sensitivity in chronic myelogenous leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2015, 242, s. 195-201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.004>.
43. SANTOS, Mateus PF; BRITO, Mylena JP; JUNIOR, Evaldo CS; BONOMO, Renata CF a VELOSO, Cristiane M. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. 2019, 94(6), s. 1982-1990. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jctb.5981>.
44. SATO, Jun-ich; ONOGI, Hiroshi; NOMURA, Namiko; HAGIWARA, Masatoshi a INOUE, Satoshi. Bioluminescent immunoassay for serine/threonine protein kinase activity using an aequorin-labeled monoclonal antibody and a synthetic peptide as a substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023, 681, s. 180-185. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.09.062>.
45. SCHÖFFER, Jéssie da Natividade; MATTE, Carla Roberta; CHARQUEIRO, Douglas Santana; DE MENEZES, Eliana Weber; COSTA, Tania Maria Haas et al. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. *Process Biochemistry*. 2017, 58(1-2), s. 120-127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.041>.
46. SOJKA, Jiří; ŠAMAJOVÁ, Olga a ŠAMAJ, Jozef. Gene-edited protein kinases and phosphatases in molecular plant breeding. *Trends in Plant Science*. 2023, 11.019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.11.019>.
47. STAGNO, Fabio; STELLA, Stefania; BERRETTA, Salvatore; MASSIMINO, Michele; ANTOLINO, Agostino et al. Sequential mutations causing resistance to both Imatinib

- Mesylate and Dasatinib in a chronic myeloid leukaemia patient progressing to lymphoid blast crisis. *Leukemia Research*. 2008, 32(4), s. 673-674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.08.008>.
48. SUI, Chengji; LIU, Fei; TANG, Lihua; LI, Xue; ZHOU, Yunlei et al. Photoelectrochemical determination of the activity of protein kinase A by using g-C₃N₄ and CdS quantum dots. *Microchimica Acta*. 2018, 185(12), 3076-z. z: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3076-z>.
49. SURESH, Rithika. Protein Kinases: Overview, Classification and Therapeutic Potential. 2022, s. 1-2. Dostupné z: <https://www.assaygenie.com/blog/protein-kinases>. [cit. 2024-05-08].
50. TAKARADA, Jéssica E.; CUNHA, Micael R.; ALMEIDA, Vitor M.; VASCONCELOS, Stanley N.S.; SANTIAGO, André S. et al. Discovery of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as novel mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) inhibitors: Protein kinase G and p38 α MAPK regulation of serotonin transporters. *Current Research in Physiology*. 2024, 98, 117561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117561>.
51. TAN, Penglong; LEI, Chunyang; LIU, Xin; QING, Meng; NIE, Zhou et al. Fluorescent detection of protein kinase based on zirconium ions-immobilized magnetic nanoparticles: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. *Analytica Chimica Acta*. 2013, 780(1-2), s. 89-94. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.070>.
52. TAN, Dezhan; LI, Feng a ZHOU, Binbin. Electrochemical Assay Methods for Protein Kinase Activity. *International Journal of Electrochemical Science*. 2019, 14(6), s. 5707-5725. Dostupné z: <https://doi.org/10.20964/2019.06.75>.
53. TAN, Tianwei; LU, Jike; NIE, Kaili; DENG, Li a WANG, Fang. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*. 2010, 28(5), s. 628-634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.012>.
54. TARN, Mark D.; ROBERT, Damien; PEYMAN, Sally A.; ILES, Alexander; WILHELM, Claire et al. Temperature-based tuning of magnetic particle separation by on-chip free-flow magnetophoresis. *Conference Paper*. 2009, s. 1-9. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/269696549_Temperature-based_tuning_of_magnetic_particle_separation_by_on-chip_free-flow_magnetophoresis. [cit. 2024-05-08].

55. WANG, Jing; CAO, Ya; LI, Yun; LIANG, Zhiqiang a LI, Genxi. Electrochemical strategy for detection of phosphorylation based on enzyme-linked electrocatalysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011, 656(1-2), s. 274-278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.10.012>.
56. WANG, Zhenxin; LEE, Jason; COSSINS, Andrew R.; BRUST, Mathias; WANG, Yonghong et al. Microarray-Based Detection of Protein Binding and Functionality by Gold Nanoparticle Probes. *Analytical Chemistry*. 2005, 77(17), s. 5770-5774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac050679v>.
57. WANG, Xinyue; ZHOU, Hongying; XU, Zitong; WU, Huan; LAN, Christopher Q. et al. Immobilization of alcalase on polydopamine modified magnetic particles. *Biochemical Engineering Journal*. 2024, 109310. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.10_9310.
58. WENG, Yilun; YANG, Guangze; LI, Yang; XU, Letao; CHEN, Xiaojing et al. Alginate-based materials for enzyme encapsulation: A new carrier for enzymes immobilization by affinity adsorption. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2023, 318, 102957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102957>.
59. XERXA, Elena; BAJORATH, Jürgen; HUANG, Lei; YANG, Xue; SANTIAGO, André S. et al. Data-oriented protein kinase drug discovery: Protein kinase G and p38 α MAPK regulation of serotonin transporters. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2024, 271, 116413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116413>.
60. XU, Junyang; JIANG, Yanjun; ZHOU, Liya; MA, Li; HUANG, Zhihong et al. Nickel-Carnosine complex: A new carrier for enzymes immobilization by affinity adsorption. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2021, 38, s. 237-246. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2021.04.019>.
61. XU, Shoujiang; LIU, Yang; WANG, Taihong a LI, Jinghong. Highly Sensitive Electrogenerated Chemiluminescence Biosensor in Profiling Protein Kinase Activity and Inhibition Using Gold Nanoparticle as Signal Transduction Probes. *Analytical Chemistry*. 2010, 82(22), s. 9566-9572. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac102296g>.
62. YIN, Huanshun; WANG, Mo; LI, Bingchen; YANG, Zhiqing; ZHOU, Yunlei et al. A sensitive electrochemical biosensor for detection of protein kinase A activity and inhibitors based on Phos-tag and enzymatic signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 63, s. 26-32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.016>.

63. ZHANG, Tong; SCHNEIDER, Jacqueline D.; LIN, Chuwei; KOH, Jin; CHEN, Sixue et al. Proteomics data of SNF1-related protein kinase 2.4 interacting proteins revealed by immunoprecipitation-mass spectrometry. *Data in Brief*. 2020, 32 (8), s. 3335-3339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106326>.
64. ZHANG, Yunxiang; ZHANG, Zhuo; CHEN, Yue; TAN, Xinqiu; LIU, Yong et al. Protein kinase A regulatory subunit is required for normal growth, zoosporogenesis, and pathogenicity in *Phytophthora sojae*. *Research in Microbiology*. 2023, 104152. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104152>.
65. ZHAO, Zheng; YAN, Jun; HUANG, Lei; YANG, Xue; SANTIAGO, André S. et al. Phytochemicals targeting Alzheimer's disease via the AMP-activated protein kinase pathway, effects, and mechanisms of action: Protein kinase G and p38 α MAPK regulation of serotonin transporters. *Current Research in Physiology*. 2024, 173, 116373. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116373>.
66. ZHAO, Zhen; ZHOU, Xiaoming; XING, Da; ZHANG, Yanli; WANG, Hongbin et al. Highly sensitive protein kinase activity assay based on electrochemiluminescence nanoprobes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012, 31(1), s. 299-304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.035>.
67. ZHOU, Jiang; XU, Xiahong; LIU, Wei; LIU, Xin; NIE, Zhou et al. Graphene Oxide–Peptide Nanocomplex as a Versatile Fluorescence Probe of Protein Kinase Activity Based on Phosphorylation Protection against Carboxypeptidase Digestion. *Analytical Chemistry*. 2013, 85(12), s. 5746-5754. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac400336u>.
68. ZHU, Xuan; ZHAO, Yi-Fan; WEN, Hong-Jian; LU, Yu; YOU, Shuai et al. Silkworm pupae protein co-degradation by magnetic nanoparticles immobilized proteinase K and *Mucor circinelloides* aspartic protease for further utilization of sericulture by-products. *Environmental Research*. 2024, 249, 118385. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118385>.
69. ZHUO, Meihui; QUAN, Xiangchun; YIN, Ruoyu; LV, Kai; ZHAO, Longshan et al. Enhancing methane production and interspecies electron transfer of anaerobic granular sludge by the immobilization of magnetic biochar: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *Chemosphere*. 2024, 352(4) s. 90-98. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141332>.