

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2020

Patrícia Hrašnová

Univerzita Palackého v Olomouci

Prírodovedecká fakulta

Katedra bunkovej biológie a genetiky



**Enzymatické reakcie a ich využitie v testovaní
nových liečiv pre neurodegeneratívne ochorenia**

Bakalárska práca

Patrícia Hrašnová

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2020

Vedúca práce: Mgr. Lenka Řeháčková

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Patrícia Hrašnová

Názov práce: Enzymatické reakcie a ich využitie v testovaní nových liečiv pre neurodegeneratívne ochorenia

Typ práce: Bakalárska

Pracovisko: Katedra bunkovej biológie a genetiky, PrF UP v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Lenka Řeháčková

Rok obhajoby práce: 2020

Kľúčové slová: MALDI-TOF hmotnostná spektrometria, Alzheimerova choroba, tau proteín, hyperfosforylácia, enzymatická inhibícia, MARK4

Počet strán: 55

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Súhrn

Bakalárska práca bola venovaná optimalizácii a následnej práci s protokolom pre stanovenie aktivity enzýmu MARK4, identifikovaného ako kľúčového pri hyperfosforylácii tau proteínu v oblastiach R1 a R3 MT-binding region. Pre uvedenú optimalizáciu bola použitá technika MALDI-TOF hmotnostná spektrometria, pomocou ktorej bola stanovená fosforylácia substrátu CHKtid peptidu a zmena aktivity MARK4 vplyvom odlišných podmienok prostredia. Optimalizovaný protokol bol ďalej využitý pri testovaní inhibitorov, staurosporinu a MARK/PAR-1, hodnotených z hľadiska špecifity a vplyvu na uvedený enzým. Potvrdením funkčnosti metodiky nešpecifického staurosporinu a špecifického MARK/PAR-1 bolo možné pristúpiť k skríningu látok ako potenciálnych liečiv tvorby neurofibrilárnych kľbiek, dôležitého ukazovateľa Alzheimerovej choroby. Okrem aplikovaného CHKtid peptidu bola funkčnosť metodiky overená i na peptidoch R1 a R3 tau proteínu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Patricia Hrasnova

Title: Enzymatic assays and its application in the screening of potential drugs for neurodegenerative diseases

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University Olomouc

Supervisor: Mgr. Lenka Rehackova

The year of presentation: 2020

Keywords: MALDI-TOF mass spectrometry, Alzheimer disease, tau protein, hyperphosphorylation, enzymatic inhibition, MARK4

Number of pages: 55

Number of appendices: 0

Language: Slovak

Summary

The bachelor thesis was dedicated to the optimization and determining the activity of the MARK4 enzyme, identified as key in the hyperphosphorylation of R1 and R3 peptides of the MT-binding region of tau protein. To determine the phosphorylation of the substrate CHktid peptide and the change of MARK4 activity due to different environmental conditions, MALDI-TOF mass spectrometry technique was used. The optimized protocol was further applied in testing of the inhibitors, staurosporine and MARK/PAR-1, with regards on specificity and effect on the enzyme. By confirming the functionality of the methodology of non-specific staurosporine and specific MARK/PAR-1, it was possible to proceed with the screening of substances as potential cure for the formation of neurofibrillary tangles, an important indicator of Alzheimer's disease. In addition to the applied CHK peptide, the functionality of the methodology was also verified on peptides R1 and R3 of tau protein.

Prehlásenie

Prehlasujem, že túto bakalársku prácu som vykonala samostatne, pod vedením Mgr. Lenky Řeháčkovej s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci

.....

Patrícia Hrašnová

Pod'akovanie

Touto cestou by som rada poďakovala vedúcej svojej práce, Mgr. Lenke Řeháčkovej, za odborné vedenie, pomoc a rady pri experimentálnej časti v laboratóriu i následnom spracovávaní práce. Taktiež ďakujem svojej rodine za vytvorenie podmienok pre štúdium. Bakalárska práca bola podporená grantovým projektom AZV–15-31984A.

Obsah

Zoznam symbolov a skratiek.....	vi
Zoznam obrázkov	vii
Zoznam tabuliek.....	viii
Zoznam grafov	ix
1. Úvod	1
2. Ciele práce	2
3. Literárny prehľad.....	3
3.1 Enzýmy.....	3
3.1.1 Molekulárna štruktúra enzýmov a vplyv vonkajších faktorov na ich funkciu	4
3.1.2 Enzymatická kinetika	6
3.1.3 Alosterická aktivita enzýmov	9
3.1.4 Inhibícia enzymatickej reakcie	10
3.2 Neurodegeneratívne ochorenia.....	12
3.2.1 Charakterizácia neurodegeneratívnych ochorení.....	12
3.2.2 Alzheimerova choroba.....	12
3.2.3 Aktuálne trendy v terapii Alzheimerovej choroby, cesta prechodu liečiv cez hematoencefalitickú bariéru	16
3.3 Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF.....	19
4. Materiál a metódy	20
4.1 Biologický materiál	20
4.2 Použité chemikálie, roztoky a súpavy	20
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení	21
4.4 Použité softvéry	21
4.5 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	21
5. Výsledky	24
6. Diskusia	37
6.1 Aplikácia hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF v porovnaní s inými dostupnými metódami pre enzymatické assaye.....	37
6.2 Optimalizácia metodiky.....	39
6.3 Testovanie inhibítorov a screening látok.....	40
7. Záver.....	44
8. Literatúra	45

Zoznam symbolov a skratiek

AD	<i>z angl.</i> Alzheimer disease (Alzheimerova choroba)
ATP	adenozín-3-fosfát
Aβ	β amyloid
cdk	cyklín-dependentná kináza
CNS	centrálna nervová sústava
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	ditiotreitol
EC₅₀	polovica maximálnej efektívnej koncentrácie
GSK	glykogén syntáza kináza
HCCA	α -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina
HCl	kyselina chlorovodíková
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-yl]etánsulfónová
HTS	<i>z angl.</i> high throughput screening (vysokovýkonný testovací skrínig)
IC₅₀	polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie
KNF model	Koshland-Némethy-Filmer model
LogP	čiastkový koeficient rozpustnosti voda:octanol
MARK	<i>z angl.</i> microtubule-associated protein kinase (s mikrotubulmi-asociované proteín kinázy)
MDW model	Monod-Wyman-Changeux model
NADH	nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát
NADPH	nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát
NFT	neurofibrilárne kľbká
nON	n počet donorov vodíkových väzieb molekuly
nOHNH	n počet akceptorov vodíkových väzieb molekuly
PHF	párové helikálne filamenty
P_i	fosfát
PNS	periférna nervová sústava
RT	<i>z angl.</i> room temperature (izbová teplota)
TFA	kyselina trifluoroctová
ÚMTM	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny v Olomouci

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Účinok pH prostredia na priebeh enzymatickej reakcie (ilustračný obrázok).....	5
Obrázok 2: Účinok teploty prostredia na priebeh enzymatickej reakcie (ilustračný obrázok).	6
Obrázok 3: Závislosť rýchlosti v_0 na koncentrácii substrátu [S] pri konštantnej koncentrácii enzýmu (ilustračný obrázok).....	8
Obrázok 4: Grafické vyjadrenie porovnania správania neinhibovanej reakcie, kompetívnej, nekompetívnej a akompetívnej inhibície (ilustračný obrázok).	11
Obrázok 5: Štiepenie APP skupinami sekretáz za vzniku A β a vedľajších produktov (prevzaté z Vassar et al., 1999).	14
Obrázok 6: Jednotlivé domény tau proteínu stanovené jeho osekvenovaním (ilustračný obrázok). ...	15
Obrázok 7: Hmotnostné spektrum s analyzovanou vzorkou CHKtid peptidu bez fosforylácie merané na MALDI-TOF.	24
Obrázok 8: Štruktúra staurosporinu.	31
Obrázok 9: MARK/PAR-1 inhibítor aktivity.....	32

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom na koncentráciu enzýmu MARK4 kináza.	25
Tabuľka 2: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom k zmene koncentrácie ATP.	26
Tabuľka 3: Fosforylácia CHKtid peptidu enzýmom MARK4 kináza pri zoptimalizovanom ATP. ...	27
Tabuľka 4: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom na rozdielne pH použitého pufru.	28
Tabuľka 5: Fosforylácia CHKtid peptidu v rôznych teplotných podmienkach.	29
Tabuľka 6: Vplyv zmeny koncentrácie staurosporínu na inhibíciu MARK4 kinázy.	31
Tabuľka 7: Vplyv použitých koncentrácií MARK/PAR-1 na inhibíciu MARK4 kinázy.	33
Tabuľka 8: Inhibícia aktivity MARK4 kinázy pôsobením látky L1.	35
Tabuľka 9: Vybrané parametre charakteristiky inhibičných molekúl MARK4 a liečiva AD donepezilu pre drug design.	36

Zoznam grafov

Graf 1: Fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu.....	25
Graf 2: Zmena fosforylácie substrátu CHKtid peptidu vzhľadom na koncentráciu ATP.	26
Graf 3: Fosforylácia CHKtid peptidu v optimalizovaných podmienkach koncentrácie ATP a MARK4.	28
Graf 4: Zmena fosforylácie CHKtid peptidu vzhľadom na pH pufru	29
Graf 5: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom na teplotu prostredia.	30
Graf 6: Saturačná krivka zmeny reakčnej rýchlosti vplyvom sýtenia enzýmu CHKtid peptidom podľa Michaelisa-Mentenovej.....	30
Graf 7: Inhibícia MARK4 kinázy vzhľadom k zmene koncentrácie staurosporínu.	32
Graf 8: Inhibícia MARK4 kinázy vzhľadom na koncentráciu MARK/PAR-1 inhibítora.	33
Graf 9: Zmena reakčnej rýchlosti vplyvom aplikácie inhibítora.	34
Graf 10: Fosforylácia jednotlivých sekvencií (R1–R4) tau peptidov v rôznych časových bodoch.....	35
Graf 11: Inhibícia MARK4 inhibítorom L1.	36

1. Úvod

Nervová sústava predstavujúca pamäťové a riadiace centrum celého organizmu je zložená z neurónov a podporných neuroglíí. Za normálnych okolností, pri zachovaní homeostázy organizmu, dochádza v dôsledku impulzu zo sensorických buniek k vyvolaniu adekvátnej odpovede v mozgu a prenosu nervového vzruchu k efektorom. V prípade pôsobenia exogénnych (xenobiotiká, hypoxia) či endogénnych deštruktívnych vplyvov (voľné radikály, v určitej miere i enzýmy či antioxidanty) je homeostáza narušená a poškodenie následne zabraňuje v prenose nervového vzruchu medzi bunkami.

Zameraním pozornosti na endogénne poškodenia enzymatickým pôsobením možno skúmať konkrétne vplyvy daných katalyzátorov na jednotlivé neuróny. Prebiehajúce procesy sú stanovené ako enzymatické assaye hodnotiace aktivitu enzýmov vrátane inhibície reakcie, ktorá je v mnohých prípadoch kľúčovou pre hľadanie potenciálnych liečiv.

Množstvo reaktantu zmeneného vhodným katalyzátorom na výsledný produkt za určitý čas možno stanoviť niekoľkými spôsobmi. Najčastejšie bývajú aplikované kolorimetrické či fluorometrické metódy, no do popredia sa dostáva hmotnostná spektrometria aplikovaná i v tejto práci. Využíva analýzu vznikajúceho produktu na základe zmeny jeho hmoty porovnaním intenzity signálov príslušných pík. Pre úspešné zavedenie novej enzymatickej assaye je najprv nutné vykonať sériu optimalizačných krokov, ktoré umožnia následné testovanie aktivity a inhibície enzýmu pri stabilných podmienkach s reprodukovateľnými výsledkami.

Neurodegeneratívne ochorenia sú vo veľkej miere zastúpené rôznymi formami demencií, medzi ktoré patrí i Alzheimerova choroba. Z doposiaľ uskutočnených výskumov vyplýva, že jej primárnym pôvodcom je hyperfosforylovaný tau proteín. Iniciačným bodom hyperfosforylácie je enzým zo skupiny MARK kináz, vo vyšších koncentráciách preukázaný v mozgu pacientov diagnostikovaných práve s Alzheimerovou chorobou. Preto je inhibícia jeho aktivity cieľom výskumu pri hľadaní vhodnej terapie Alzheimerovho ochorenia.

2. Ciele práce

1. Literárny prehľad
2. Vývoj a optimalizácia enzymatickej assaye
3. Testovanie nových potenciálnych liečiv

3. Literárny prehľad

3.1 Enzýmy

Enzýmy tvoria samostatnú zložku skupiny proteínov klasifikovaných na základe ich špecifickej funkcie (Cole a Eastoe, 1988). Jedná sa o proteínové katalyzátory zvyšujúce rýchlosť chemickej reakcie, ktoré sa sami v priebehu reakcie nemenia (Ferrier, 2017).

Jednotlivé enzýmy majú v rámci svojej štruktúry prítomné špecifické väzobné miesto (aktívne miesto) umožňujúce kontakt so substrátom. Úlohu zohráva v priebehu alternatívneho spôsobu reakcie, pri ktorej dochádza k zníženiu aktivačnej energie potrebnej na vytvorenie produktu (Nord, 1960; Kodíček *et al.*, 2018).

Niektoré enzýmy vyžadujú pre svoju aktivitu okrem bielkovinovej zložky, apoenzýmu, nebielkovinovú zložku, kofaktor. V prípade vzniku pevnej väzby medzi apoenzýmom a kofaktorom hovoríme o vzniku prostetickej skupiny (Alberts, 1998; Ferrier, 2017).

Špecifickosť a charakteristická funkcia umožnila rozdeliť enzýmy do niekoľkých kategórií predstavujúcich triedy, podtriedy a skupiny. Podľa jednotnej nomenklatúry ich zaraďujeme do 7 existujúcich tried na základe typu katalyzovanej reakcie (Dobson a Doig, 2005):

1. **Oxidoreduktázy** predstavujú enzýmy katalyzujúce oxidačno-redukčné reakcie. Podieľajú sa na presune vodíkových či kyslíkových atómov, prípadne elektrónov z jedného substrátu na druhý. Podtriedu oxidoreduktáz tvoria napr. dehydrogenázy, oxidázy, peroxidázy (Dobson a Doig, 2005).
2. **Transferázy** sú enzýmy zabezpečujúce presun chemických skupín (napr.: metyl, amino, acyl, fosfát) z jednej molekuly (donor) na inú (akceptor) (McKee a McKee, 1996). Rozdelenie v rámci triedy je dané vzhľadom na typ prenášanej skupiny a tvorí 10 kategórií. 7. kategóriu zastupujú enzýmy prenášajúce fosfátovú skupinu (prevažne z molekuly ATP); vo veľkej miere sú známe najmä proteín kinázy, ktoré prenášajú fosfátovú skupinu na molekuly proteínov (prevažne na aminokyselinové zvyšky serínu, treonínu a tyrozínu) (Blom *et al.*, 1999), čím dochádza k procesu fosforylácie, ktorá vedie k modifikácii funkcie cieľového fosforylovaného proteínu (Murray *et al.*, 2009).
3. **Hydrolázy** svojím pôsobením katalyzujú hydrolytické štiepenie väzieb. Zaradením sem spadajú peptidázy alebo esterázy (Matouš, 2010).
4. **Lyázy** podmieňujú svojím katalytickým pôsobením eliminačné reakcie vedúce k vzniku dvojitych väzieb. Podtriedy tejto skupiny enzýmov tvoria aldolázy, deaminázy a dekarboxylázy (Mahdi a Kelly, 2001).
5. **Izomerázy** predstavujú heterogénnu skupinu enzýmov, ktoré zapríčiňujú intramolekulárne zmeny v zlúčeninách. Typickým príkladom enzýmu spadajúceho do tejto

triedy je glukóza-6-fosfát izomeráza spôsobujúca molekulový prešmyk napr. glukózy-6-fosfátu za vzniku fruktózy-6-fosfátu v procese metabolizmu cukrov (Paul *et al.*, 2019).

6. **Ligázy** katalyzujú chemické reakcie vedúce k vzniku kovalentných väzieb samostatných molekúl substrátov. Tento proces je sprevádzaný simultánnym štiepením väzieb ATP, z ktorých sa získava energia pre vytvorenie väzieb. Príkladom tejto skupiny enzýmov je DNA ligáza (Patrick, 2005).
7. **Translokázy** sú charakterizované ako enzýmy katalyzujúce prechod iónov a molekúl cez membrány a ich rozdeľovanie vo vnútri membrán. Veľké množstvo z nich sa priamo podieľa na hydrolýze ATP (hoci tieto enzýmy boli predtým zaradené ako ATPázy medzi hydrolázy, napriek tomu, že hydrolýza nie je ich primárna funkcia) (Jeske *et al.*, 2019).

3.1.1 Molekulárna štruktúra enzýmov a vplyv vonkajších faktorov na ich funkciu

Nakoľko enzýmy predstavujú látky proteínovej povahy, ich reaktivita a stabilita podstatne súvisí s vplyvom vonkajších fyzikálnych a chemických faktorov ako sú teplota, pH a koncentrácia substrátu (Schrank *et al.*, 2009; Campbell a Farrell, 2012). Štruktúra proteínov vychádza z kondenzácie aminokyselinových jednotiek, konkrétne $-NH_2$ skupiny jednej aminokyseliny a $-COOH$ skupiny druhej aminokyseliny za vytvorenia unikátnej peptidovej väzby (Schulz a Schirmer, 1979; Brändén a Tooze, 1999; Currier, 2012), pričom spojením týchto väzieb sa vytvárajú vyššie úrovne usporiadania proteínov, teda primárna, sekundárna, terciárna a prípadne kvartérna štruktúra.

Primárna štruktúra je daná poradím aminokyselín v polypeptidovom reťazci; zároveň je základom pre trojdimenzionálnu orientáciu proteínov, ktorá vychádza z vyšších stavebných štruktúr (Satyanarayana a Chakrapani, 2013).

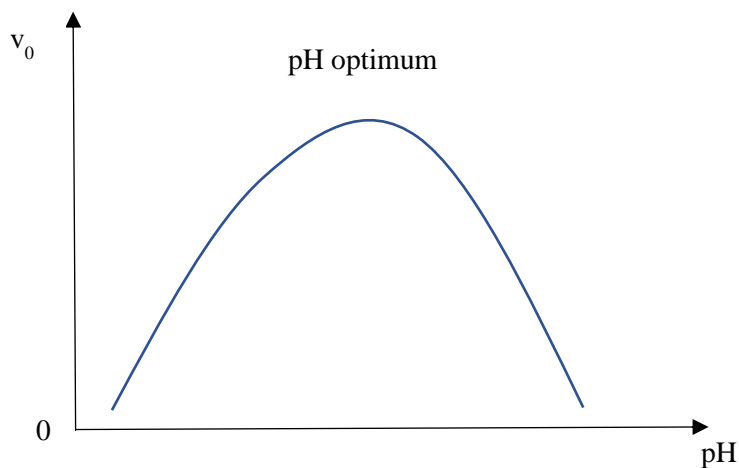
Sekundárna štruktúra vzniká na ribozómoch lokálnym prepojením $-NH_2$ a $-COOH$ skupín pomocou ďalších nekovalentných väzieb utváraných až po syntéze polypeptidového reťazca. Stavebné jednotky vznikajúce v sekundárnom usporiadaní proteínov vychádzajú z konformácie polypeptidového reťazca (Littlechild, 2013). Rozvinuté polypeptidové reťazce naberajú kľukatý vzor pripomínajúci efekt skladaného listu, a to paralelný β -list v prípade, že usporiadanie každého reťazca ide v rovnakom smere, a antiparalelný β -list v prípade, že jednotlivé reťazce sú orientované navzájom opačným smerom (Campbell a Farrell, 2012). V štruktúre α -helixu, druhej forme usporiadania jednotiek sekundárnej štruktúry, vznikajú vodíkové mostíky vo vnútri samotného reťazca a sú približne paralelné s osou vlákna. Štruktúrna podoba je stabilizovaná uvedenými vnútroreťazcovými vodíkovými väzbami.

Kompaktné zoskupenie umožňujúce vytvorenie stabilného priestorového usporiadania trojdimenzionálnej podoby zodpovedá terciárnej štruktúre. Zabezpečuje stabilitu jednotlivých molekúl celku. Pre vytvorenie terciárnej štruktúry dochádza k prepojeniu atómov pomocou vodíkových

mostíkov a van der Waalsových síl, no taktiež disulfidických mostíkov a iónových väzieb (Berkowitz a Houde, 2015).

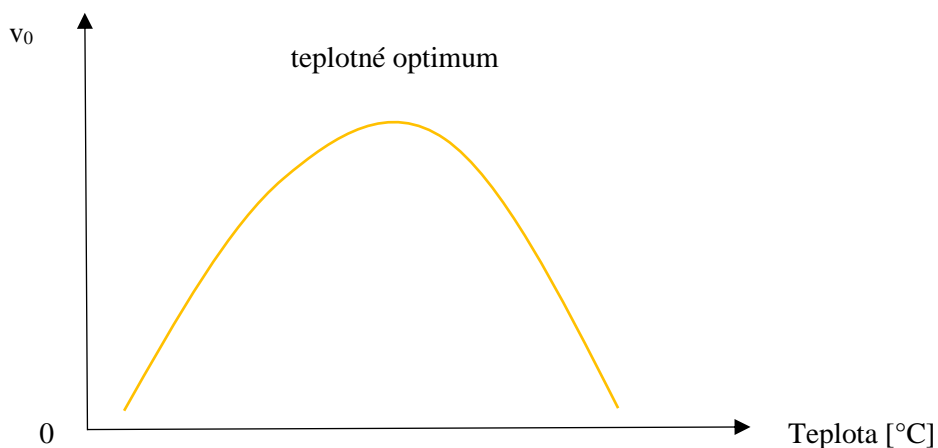
Väzby zabezpečujúce stabilitu daných štruktúr sú senzitívne na zmeny v prostredí. Vplyvom pôsobiacich zmien sa väzby v rámci primárnej, sekundárnej a terciárnej štruktúry narúšajú a enzýmová aktivita stráca svoju efektivitu. Z uvedených dôvodov je nutné vziať do úvahy natívny stav, v ktorom daný enzým pôsobí, a zohľadniť všetky vonkajšie faktory uvedené vyššie (pH, teplota...).

Rozpätie hodnôt pH, pri ktorých daný enzým pôsobí, úzko súvisí s ionizovateľnosťou postranných skupín reťazca. Tie môžu vzájomne interagovať so substrátom nadpájajúcim sa na aktívne miesto enzýmu a vzájomne musia obsahovať náboje, ktoré umožňujú priebeh reakcie. V takomto prípade je rozmedzie pH pre pozitívny priebeh reakcie veľmi špecifické. Oblasť špecifického pôsobenia je nazvaná pH-optimum (vid' Obrázok 1) a jej hodnota je variabilná a závisí od typu enzýmu a substrátu, ktoré navzájom interagujú (Pundir, 2015; Robinson, 2015). V ľudskom tele sa pohybuje prevažne okolo hodnoty $\text{pH} = 7$, výnimku tvorí prostredie žalúdka, kde je definovaná rozmedzím prevažne $1 < \text{pH} < 2$.



Obrázok 1: Účinok pH prostredia na priebeh enzymatickej reakcie (ilustračný obrázok).

Vplyv teploty na aktivitu enzýmov je kľúčový, nakoľko hovoríme o proteínových reťazcoch, ktoré vplyvom teploty prekračujúcej určité teplotné optimum strácajú svoju funkčnosť v dôsledku straty svojej natívnej podoby. Teplotné optimum je faktor úzko závisiaci na časovej dĺžke experimentu použitej pri meraní dát – v ľudskom tele platí zvyčajne pravidlo: čím kratší je potrebný čas na vykonanie reakcie, tým menšie je riziko jeho zničenia pri vysokých teplotách (t.j. teplotách vyšších ako $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ zodpovedajúcich bežnej teplote v ľudskom tele). V rámci vplyvu teploty treba doplniť, že viaceré enzýmy pre priebeh reakcie vyžadujú prítomnosť kationu kovu ako Mg^{2+} , Zn^{2+} či Fe^{2+} . (Campbell a Farrell, 2012) Priebeh enzymatickej reakcie vzhľadom k zmenám teploty prostredia je znázornený na obrázku (vid' Obrázok 2).



Obrázok 2: Účinok teploty prostredia na priebeh enzymatickej reakcie (ilustračný obrázok).

Medzi procesy zmien správania proteínov často vyvolané vplyvom teploty (príp. chemických činidiel či fyzikálnych veličín) patrí denaturácia, renaturácia a koagulácia. V procese denaturácie dochádza k porušeniu väzieb sekundárnej, terciárnej a kvartérnej štruktúry. Tie zapríčiňujú následnú zmenu správania proteínov, t.j. stratu biologickej aktivity, nerozpustnosť v rozpúšťadlách predtým rozpustných či jednoduchší rozklad a strávenie proteínových molekúl v ľudskom tele.

Vo väčšine prípadov sa jedná o ireverzibilný proces (Elliott a Elliott, 1997). Napriek tomu existujú prípady, kedy môže dôjsť i k spätnému navráteniu reakcie, renaturácii, využívanej pri analýzach proteínov vopred odseparovaných od iných zložiek procesom denaturácie, napríklad pri štúdiu charakteru tau proteínu (Köpke *et al.*, 1993) či pri skúmaní vlastností látok urýchľujúcich renaturačné reakcie (Summers a Flowers, 2000).

Tepelná koagulácia je ireverzibilná zmena stavu proteínov, zrážanie, v procese zohrievania. Podobná reakcia nastáva i v prípade vystavenia proteínov aktívnym fyziologickým látkam ako sú toxíny či opsoníny (Chick, 1910; Satyanarayana a Chakrapani, 2013). Tento proces je často uvádzaný ako druh denaturačnej reakcie.

3.1.2 Enzymatická kinetika

Oblasť kvantitatívnej analýzy katalýzy enzýmov je známa ako enzymatická kinetika. Udáva informácie o reakčnej rýchlosti a jej časovom priebehu a jednotlivých podmienkach prostredia, pri ktorých k reakcii dochádza. Taktiež meria afinitu enzýmov k substrátom a inhibítorom, čím napomáha chápaniu reakčných mechanizmov a regulácii metabolických dráh v organizme. Reakčné mechanizmy sú definované počiatočnou rýchlosťou v_0 a udávajú sa v tvare $v_0 = k \cdot [A]^x$. k predstavuje konštantu rýchlosti chemickej reakcie, ktorá priamo závisí na podmienkach reakcie (pH, teplota, aktivita iónov), x možno definovať ako úroveň reakcie. Je dôležité pre uvedenie a následnú charakterizáciu reakcie z hľadiska počtu zapojených substrátov (Ferrier, 2017).

V prípade, že sa jedná o jednosubstrátové reakcie, je premieňaný jeden substrát za vzniku jedného produktu. Rýchlosť reakcie z matematického hľadiska závisí na prvomocninovej koncentrácii jediného reaktantu a má tvar $v = k \cdot [A]^1$. V jednosubstrátových reakciách je koncentrácia reaktantu funkciou času, z čoho vyplýva, že konštanta k je vyjadrená v jednotkách s^{-1} . Do tejto skupiny zaraďujeme i tzv. pseudo-jednosubstrátové reakcie, ktoré majú síce 2 reaktanty, no druhý z nich predstavuje voda. Nakoľko voda je vo väčšine prípadov v reakcii prítomná v nadbytku, uvádza sa ako konštanta, v čoho dôsledku sú tieto reakcie chápané ako pseudo-jednosubstrátové (McKee a McKee, 2009).

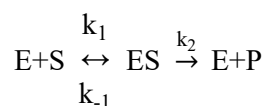
Najtypickejším prípadom reakcií z hľadiska kinetiky sú dvojsubstrátové reakcie. V tomto prípade existujúce reaktanty A a B musia zreagovať, aby vznikol výsledný produkt reakcie. Z matematického hľadiska je zápis reakcie:

$$v = k \cdot [A]^1 \cdot [B]^1.$$

Rýchlosť reakcie závisí na oboch reaktantoch A i B a rýchlostná konštanta je vyjadrená jednotkou $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (Cornish-Bowden, 1979).

Špeciálnym prípadom sú reakcie, pri ktorých prídanie reaktantu nezmení rýchlosť reakcie. Vtedy hovoríme o reakciách nultej úrovne $v = k \cdot [A]^0 = k$. Vznik takejto situácie možno odôvodniť dostatočným množstvom koncentrácie reaktantu, a teda vznikom konštantnej rýchlosti $v = k$ (Purich, 2010b).

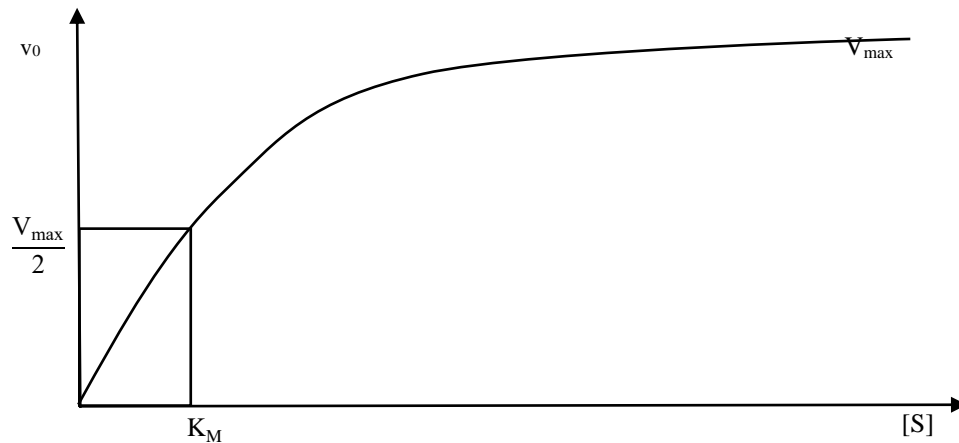
Pozorovanie enzymatickej reakcie a kinetiky s ňou súvisiacej bolo uskutočnené v roku 1913 Leonorom Michaelisom a Maud Mentenovou. Počiatkové pokusy boli vykonané na jednosubstrátových reakciách, z ktorých následne vychádzajú i všeobecné pravidlá pre kinetiku enzýmovo-katalyzovaných reakcií. Pre vysvetlenie pôsobenia kinetických zákonov platí schéma:



Popisuje jav prechodového stavu vzniku komplexu enzým-substrát (ES) pred finálnym krokom vzniku produktu (P). Konštanta k_1 predstavuje rýchlostnú konštantu reakcie vzniku enzým-substrátového komplexu, k_2 obdobne rýchlostnú konštantu vzniku produktu a uvoľnenia substrátu od enzýmu. k_{-1} je rýchlostnou konštantou zastupujúcou spätnú reakciu, kedy sa komplex enzým-substrát (ES) spätne rozkladá na samostatné zložky enzým a substrát (Campbell a Farrell, 2012; Voet *et al.*, 2013).

Podľa uvedenej schémy možno zostrojiť graf závislosti rýchlosti v_0 na koncentrácii substrátu [S] pri konštantnej koncentrácii enzýmu. Výsledkom daného grafu je krivka v podobe sigmoidy (viď Obrázok 3). Priebeh sigmoidy možno rozdeliť do dvoch samostatných úsekov: Prvým z nich je situácia, kedy rýchlosť reakcie je pomalá, priamo úmerná koncentrácii substrátu. V dôsledku nízkej koncentrácie substrátu je väčšina molekúl voľná, neviazaná na komplex. Platí $[E] \gg [ES]$.

Naopak v prípade vysokej koncentrácie substrátu je dosiahnutá tzv. medzná rýchlosť $v_0 = V_{\max}$. Molekuly substrátu sú v nadbytku v porovnaní s molekulami enzýmu, všetok enzým je spotrebovaný pre vznik komplexu enzým-substrát, platí $[E] \ll [ES]$. Krivka teda vyjadruje priebeh sýtenia enzýmu substrátom a hovoríme jej saturačná krivka (Eigen, 1968; Vodrážka, 1996).



Obrázok 3: Závislosť rýchlosti v_0 na koncentrácii substrátu $[S]$ pri konštantnej koncentrácii enzýmu (ilustračný obrázok).

Zo saturačnej krivky vychádza matematický výraz nazvaný rovnica Michaelisa a Mentenovej. Zahŕňa vyššie uvedený parameter medznej rýchlosti a Michaelisovej konštanty (Clarke, 2013).

$$v = \frac{V [S]}{K_M + S}$$

Z definície: „Michaelisova konštantka K_M predstavuje koncentráciu substrátu, pri ktorej medzná rýchlosť reakcie je práve $\frac{1}{2}$ jej maximálnej hodnoty (Berg *et al.*, 2002)“ vyplýva, že Michaelisova konštantka má rozmer koncentrácie. K_M rozdeľuje krivku závislosti počiatočnej rýchlosti v_0 na koncentrácii substrátu na dve oblasti, a to:

Ak $[S] \ll K_M \rightarrow v \approx \frac{V[S]}{K_M} \approx \text{konštanta } [S]$ (1. rád). Nízke hodnoty koncentrácie substrátu definujú časový priebeh enzýmovej reakcie podľa kinetickej rovnice 1. rádu.

Ak $[S] \gg K_M \rightarrow v \approx \frac{V[S]}{[S]} \approx V$ (0. rád). Pri vysokej koncentrácii substrátu je reakčná rýchlosť konštantná, t.j. množstvo vznikajúcich produktov sa mení lineárne s časom. Z matematického hľadiska je grafom vyjadrujúcim tento stav priamka, ktorej smernica je ekvivalentná koncentrácii, resp. aktivite daného enzýmu. (Vodrážka, 1996; Campbell a Farrell, 2012)

K_M predstavuje veličinu, ktorej vlastnosti a funkčnosť priamo závisia na charaktere prostredia a jednotlivých parametrov v ňom pôsobiacich (napr.: pH, teplota). Z matematického hľadiska je jej vyjadrením vzťah:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Platí stav $k_2 \gg k_{-1}$. Existuje však množstvo enzýmov, u ktorých dochádza k opačnému stavu, teda $k_{-1} \gg k_2$. Jedná sa o kvázirnovnovážny stav, kedy Michaelisova konštanta K_M vyjadruje hodnotu disociačnej konštanty komplexu ES. Takúto konštantu nazývame substrátová konštanta K_S . V tomto stave je K_M úmerná disociačnej konštante komplexu ES a platí: zo znižujúcou sa hodnotou K_M stúpa afinita enzýmu k danému substrátu. K_M je zároveň konštantou, ktorej hodnota nezávisí na koncentrácii enzýmu $[E_0]$. Využitelnosť tejto vlastnosti je najmä v oblasti charakterizácie katalytických vlastností enzýmu voči určitému substrátu (možnosť stanovenia pre rôzne typy enzýmových preparátov). Pri známej hodnote Michaelisovej konštanty možno vyjadriť počiatočnú rýchlosť enzýmovej reakcie a rovnako i koncentráciu substrátu potrebnú pre danú rýchlosť reakcie. Tieto vlastnosti objasňujú dôležitosť charakteru a správania sa Michaelisovej konštanty, ktorá je východiskovým faktorom pre ďalšie faktory podmieňujúce rozbehnutie a samotný priebeh reakcie (Campbell a Farrell, 2012; Voet *et al.*, 2013).

3.1.3 Alosterická aktivita enzýmov

Alostéria je forma regulácie, ktorá súvisí s konformačnými a funkčnými zmenami v jednotlivých enzýmoch. V rámci enzymatickej kinetiky o nej hovoríme v prípade, že substrát nemá k enzýmu rovnakú (stálu) afinitu. Afinita môže kolísať tak, že sa substrát na enzým naväzuje ľahko v dôsledku jeho vysokej afinity alebo naopak, enzým nie je v dostatočnej miere využitý v dôsledku nízkej substrátovej afinity (Pan *et al.*, 2010; Nussinov a Tsai, 2013).

Enzýmy podliehajúce alosterickej aktivite sú zväčša považované za oligoméne (Monod *et al.*, 1964), hoci výskumy potvrdzujú podobné správanie i u niektorých monoménych enzýmov (Kamata *et al.*, 2004; Hatzakis *et al.*, 2012). Môžu vykazovať buď bežnú kinetiku podľa Michaelis-Mentenovej alebo sa prejavujú sigmoidným vzťahom medzi počiatočnou rýchlosťou reakcie a koncentráciou substrátu, čo je všeobecne chápané ako prítomnosť alosterického enzýmu. V prípade, že sa na podjednotky alosterického enzýmu viaže len substrát za zvýšenia (pozitívnej kooperácie) alebo zníženia (negatívnej kooperácie) aktivity hovoríme o tzv. homotropných efektoroch. Ak nastane situácia, kedy prebiehajúca reakcia nadobudne zmenu aktivity v dôsledku pôsobenia iných druhov molekúl ako substrátových, v reakcii pôsobia zlúčeniny nazvané heterotropné efektoory (napr.: ATP, P_i) (Wilson a Walker, 2010).

Primárny koncept alosterickej aktivity predpokladá existenciu enzýmu fungujúceho v 2 navzájom prechodných stavoch – stav R (relaxed), v ktorom má prevahu komplex proteín-ligand a stav T (tensed), v ktorom má prevahu proteín bez naviazaného ligandu. Jeden zo stavov má vždy aktívnu podobu a rovnováha nastavená medzi oboma stavmi je narušená pôsobením väzby vstupujúcej látky

na alosterické miesto enzýmu do reakcie. Aktivitu a prechody medzi týmito dvoma stavmi opisujú 2 modely alosterickej regulácie: MDW model a KNF model (Blomberg, 2007; Wilson a Walker, 2010).

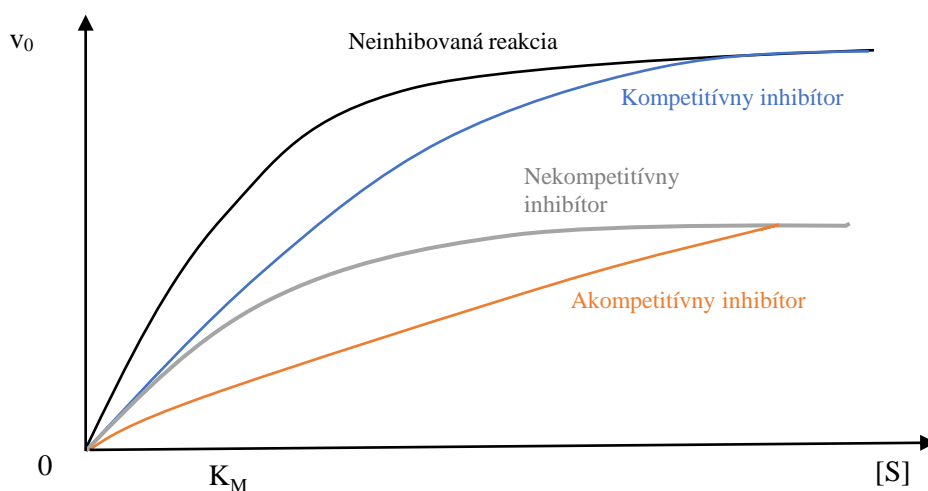
3.1.4 Inhibícia enzymatickej reakcie

Inhibítor je látka znižujúca rýchlosť enzymatickej reakcie. Podľa spôsobu interagovania s enzýmom rozlišujeme niekoľko typov reakcií, akými môže inhibítor vplyvať na priebeh enzymatickej reakcie.

V prípade, že je inhibítor svojou štruktúrou a zložením analogický k substrátu, jedná sa o kompetitívny inhibítor (Lennarz a Lane, 2013). Ten je schopný naviazať sa na aktívne miesto enzýmu, čím zablokuje prístup substrátu a znemožní jeho premenu na produkt. Tento spôsob reakcie možno matematicky dokázať pomocou zmeny uhla Lineweaver-Burkovej závislosti na krivke (Pelley, 2007). Inhibícia je charakteristická zvyšovaním K_M za zachovania V_{max} , teda inhibítor sa naväzuje na aktívne miesto, avšak nebráni vzniku komplexu ES, resp. v tomto prípade EI (Kodíček a Karpenko, 2013).

Nekompetitívna inhibícia je naopak typom reakcie, kedy dochádza k interakcii enzýmu s nekompetitívnym inhibítorom. Ten sa naviaže na iné miesto ako aktívne a spôsobí konformáciu aktívneho miesta do takej podoby, aby sa daný enzým bol schopný naviazať, no zároveň pri prítomnosti naviazaného inhibítora nebol schopný uskutočniť reakciu. Dôkazom takejto reakcie je opätovne zmena v uhle, ale taktiež v priesečníku na osi y súradnicového systému (Campbell a Farrell, 2012; Silverman a Holladay, 2015). V tomto prípade v Lineweaver-Burkovom grafe možno pozorovať zníženie V_{max} za zachovania K_M (Kodíček a Karpenko, 2013).

Ďalším typom inhibície je akompetitívna inhibícia. V tomto prípade sa inhibítor neviaže na enzým, ale na komplex enzým-substrát. Pri vzniku daného komplexu dochádza často k zmenám konformácie na enzýme, čím vzniká miesto pre naviazanie akompetitívneho inhibítora. Komplex enzým-substrát-inhibítor, ktorý vznikne, zablokuje pokračovanie reakcie, teda znemožní vznik produktu. Akompetitívnu inhibíciu nemožno preukázať zmenou uhla Lineweaver-Burkovho grafu ako to bolo možné v predchádzajúcich prípadoch. Matematický dôkaz pôsobenia akompetitívneho inhibítora sa v Lineweaver-Burkovom grafe prejavuje zmenou v priesečníkoch oboch osí za zníženia K_M i V_{max} (Palmer a Bonner, 2011).



Obrázok 4: Grafické vyjadrenie porovnania správania neinhibovanej reakcie, kompetitívnej, nekompetitívnej a akompetitívnej inhibície (ilustračný obrázok).

Kompetitívna, nekompetitívna a akompetitívna inhibícia majú z pohľadu podmienok presne definované, kedy k tomuto stavu dochádza. V prípade, že reakcia spĺňa kinetiku podľa Michaelisa–Mentenovej, ale nie je možné určiť jej konkrétny charakter (kompetitívna, nekompetitívna,...), hovoríme o zmiešanej inhibícii. V praxi sa môžeme stretnúť s viacerými formami zmiešanej inhibície. Jednou z nich je napríklad lineárna zmiešaná inhibícia, kde platí, že väzba substrátu a väzba inhibítora na seba navzájom pôsobia (v dôsledku zmien v konformácii enzýmu) (Palmer a Bonner, 2007; Kodíček et al., 2018).

Dané reakcie možno z hľadiska spôsobu väzby, ktorú inhibítor vytvára naviazaním na enzým, zaradiť medzi reverzibilné inhibície. Existujú však i opačné typy inhibícií, ktoré sa na enzým môžu viazať nekovalentne (pevnou, ireverzibilnou väzbou). Takýmto typom inhibície je napr. väzba ortuťnatých iónov na sulfhydrylové zvyšky v aktívnych miestach enzýmov (Purich, 2010a).

3.2 Neurodegeneratívne ochorenia

3.2.1 Charakterizácia neurodegeneratívnych ochorení

S meniacim sa trendom dĺžky života, ktorý podľa štúdie zo Stanfordskej univerzity narastá a za poslednú generáciu sa zvýšil o 3 roky v porovnaní s predchádzajúcou, t.j. zo 65 rokov na 68 rokov (Zuo *et al.*, 2018), dochádza k zvyšovaniu frekvencie výskytu neurodegeneratívnych ochorení. Sú charakteristické najmä pre osoby s vyšším vekom, čo značí ich stúpajúcu tendenciu v najbližšom období.

Autori sa vo svojich definíciách vzhľadom na charakteristiku neurodegeneratívnych ochorení líšia; ich spoločným znakom je, že sa jedná o heterogénnu skupinu ochorení spojených kľúčovým prvkom degenerácie CNS alebo PNS. Môžu mať jednak hereditárny charakter, no i formu získaného ochorenia. Počiatočný impulz k vzniku ochorenia je v prípade dedičných ochorení zrejмый, u zvyšných druhov je definovaný ako metabolický, dokonca prípadne i traumatický (Kaňovský a Herzig 2007).

Spúšťacie mechanizmy spôsobujúce ochorenia neurodegeneratívneho charakteru nepredstavujú jednoduchý princíp zmeny v Mendelovskej dedičnosti. Tvoria ich komplexy faktorov založených na genetických príčinách i vplyvoch vonkajšieho prostredia. Na molekulárnej úrovni sa jedná primárne o kumuláciu nesprávne zložených proteínov (Forman *et al.*, 2004) typovo charakteristických pre daný druh ochorenia (Macdonald, 1993; Durham *et al.*, 1997). K tomu prispievajú i mnohé ďalšie faktory, a to: mitochondriálna dysfunkcia, oxidatívne poruchy a s nimi spojená kumulácia voľných radikálov, poruchy spojené s transkripciou a transláciou, ale i starnutie organizmu zvyšujúce počet porúch v zaradovaní dusíkatých báz do sekvencie DNA (Rattray *et al.*, 2017).

Napriek výskumom sú stále nedostatočne poznané a spájané ukazovateľom neexistencie liečby, ktorá by ich trvalo odvrátila. Vo väčšine prípadov je terapia zameraná na podpornú liečbu, ktorá nerieši konkrétny problém, ale zmiernuje postupne zhoršujúce sa symptómy.

Pod degeneráciou CNS sú zaradené 2 ochorenia s najčastejšou incidenciou, a to Parkinsonova choroba a do skupiny demencií zaradená Alzheimerova choroba.

3.2.2 Alzheimerova choroba

Dlhú dobu zaradovaná medzi všeobecné označenie demencia spolu s ďalšími nedefinovanými ochoreniami ako vaskulárna (multiinfarktová) demencia, demencia s Lewyho telieskami či frontotemporálna demencia; Alzheimerova choroba bola objavená nemeckým psychiatrom Aloisom Alzheimerom u pacientky Augusty D., u ktorej pri histologickom náleze v mozgu pozoroval prítomnosť plakov či neurofibrilárnych klobiek. Alzheimer označil tieto útvary za unikátne v spojení s príznakmi danej pacientky (zabúdanie, nespavosť, agresivita či progresívne pomätenie) (Alzheimer, 1907) a presvedčil vedecký tím v Mníchove, že sa jedná o novú formu ochorenia.

Impulz k pomenovaniu „Alzheimerova choroba“ prišiel s prípravou novej učebnice o psychiatrii jeho kolegu, Emila Kraepelina, ktorý ako prvý uviedol tento termín v súvislosti s opísanými príznakmi pacientky, na ktorej bol histopatologický nález vykonaný. Kraepelin zaradil ochorenie k senilnej demencii do podkategórie presenilná demencia (Hippius a Neundörfer, 2003). K roku 2015 bolo na svete približne 47 miliónov ľudí trpiacich demenciou, ďalšie predpoklady na najbližšie roky uvádzajú postupné zvyšovanie na približne 132 miliónov k roku 2050 (Prince *et al.*, 2016).

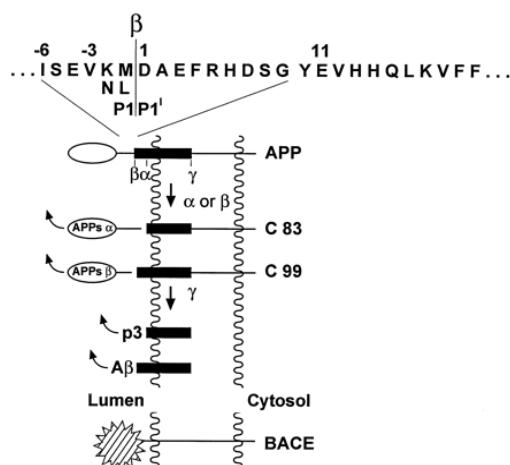
V súvislosti s typickým príznakom ochorenia, progredujúcim zabúdaním, resp. neschopnosťou zapamätávania si nových zážitkov; sa vynorila otázka o konkrétnom mieste vzniku a postupu ochorenia. Podľa štúdií dochádza k neurodegenerácii buniek najprv v častiach mozgu zodpovedných za vytváranie spomienok (mozgová kôra a hipokampus) (Teyler a DiScenna, 1986). Poškodenie neurónov následne pokračuje do ďalších častí mozgu.

Mechanizmy predchádzajúce neurodegenerácii a vyvolávajúce ju sú spojené s vonkajšou (porucha vytvárania synapsí) i vnútornou cestou (prenos vzruchu pozdĺž axónu) fungovania neurónových signálnych dráh.

Vonkajšia cesta, označená ako hypotéza amyloidnej kaskády, podľa ktorej akumulácia a depozícia oligomerných a fibrilárnych A β interagujúcich s neurónovými synapsiami, je primárnym zdrojom ochorenia AD (Hardy a Higgins, 1992). A β má základ v géne umiestnenom na chromozóme 21, ktorý kóduje amyloidný prekursorový proteín (APP). Na základe mutácie tohto génu, ktorý vedie k tvorbe vzácneho typu dedičnej AD, bol experimentálne potvrdený proces vytvárania amyloidných plakov.

A β vznikajúci z ubikvitného proteínu APP v procese proteolytického štiepenia má dĺžku v rozmedzí 40–43 aminokyselín. Jeho produkcia je spojená s dráhou sprevádzanou hlavným enzýmom, β -sekretázou. Identifikovaným typom β -sekretázy je BACE (Vassar *et al.*, 1999), ktorý štiepi APP na produkty C99 a APPs β . C99 je následne ďalej štiepený skupinou γ -sekretáz a produkuje výsledný A β (vid' Obrázok 5). Podobnou dráhou je APP štiepený i α -sekretázou, podľa doposiaľ uverejnených štúdií tvorenou skupinou enzýmov ADAM, konkrétne ADAM 10 (Lammich *et al.*, 1999) a TACE (Buxbaum *et al.*, 1998). Tá štiepi APP na APPs α a C83, ktorý však po štiepení γ -sekretázou nevytvára A β (Vassar *et al.*, 1999).

Strata synaptických spojení, ktorá súvisí vo všeobecnosti s neurodegeneratívnymi ochoreniami, bola pozorovaná najmä v prípade A β v dĺžke 40 a 42 aminokyselín, pričom reťazce vyvolávajúce stav demencie sú ukončené aminokyselinami valín na 40. pozícii alebo alanín na 42. pozícii. Výskumná skupina okolo doktora Näslunda (Näslund *et al.*, 2000) ukazuje, že práve nadprodukcia formy A β ₄₂ je zodpovedná za vznik príznakov spojených s AD. Na druhej strane v porovnaní s touto štúdiou prikladajú iné výskumné skupiny dôležitosť rozpustnej formy A β ₄₀ ako dôležitejšieho prvku indikácie AD patológie (Lue *et al.*, 1999).



Obrázok 5: Štiepenie APP skupinami sekretáz za vzniku A β a vedľajších produktov (prevzaté z Vassar *et al.*, 1999).

O toxicite A β sa uvažovalo od vzniku teórie amyloidnej kaskády. Vzhľadom k povahe A β ako extraneuronálnej štruktúry bolo náročné preukázať jeho toxické účinky. Skupina profesora Mattsona (Mattson *et al.*, 1992) preukázala zvyšovanie koncentrácie intracelulárneho Ca²⁺ v prítomnosti A β , na čo nadviazali Arispe *et al.* (Arispe *et al.*, 1993), ktorí objavili schopnosť rozpustného A β vytvárať kation–selektívny kanál zabudovávajúci sa do membrány. Na základe týchto poznatkov bolo prezentovaná iónová kanálová hypotéza, podľa ktorej A β vytvárajúce membránové iónové kanály sú zodpovedné za nadmerný, resp. nekontrolovateľný, influx vápenatých iónov do bunky, čo značí priamu neurotoxicitu A β a vyvoláva apoptózu neurónov (Mattson *et al.*, 1992).

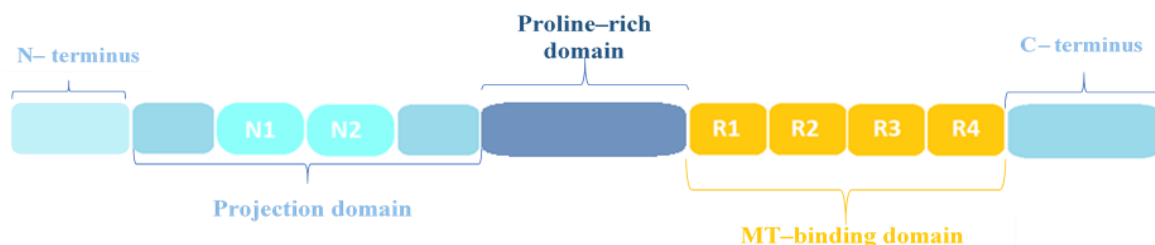
Cestou vnútorného poškodenia neurónov v oblasti prenosu vzruchu axónmi sa zaoberá tau hypotéza. Podľa nej príčinou vzniku AD je proteín tau vo svojej hyperfosforylovanej podobe. Tau patrí do skupiny proteínov podieľajúcich sa na formácii a stabilizácii tubulínových štruktúr (Weingarten *et al.*, 1975). Vychádza z tau génu lokalizovaného v ľudskom tele na dlhom ramienku chromozómu 17, v mieste 17q21 (Neve *et al.*, 1986) z ktorého formou alternatívneho splicingu možno utvoriť 6 jeho izoforiem (v závislosti na prítomnosti, resp. neprítomnosti exónov 2, 3 a 10) (Goedert *et al.*, 1989). Dospelý ľudský mozog produkuje 4R a 3R izofomy tau proteínu, ktorých hyperfosforyláciou dochádza k vzniku párových helikálnych filamentov (Goedert *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1988) vytvárajúcich neurofibrilárne kľbká. Rozdiel 4R a 3R izoforiem spočíva v prítomnosti exprimovaného exónu 10 u 4R tau.

Pre polymerizáciu mikrotubúl pomocou tau proteínu sú dôležité 2 zložky tubulínového základu– 6S voľné podjednotky a 36S špirály vytvorené spájaním 6S voľných podjednotiek, ktoré následne vytvárajú mikrotubulové vlákna. Tubulínové podjednotky existujú v 2 podobách: ako tie schopné premeny na špirály a tie, ktoré špirály nevytvárajú. Vznik špirál je podmienený prítomnosťou tubulínového kofaktora (tau proteín), ktorý reaguje s 6S dimérmymi podjednotkami za vytvorenia komplexu 6S-tau spájaných do 36S špirál formujúcich mikrotubuly (Weingarten *et al.*, 1975).

Vznik neurofibrilárných klobiek (NFT) je podľa doterajších štúdií pravdepodobne podmienený prítomnosťou zvýšeného množstva granulárnych tau oligomérov. Tie sa v menšom množstve vyskytujú i u zdravých pacientov, ktorí v mozgu nemajú prítomné NFT (Maeda *et al.*, 2006). Cielená liečba proti exprimovaniu granulárnych tau oligomérov (v prípade zvýšenej prítomnosti v porovnaní s NFT) je podľa štúdie (Maeda *et al.*, 2007) možným riešením tohto problému.

Osekvenovaním tau proteínu (viď Obrázok 6) boli objavené jednotlivé domény charakterizujúce postavenie a funkciu špecifických oblastí tohto proteínu v axónoch neurónov. N-koniec je orientovaný (tzv. premietaný) smerom od mikrotubulového povrchu, preto je táto oblasť nazvaná projection domain. Oblasť C-konca priamo interaguje s mikrotubulmi, a preto je prezývaná ako MT-binding domain. Predstavuje oblasť výskytu repetitívnych sekvencií 4R (resp. 3R), očíslované R1–R4, ktorá je zároveň v dôsledku priamej manipulácie s mikrotubulmi a ich skladaním najdôležitejším miestom pre ich funkčnosť. Medzi projection domain a MT-binding domain sa vyskytuje oblasť nazvaná ako proline-rich domain, ktorá je schopná asociovať s molekulami aktínu a zahŕňa skupinu epitopov protilátok hyperfosforylovaných vplyvom neuropatií v AD (He *et al.*, 2009). Usporiadanie domén možno pozorovať na priloženom obrázku (viď Obrázok 6).

Mutácie v lokuse FTDP-17 v tesnej blízkosti chromozómu 17 (miesto 17q21) (Clark *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998) či fosforylácie tau proteínu vedú k oslabeniu a inhibícii jeho väzby na mikrotubuly. Tie sú v axónoch zodpovedné za transport látok a vedenie nervového vzruchu. Ich destabilizáciou dochádza k preusporiadaniu do somatodendritických kompartmentov, strate synapsí a mitochondriálnej dysfunkcii. Uvedené kroky sú predlohou pre tvorbu PHF, NFT a následnú neurodegeneráciu. Fosforyláciu ako takú vyvolávajú enzýmy skupiny kináz, a hoci v súvislosti s mikrotubulmi k fosforylácii a defosforylácii dochádza i pri bežných bunkových operáciách, v rámci poškodenia neurónov pôsobí na tau proteín tzv. zvýšená fosforylácia (hyperfosforylácia). Medzi enzýmy vyvolávajúce hyperfosforyláciu zaraďujeme GSK, cdk a MARK (Hanger *et al.*, 1992; Drewes *et al.*, 1997).



Obrázok 6: Jednotlivé domény tau proteínu stanovené jeho osekvenovaním (ilustračný obrázok).

Štúdie výskumných skupín dokázali, že jedným z prvých miest, na ktorých dochádza k hyperfosforylácii, je Ser²⁶² (Hasegawa *et al.*, 1992; Biernat *et al.*, 1993) lokalizovaný v repetitívnej doméne R1 fosforylovanej skupinou MARK. Imunohistochemickou analýzou doplnenou o imunofluorescenčné značenie a Western Blotting bola dokázaná vysoká expresia MARK4 kinázy

na vzorkách pacientov s AD (Lund *et al.*, 2014). Okrem uvedeného Ser²⁶² bolo identifikované ďalšie miesto, v oblasti repetitívnej domény R3, Ser³²⁴ (Carlomagno *et al.*, 2017) výrazne interferujúce so skladaním mikrotubúl, a tým stabilizačnou funkciou tau proteínu vzhľadom na mikrotubuly.

Štúdia zameraná na identifikáciu miest hyperfosforylácie tau proteínu preukázala pozitívnu reakciu v prípade všetkých 20 epitopov hyperfosforylovaného tau (Duka *et al.*, 2013). Tento experiment spolu s ďalšími je dôkazom, že vynímajúc spomínané GSK, cdk a MARK kinázy je pri hľadaní potenciálnych liečiv potrebné zohľadniť interakciu množstva ďalších kináz podieľajúcich sa na modifikácii tau, a tým zmene charakteru jeho správania. Pri liečbe je dôležité vzájomné spolupôsobenie jednotlivých enzýmov a ich vplyv na fosforyláciu tau proteínu vedúcu k sérii krokov vrcholiacich neurodegeneráciou.

Okrem vyššie popísaných ochorení sú s neurodegeneráciou späté i ďalšie poruchy, v populácii percentuálne menej zastúpené, ako napríklad demencia s Lewyho telieskami, amyotrofická laterálna skleróza, Huntingtonova choroba alebo Creutzfeldtova-Jacobova choroba. Každé má svoje typické znaky a spôsob prejavu viazané na zánik neurónov v organizme (Kaňovský a Herzig, 2007).

3.2.3 Aktuálne trendy v terapii Alzheimerovej choroby, cesta prechodu liečiv cez hematoencefalitickú bariéru

Pri komplexnom orgáne, akým je mozog, sa v priebehu jeho vývoja vytvorili unikátne systémy selektívneho prechodu molekúl, ktoré bránia vstupu toxínom a iným škodlivým molekulám a umožňujú prechod živín. Tento systém je výbornou formou ochrany mozgu, avšak obrovskou nevýhodou z hľadiska doručovania liečiv do miesta vznikajúceho problému, ako je tomu pri ochoreniach CNS. V súčasnosti sa vedú podrobné štúdie (Abrahamo *et al.*, 2019; Janowicz *et al.*, 2019; Roux *et al.*, 2019) s cieľom charakterizácie molekúl schopných prekonať najmä hematoencefalitickú bariéru, ktorá predstavuje najčastejšie prekážku pri prechode liečiv do mozgu. Okrem nej je na periférii mozgu prítomná hematolikorová bariéra oddeľujúca mozgovomiešny mok od krvného obehu (Siegel, 1999). Avšak v dôsledku menšej plochy v porovnaní s hematoencefalitickou bariérou nepredstavuje hlavnú dráhu prechodu liečiv do mozgového tkaniva.

V porovnaní s kapilármi v ostatných častiach tela, kde prebieha paracelulárny transport, sa v mozgu stretávame s ich odlišnou stavbou. Vrstva endotelových buniek má medzi sebou veľmi tesné spojenia, ktoré zabraňujú vstupu i najmenších molekúl (Reese a Karnovsky, 1967). Na obvod kapilár zvonku dosadajú astrocyty a pericyty vytvárajúce súvislú vrstvu bariéry, ktorá je zodpovedná za tvorbu a stabilitu kapilárnych štruktúr (Ramsauer *et al.*, 2002). Transport látok prebieha niekoľkými spôsobmi v závislosti na charaktere a príslušných vlastnostiach jednotlivých prenášaných molekúl. Pasívnou difúziou sú transportované malé lipofilné molekuly, resp. molekuly upravené pre účely transportu cez hematoencefalitickú bariéru zvýšením ich lipofility (Weber *et al.*, 1993). Väčšie jednotky glukózy a aminokyselín sú prenášané špecifickými nosičmi (neutrálne nosičový systém, nosičový systém pre bázičné aminokyseliny a nezávislý nízkokapacitný nosičový systém) (Oldendorf a Szabo, 1976).

Veľké molekuly (napr. peptidov) sú prenášané pomocou špecifických receptorov (receptormi sprostredkovaná transcytóza) (Pardridge, 1991) či tzv. absorpčnou transcytózou (Kotyk a Janacek, 1975).

V súčasnosti sú výskumy v oblasti liečiv pre CNS zamerané na obe dráhy, pričom pasívny i aktívny transport so sebou prinášajú odlišné podmienky pre dizajn molekúl prechádzajúcich hematoencefalitickou bariérou. Prevažujúcou pasívnou formou sa transportujú liečivá v podobe malých molekúl s vysoko lipofilným charakterom. Zaujímavou skúmanou formou transportu je spojenie molekuly s liečebným účinkom a nosiča prekonávajúceho hematoencefalitickú bariéru.

Nakoľko hlavnými úskaliami AD sú strata pamäte a porucha kognitívnych funkcií zapríčinená smrťou neurónov a signifikantnou redukciou ich počtu, výskumy sa v súčasnej dobe zameriavajú prevažne na hľadanie liečiv, ktoré by dané poruchy napravili.

Jednou z teórií vzniku ochorenia je kumulácia A β , ktorej vznik je podmienený pôsobením enzýmov na APP, na ktoré sú dlhodobo zamerané niektoré výskumy. Niekoľko rokov sa cielene hľadali liečivá vo forme inhibítorov γ -sekretáz, menovite Semagacestat (Eli Lilly & Co.) (Tagami *et al.*, 2017) a Avagacestat (Bristol-Myers Squibb) (Coric *et al.*, 2015), ktoré boli v dôsledku interakcie s transmembránovou doménou Notch receptorov, a tým pádom narušením ich funkcie, zakázané a ich ďalšie testovanie v rámci liečiv proti AD bolo zrušené (Simutis *et al.*, 2018).

V dôsledku komplikácií spojených s Notch receptormi sa pozornosť presunula na inhibítory zasahujúce priamo A β , ktoré obchádzajú dráhu vplyvu na Notch. Do tejto skupiny patrí EVP-0962 (FORUM Pharmaceuticals, Inc.) (Hung a Fu, 2017) či NIC5-15 (Alzforum), ktoré sa zastavili v 2. testovacej fáze. Podobne neuspokojivé boli i výsledky ďalších testovaní zameraných na pasívnu imunoterapiu cieleňú proti A β , z ktorej posledné testované liečivá Crenezumab (AC Immune) (GEN, 2019) či Aducanumab (Biogen) boli zamietnuté (hoci spoločnosť Biogen opätovne rozbehla ďalšiu testovaciu fázu Aducanumab, nakoľko vo výskume boli dokázané jej pozitívne účinky vo väčších dávkach (Biogen, 2019)). V súčasnej dobe sú v testovacích fázach 2 liečivá, Gantenerumab (Hoffmann-La Roche) (Bohrmann *et al.*, 2012; Rauchenberger *et al.*, 2003) a Solanezumab (Eli Lilly & Co.) (Abbott a Dolgin, 2016), ktoré cieľia na pacientov s dedičnou formou AD (Jessen, 2019). Do dnešného dňa však neexistuje inhibítor proti tvorbe A β , ktorý by prešiel všetkými testovacími fázami a bol by zaradený medzi aplikované liečivá proti AD.

V testovacej skupine liečiv zameraných na tvorbu NFT z tau proteínu sú začlenené liečivá zabraňujúce agregácii tau proteínu do NFT bez ohľadu na fosforyláciu tohto proteínu. Od januára 2018 prebieha testovacia fáza 2/3 pre látku TRx0237 či LMTM (TauRx Therapeutics Ltd), druhú generáciu liečiva Rember odvodeného od metylénovej modrej, ktorá je schopná interagovať s tau-tau väzobnými interakciami a úplne ich prerušiť (Wischnik *et al.*, 1996). Vzhľadom na fosforyláciu tau proteínu boli vyvinuté aktívne imunizačné vakcíny produkujúce protilátky špecificky namierené proti fosforylačným

miestam tau proteínu. Jednou z nich je AADvac-1 (Axon Neuroscience SE), ktorej protilátky sú špecificky namierené na epitopy MT-binding regiónu tau proteínu a v experimentoch na myšiach a potkaních mozgoch viedli k významnej redukcii NFT a nerozpustného tau (Novak *et al.*, 2019). Ďalšou sledovanou vakcínou je lipozomálna ACI-35 (Janssen Pharmaceuticals). V klinickej štúdií na sledovaných laboratórnych myšiach a transgénnych Tau.P301L myšiach produkovalo ACI-35 IgG protilátky špecificky namierené na fosforylovaný tau v miestach Ser³⁹⁶–Ser⁴⁰⁴ (Theunis *et al.*, 2013; Pihlgren *et al.*, 2016). Spoločnosť vykonávajúca klinické testovanie 1b fázy dodnes nezverejnila výsledky.

3.3 Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF

Hmotnostná spektrometria využíva kombináciu tzv. mäkkej ionizácie vzorky zmiešanej s matricou pri stanovení doby letu častice. Hmotnostný spektrometer, v ktorom dochádza k samotnej analýze vzorky, pozostáva z niekoľkých celkov, a to iónového zdroja premieňajúceho zložky vzorky na ióny v plynnom skupenstve, analyzátora hmoty následne vykonávajúceho samotné triedenie molekúl iónov podľa ich príslušnej molekulovej hmotnosti a detektora, ktorý zachytáva jednotlivé roztriedené ióny a umožňuje spracovanie informácií vedúcich k charakterizácii vzorky (Camarasa a Cobo, 2018).

Pri MALDI-TOF na uvedenú zmes matrice a analytu pôsobí krátky laserový pulz, ktorý vyvolá vznik iónov skúmanej vzorky. Preletový analyzátor (TOF) umožňuje detekciu iónov prechádzajúcich urýchľovacím poľom rôznou rýchlosťou na základe ich efektívnej hmotnosti stanovenej z pomeru m/z , kde m predstavuje molárnu hmotnosť častice a z jej elektrický náboj. V práci bol aplikovaný lineárny mód TOF, letová dráha pohybu častíc v tomto móde je priama a slúži pre identifikáciu peptidov či proteínov (Grützmacher *et al.*, 1969; Gross, 2017).

Pred samotným vykonaním analýzy je skúmaná látka primiešaná k matrici, čo umožňuje kokryštalizáciu vzorky do podoby jemných kryštálov. Techník nanášania matrice a vzorky na MALDI dosku je v súčasnosti veľké množstvo, v závislosti na dosiahnutí výsledkov je aplikovaná najvhodnejšia metóda, pri ktorej je dosiahnutá požadovaná homogenita kryštálov, a na ňu nadväzujúca intenzita signálu. Dried-droplet metóda je najbežnejšie aplikovanou a využíva prostého vysušenia nanesej vzorky obsahujúcej zmiešanú matricu s analytom (Karas a Hillenkamp, 1988). Bola použitá i v prípade tejto práce. Pre analýzu spojenú s immunoassayami je vhodná surface preparation (Roth *et al.*, 2013). Na zvýšenie intenzity signálu je používaná metóda rýchleho vyparovania (Vorm *et al.*, 1994). K uvedeným technikám, ktoré svojimi vlastnosťami podávajú lepší signál, vyššiu senzitivitu či lepšiu kvantifikáciu výsledkov patria i mnohé ďalšie: metóda kryštalizácie vo vákuu, metóda overlayer či metóda pomalej kryštalizácie (Xiang a Beavis, 1993; Preisler *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 1999).

Typicky využívanou matricou pre proteomické analýzy je α -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina (HCCA) použitá v metodike tejto bakalárskej práce. Na základe testovania je vhodná pre stanovenie vzoriek do 66 kDa, nielen pre stanovenie peptidov, resp. proteínov, ale i antibiotík či peptidových nukleových kyselín. Z ďalších využívaných matric je známa 3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyfenyl)prop-2-énová kyselina, pod obchodným názvom sinapínová kyselina, vykazujúca veľmi dobrú stabilitu pri analýze vysokomolekulárnych proteínov v prostredí silného vákuu bez tvorby fotochemicky generovaných aduktov (Beavis *et al.*, 1989). Štruktúrne podobná HCCA, 4-chloro- α -kyanoškoricová kyselina (Cl-CCA) vykazuje lepšie výsledky analýz na základe zvýšenia senzitivity a možnej detekcie vyššieho počtu peptidov v danej vzorke, čo bolo potvrdené štúdiou na vzorke BSA (Jaskolla *et al.*, 2008).

4. Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Pre meranie pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF boli použité:

- Enzým MARK4 kináza (Carna Biosciences, kat. č. 02–123)
- CHKtid peptid (SignalChem, kat. č. C10–58)
- MARK/PAR-1 (Sigma–Aldrich, kat. č. 454870)
- Peptidy R1–R4 (SignalChem)
- Staurosporin (Sigma–Aldrich, kat. č. S6942)

4.2 Použité chemikálie, roztoky a súpravy

Použité chemikálie

- Acetonitril (Merck, kat. č. 100030)
- Adenozín-3-fosfát (SIGMA™, kat. č. A2383)
- Dimetylsulfoxid (SIGMA™, kat. č. 1.37117)
- Ditiotritol (SIGMA™, kat. č. D9779)
- Chlorid horečnatý (SIGMA™, kat. č. M4880)
- Kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-yl]etánsulfónová (SIGMA™, kat. č. H3375)
- Kyselina chlorovodíková (SIGMA™, kat. č. 320331)
- Kyselina trifluóroctová (Thermo Scientific, kat. č. 85183)
- α -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina (Bruker Daltonik gmbh, kat. č. 70990)

Použité roztoky a ich príprava

a. Pufor:

71,49 mg HEPES, 28,56 mg MgCl₂ a 92,55 mg DTT rozpustiť v 300 ml destilovanej H₂O; upraviť pH pomocou HCl; prefiltrovať cez filter s pórmami o veľkosti 0,22 μ m do flakóny, udržiavať v chladničke pri teplote do 4 °C

b. ATP:

1,1 mg rozpustiť v 1 ml pripraveného pufu

c. Zásobný roztok pre prípravu matrice:

navážanie matrice HCCA, pričom podľa vzťahu 10 mg matrice je rozpustených v prípravnom roztoku (acetonitril, TFA, H₂O) v objeme 1 ml, teda pre 10 mg HCCA je použitý 1 ml prípravného roztoku

podľa navážky HCCA zmiešanie prípravného roztoku v zložení

acetonitril: TFA: H₂O = 0,8:0,02:0,18

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Analytické váhy Scaltec SBC21 (LEMO21)
- Centrifuga Centrifuge 5810R (Eppendorf)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf)
- Dávkovač reagens Multidrop™ Combi (Thermo Scientific™)
- Hmotnostný spektrometer MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker)
- Chladnička Kombi (Liebherr)
- Liquid handler Echo^(R) 550 (LABCYTE)
- Magnetická miešačka VMS-C7 (VWR ADANCED)
- Mraznička GN 3023 Comfort NoFrost (Liebherr)
- pH elektróda HI 1131B (HANNA INSTRUMENTS)
- Termomixér comfort 1,5 ml (Eppendorf)
- Ultrasonická kúpeľ SONOREX (BANDELIN)

4.4 Použité softvéry

- flexControl 3.4 (Bruker)
- flexAnalysis 3.4 (Bruker)
- mib batch molecule processing v2019.01 (Molinspiration Cheminformatics Software)
- Prism 6.0 (GraphPad Software)
- ACD/ChemSketch Freeware 12.01 (ACD/Labs)

4.5 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

V práci bola použitá reakčná zmes pozostávajúca z pufu, CHKtid peptidu predstavujúceho substrát, enzýmu MARK4 kináza, ATP a pri sledovaní inhibičnej reakcie i príslušného inhibítora.

Optimalizácii predchádzala detekcia CHKtid peptidu vo vode a následne v pufre, ktorej cieľom bolo overiť funkčnosť MALDI-TOF metodiky pre prácu s uvedeným substrátom. K uvedenej zmesi (pufo, peptid, enzým, ATP) bola pridaná matrica HCCA pri dodržaní podmienky aplikácie objemu reakčná zmes : matrica v pomere 1:1. Takto pripravená zmes bola napipetovaná na MALDI dosku a ponechaná na vykryštalizovanie. Pripravené spoty obsahujúce zmes peptid, voda, matrica, resp. peptid, pufo, matrica boli analyzované v hmotnostnom spektrometri MALDI-TOF.

V optimalizačnej časti bol sledovaný vplyv množstva jednotlivých zložiek na výslednú fosforyláciu. Enzymatická reakcia bola najprv testovaná vo väčších objemoch. Následne po overení funkčnosti pri aplikácii vyšších objemov bola testovaná aktivita systému použitím nižších objemov. Zároveň bola simultánne testovaná optimalizácia koncentrácií jednotlivých reagensov. Tieto kroky boli vykonané automatizovane, pomocou vyššie uvedených prístrojov (vid' Zoznam použitých prístrojov a zariadení) pri šetrení množstva aplikovaných reagensov. Pre stanovenie približnej koncentrácie, v akej enzým

reaguje s dostatočnou intenzitou, boli aplikované rôzne množstvá MARK4 pri stabilnej hodnote $44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ATP a $0,13 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ substrátu.

Echo liquid handler je zariadenie, ktoré pomocou ultrazvukovej akustickej sily prenáša protokolom definované množstvo uvedenej tekutiny z tzv. *source plate* na *destination plate*. Za *source plate* je považovaná zvolená doska, z ktorej jamiek sú príslušné látky prenášané do jamiek *destination plate* fyzicky umiestnenej v prístroji nad *source plate*. Peptid a enzým riedený v pufre v pomere 1:3 boli ručne napipetované na dosku s označením 384 LDV, ktorá bola v príslušných krokoch považovaná za *source plate*. Doska bola centrifugovaná pri zadaných parametroch $t = \text{RT}$, 1 120 rpm po dobu 60 s. Na dosku s označením 1 536 LDV bol pomocou prístroja Multidrop do príslušných jamiek napipetovaný objem $1 \mu\text{l}$ pufru a doska bola prekrytá fóliou pre zabránenie odparovania. Po centrifugácii dosky 384 LDV bol na základe vopred pripraveného protokolu prenesený peptid v stabilnom objeme a enzým v rozsahu koncentrácií $0,36\text{--}3,64 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na dosku s označením 1 536 LDV (*destination plate*). K uvedeným preneseným zložkám v jednotlivých jamkách bol pomocou Multidropu pridaný roztok ATP s koncentráciou $44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Výsledná reakčná zmes bola inkubovaná po dobu 1 hodiny pri izbovej teplote. Následne k nej bola pomocou Multidrop prístroja pridaná matrica v objeme zodpovedajúcom reakčnej zmesi. Pripravená zmes s matricou bola opätovne scentrifugovaná pri rovnakých parametroch, t.j. $t = \text{RT}$, 1 120 rpm po dobu 60 s. Pomocou nového protokolu bol daný obsah pôvodne z 1 536 LDV presunutý na MALDI dosku (priskrutkovanej k plastovej báze). Zmes bola ponechaná na vykryštalizovanie a po vyschnutí vložená do hmotnostného spektrometra na zmeranie hodnoty fosforylácie.

Stanovené hodnoty z merania fosforylácie boli vynesené do grafu, na základe ktorého bola zvolená koncentrácia enzýmu s 50% aktivitou, t.j. v hodnote $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Použitá koncentrácia roztoku substrátu bola $0,12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Stanovenie množstva ATP bolo vykonané automatizovane, podobne ako predchádzajúca reakcia. Roztoky boli aplikované v rozmedzí koncentrácií $0,72\text{--}96,90 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Postupnosť krokov bola rovnaká ako v predchádzajúcom prípade.

Na základe výsledkov bol opätovne skonštruovaný graf hodnôt, z ktorých bola zvolená koncentrácia ATP $44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri stabilnej koncentrácii substrátu $0,12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bolo opätovne premerané množstvo aplikovaného enzýmu MARK4 (vid' Tabuľka 3). Reakcia bola automatizovaná použitím rovnakého postupu ako v prvom prípade. Zhodnotením výsledkov meraných v triplikátoch bola stanovená výsledná aplikovaná koncentrácia MARK4 kinázy $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Stanovenie zmeny fosforylácie vzhľadom na vonkajšie faktory, t.j. pH a teplota, bolo vykonané v skúmavke ručným pipetovaním.

Pri optimalizácii pH boli pripravené pufre v rozmedzí 3,1–12,4 napipetované do označených mikroskúmaviiek v objeme 2,8 μl , do pufru bol pridaný 1 μl peptidu s koncentráciou 0,13 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. K daným zložkám bol pipetovaný enzým v objeme 0,2 μl a na záver 3,5 μl ATP vo výslednej koncentrácii 44 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Reakčná zmes bola inkubovaná po dobu 1 h pri RT. Po uplynutí inkubačnej doby bola k zmesi pridaná matrica HCCA v objeme 7,5 μl . Na MALDI dosku bola v duplikátoch napipetovaná príslušná zmes a ponechaná na vykryštalizovanie. MALDI doska bola následne vložená do hmotnostného spektrometra pre zmeranie výslednej fosforylácie.

Hodnotenie vplyvu teploty bolo vykonané obdobne ako optimalizácia pH. Reakčné zmesi boli inkubované jednotlivo v rôznych teplotných podmienkach 1–60 °C. V prípade teploty bola reakčná zmes s matricou napipetovaná v triplikátoch na MALDI dosku a ponechaná na vykryštalizovanie. Po vykryštalizovaní bola vložená do MALDI-TOF hmotnostného spektrometra, kde boli zmerané intenzity jednotlivých pík.

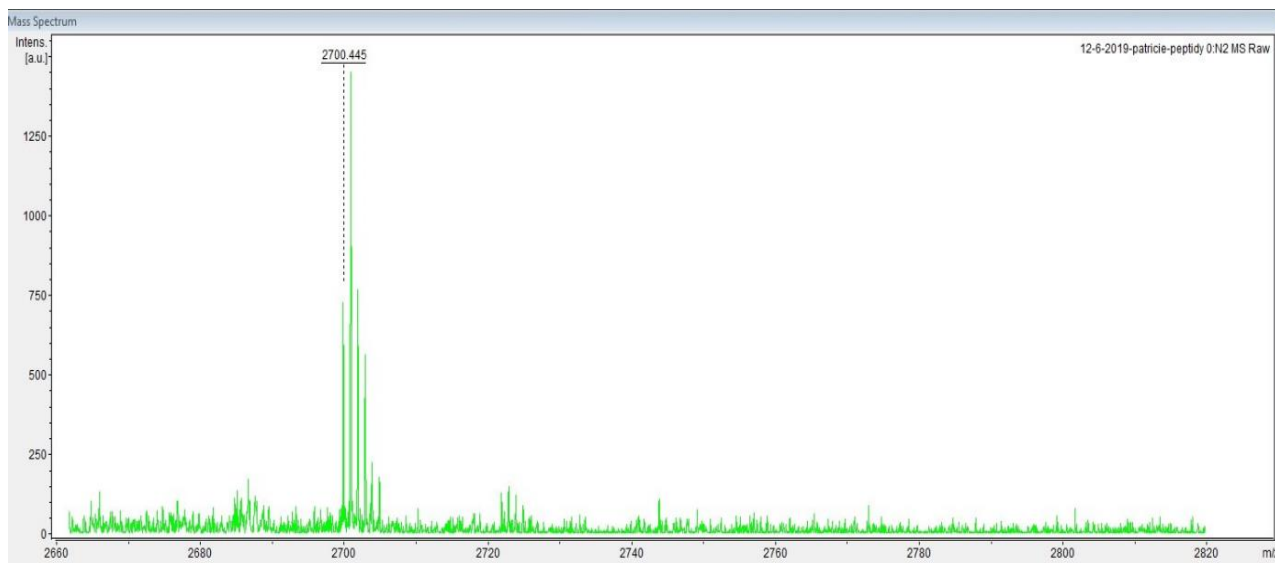
Pre stanovenie zmeny fosforylácie vzorky vplyvom inhibítora, kedy bola opätovne aplikovaná automatizovaná metóda, bol inhibítor (staurosporín, MARK/PAR-1) nariadený na príslušné koncentrácie v doske 1 536 LDV v rozmedzí 0,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ –50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prípade staurosporinu i v prípade MARK/PAR-1 (viď Výsledky, Tabuľka 6, 7). Doska bola centrifugovaná pri zadaných parametroch. Pomocou Multidropu bol do jednotlivých jamiek novej dosky 1 536 LDV napipetovaný pufror v objeme 1,5 μl . Podľa predvoleného protokolu na Echo bol zo *source plate* s inhibítorm prenesený objem 12,5 nl do jamiek *destination plate* s pufrom. Následne protokol prebiehal podobne ako v predchádzajúcich krokoch optimalizácie pri stanovených koncentráciách enzýmu MARK4 riedeného v pomere 1:3 na výslednú koncentráciu 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, substrátu CHKtid peptidu 0,12 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a ATP 44 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Meranie fosforylácie bolo uskutočnené pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF (Bruker) spolu s počítačovým softvérom flexControl (Bruker) spracovávajúcim výsledky na základe vykonanej analýzy. Fosforylácia peptidu bola meraná v pozitívnom móde, pri stanovenej metodike v rozmedzí hmotnosti 2 660–2 820 Da. Pre rozbor premeny peptidu pôsobením enzýmu sa porovnával výsledný fosforylovaný a nefosforylovaný pík CHKtid peptidu, pričom ukazovateľom komparatívnej hodnoty je intenzita zmeraného píku. Výsledky boli zapisované do tabuliek v programe Microsoft Excel. Vynesené grafy boli spracované v štatistickom programe Prism 6.0, do ktorého boli vložené dáta z pripravených tabuliek.

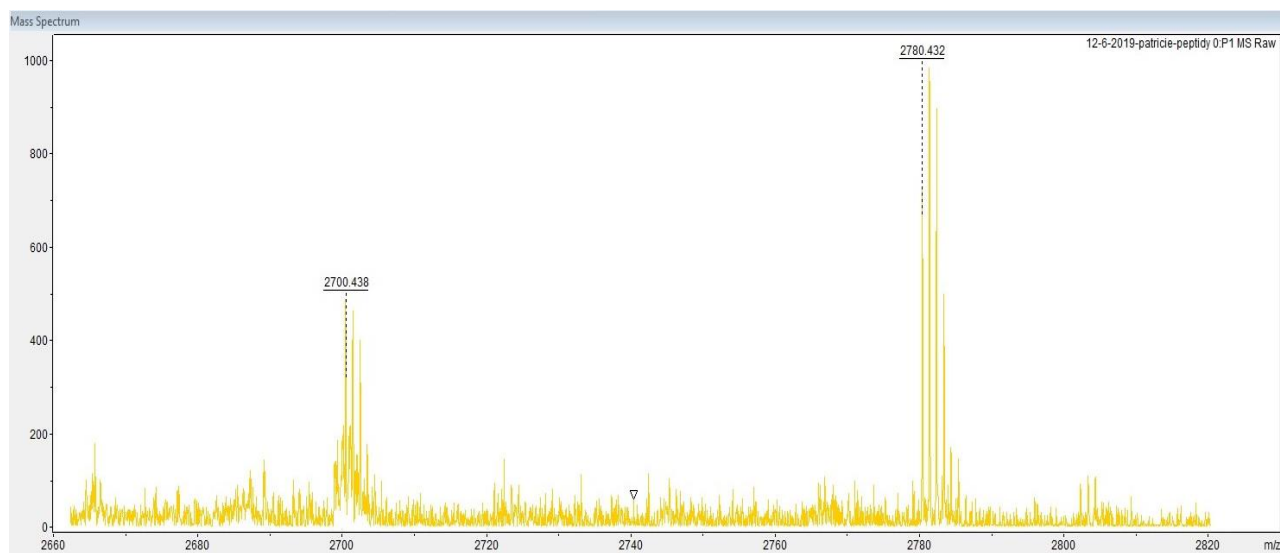
K výsledkom je zaradená i analýza charakteristických parametrov jednotlivých inhibičných molekúl skúmaných pri selekcii liečiv vstupujúcich do CNS cez hematoencefalitickú bariéru, ktorá bola vykonaná pomocou voľne dostupného internetového softvéru od Molinspiration Cheminformatics Software.

5. Výsledky

Experimentálna časť práce bola cielená na vývoj metodiky pre detekciu aktivity enzýmu MARK4 (viď Obrázok 7). Na jednotlivé kroky optimalizácie nadväzovalo testovanie modelových príkladov inhibítorov (staurosporin, MARK/PAR-1) na CHKtid peptide. Výstupom analýzy bolo hmotnostné spektrum, v ktorom porovnávaním pomeru fosforylovaného a nefosforylovaného píku CHKtid peptide danej molekulovej hmotnosti pomocou softvéru flexAnalysis (viď Obrázok 8) bola stanovená miera aktivity daného enzýmu.



Obrázok 7: Hmotnostné spektrum s analyzovanou vzorkou CHKtid peptide bez fosforylácie merané na MALDI-TOF.



Obrázok 8: Hmotnostné spektrum s analyzovanou vzorkou CHKtid peptide s fosforyláciou pri navýšení hmoty o 80 Da merané na MALDI-TOF

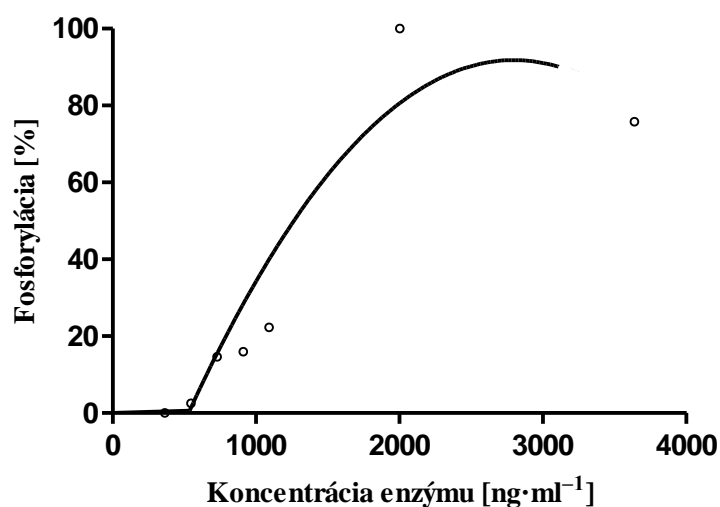
Stanovenie koncentrácie MARK4 kinázy prebiehalo v sérii 2 krokov; v prvom kroku boli sledované zmeny vplyvom stúpajúcej hodnoty MARK4 pri stabilných podmienkach substrátu a ATP.

Hodnota sledovaných koncentrácií bola meraná v rozmedzí od $0,36 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ – $3,64 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Najnižšia použitá hodnota nevykazovala žiadnu fosforyláciu. So stúpajúcou koncentráciou dosiahol enzým bod ekvivalencie v bode koncentrácie MARK4 kinázy rovnej $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viď Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Fosforylácia CHKtidu peptidu vzhľadom na koncentráciu enzýmu MARK4 kináza.

Koncentrácia MARK4 [ng·ml ⁻¹]	Fosforylácia [%]
363	0,00
545	2,55
727	14,65
909	15,92
1 090	22,29
2 000	100,00
3 636	75,80

Pri stúpaní nad $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k ustáleniu systému a fosforylácia nad túto hodnotu už nestúpala. Uvedené postupné zvyšovanie fosforylácie CHKtidu je znázornené v spojnici trendov v grafickom vyobrazení výstupných údajov z tabuľky (viď Graf 1).



Graf 1: Fosforylácia CHKtidu peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu.

Z grafu prvého merania (viď Graf 1) bola vyhodnotená EC_{50} ako oblasť polovičnej aktivity enzýmu, teda 50%-nej účinnosti MARK4 vzhľadom k zvoleným podmienkam, štatisticky aplikovanej pre zvolenie vhodnej hodnoty reaktivity enzýmu. Podľa nej bola zvolená koncentrácia MARK4 kinázy $1,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. S vybranou hodnotou bolo optimalizované množstvo použitého ATP, pričom zvolené koncentrácie boli testované v rozmedzí $0,72$ – $96,90 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

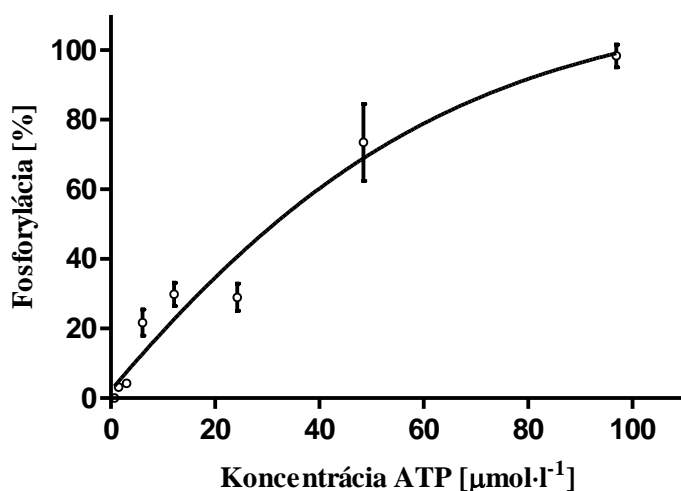
Koncentrácia $0,72 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vykazovala nulovú fosforyláciu. Výraznejšie stúpanie (fosforylácia 24,4 %) bolo zaznamenané až pri hodnote $12,11 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V bode koncentrácie $48,45 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo možné

sledovať takmer 70%-nú fosforyláciu. Oblasť plnej aktivity enzýmu bola prítomná pri koncentrácii 96,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Údaje sú zhrnuté vo výstupnej tabuľke tohto experimentu (viď Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom k zmene koncentrácie ATP.

Koncentrácia ATP [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Fosforylácia [%]			Priemerná fosforylácia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II	Meranie III		
0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,51	3,52	2,83	2,42	2,57	0,84
3,02	4,12	4,44	5,71	4,32	1,11
6,06	25,44	17,89	16,85	16,56	7,98
12,11	33,18	26,46	25,83	24,40	8,84
24,22	32,84	25,09	39,19	30,34	7,06
48,45	62,41	84,48	74,47	67,45	15,55
96,90	101,50	95,05	109,52	100,74	6,45

Podobne ako v predchádzajúcom prípade z výstupných údajov z tabuľky bol zostrojený graf so spojnicou trendov (viď Graf 2), na ktorej možno demonštrovať stúpajúcu fosforyláciu, ktorá sa zastavila v bode s hodnotou 96,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf 2: Zmena fosforylácie substrátu CHKtid peptidu vzhľadom na koncentráciu ATP.

Z údajov v grafe bola vyhodnotená EC_{50} , podľa ktorej bolo následne možné stanoviť optimalizovanú koncentráciu ATP, 44 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V poslednom kroku bolo upravené množstvo použitého enzýmu vzhľadom na optimalizovanú hodnotu ATP. Použitím koncentrácií rovnakých hodnôt ako v predchádzajúcom prípade prvotnej optimalizácie enzýmu bolo možné pozorovať odlišné správanie MARK4 v podmienkach nižšieho množstva použitého ATP, kedy sa fosforylácia pri najnižších hodnotách prejavila len minimálne v rozsahu 1–2 %. Hranicou,

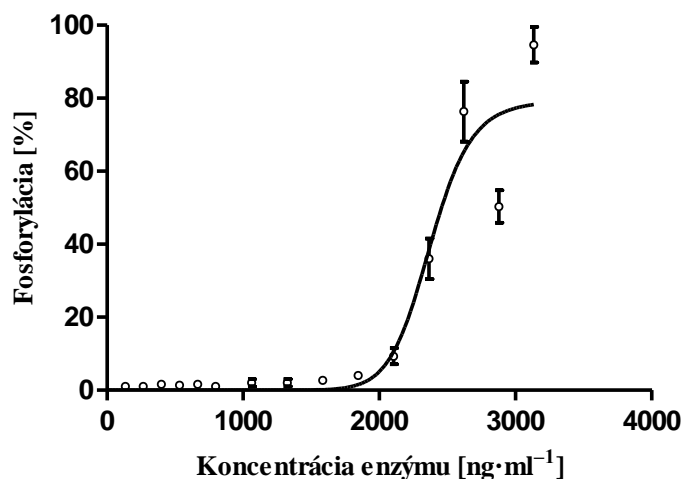
pri ktorej bolo možné pozorovať výraznejšiu fosforyláciu (8,62 %), je koncentrácia 2,103 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzýmu.

Hodnota, pri ktorej za použitia stanovenej koncentrácie enzýmu MARK4 kináza dosiahol fosforylovaný peptid 84%-nú aktivitu, bola 2,619 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Najvyššia fosforylácia bola pozorovaná pri najvyššej koncentrácii 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Všetky hodnoty sú podrobne zaznamenané vo výstupnej tabuľke (viď Tabuľka 3).

Tabuľka 3: Fosforylácia CHKtid peptidu enzýmom MARK4 kináza pri zoptimalizovanom ATP.

Koncentrácia enzýmu [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Fosforylácia [%]			Priemerná fosforylácia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II	Meranie III		
133,42	1,32	0,63	0,69	0,88	0,31
266,57	1,02	0,61	1,09	1,05	0,21
399,46	0,96	0,95	2,52	1,74	0,74
532,10	1,67	0,72	0,86	1,27	0,42
664,48	1,17	1,57	2,50	1,83	0,55
796,60	1,26	0,68	0,97	1,12	0,23
1 060,08	0,52	1,25	3,73	2,12	1,37
1 322,53	0,95	4,12	1,24	1,10	1,43
1 583,98	2,51	2,47	3,30	2,90	0,38
1 844,41	3,84	3,93	3,50	3,67	0,19
2 103,85	5,49	10,89	11,75	8,62	2,77
2 362,28	46,51	29,59	30,86	38,69	7,70
2 619,73	85,87	60,37	82,65	84,26	11,34
2 876,20	44,43	47,98	59,29	51,86	6,34
3 131,68	99,85	98,52	85,00	92,42	6,71

Ilustrovaným vyjadrením stúpajúcej hodnoty fosforylácie je spojnica trendov zobrazujúca vzťah zmeny koncentrácie MARK4 kinázy a priebehu enzymatickej reakcie na danom substráte (CHKtid peptide) (viď Graf 3). Z uvedených grafických údajov bola stanovená hodnota EC_{50} , podľa ktorej bola určená koncentrácia enzýmu MARK4 pre ďalšie použitie, a to 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 3: Fosforylácia CHKtid peptidu v optimalizovaných podmienkach koncentrácie ATP a MARK4.

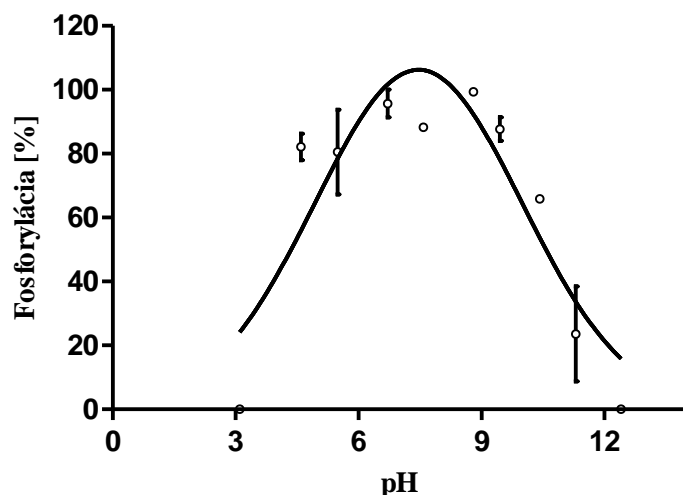
Pre optimalizáciu bolo ďalej nutné stanoviť podmienky prostredia (pH a teplota), ktoré majú vplyv na správne fungovanie enzýmu MARK4 kináza.

Pri stanovovaní optimálneho pH vykazoval enzým najvyššiu aktivitu v hodnote pH 8,8. Nulovú aktivitu MARK4 kinázy bolo možné pozorovať pri hraničných hodnotách pH 3,1 a 12,4. V hodnote pH 7,5 (definovanej výrobcom ako i použitej v danej metodike) dosiahla miera fosforylácie priemerne 88,29 % so stanovenou odchýlkou $\pm 0,06$ % (viď Tabuľka 4).

Tabuľka 4: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom na rozdielne pH použitého pufru.

pH	Fosforylácia [%]		Priemerná fosforylácia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II		
3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
4,59	86,26	77,97	82,12	4,15
5,49	67,25	93,78	80,52	13,27
6,71	91,37	100	95,69	4,32
7,58	88,23	88,35	88,29	0,06
8,80	100,00	98,71	99,36	0,65
9,45	84,07	91,31	87,69	3,62
10,42	65,06	66,63	65,85	0,78
11,30	38,45	8,7	23,58	14,88
12,40	0,00	0,00	0,00	0,00

Krivka fosforylácie peptidu mala vzhľadom na dosiahnuté hodnoty parabolický priebeh pre jednotlivé pufrы o stúpajúcom pH (viď Graf 4).



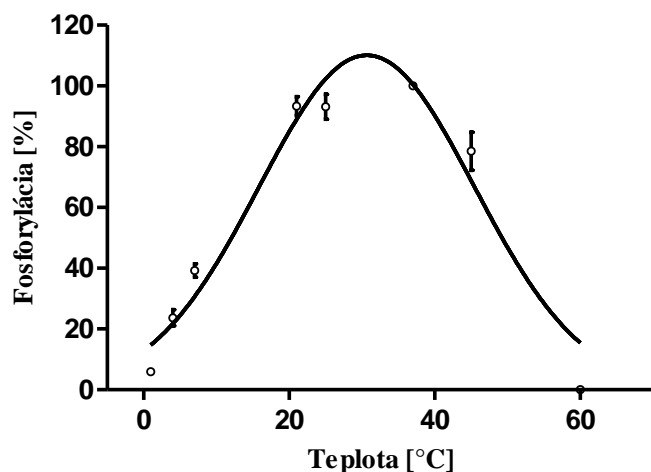
Graf 4: Zmena fosforylácie CHKtid peptidu vzhľadom na pH pufru

Výsledky stanovené pri testovaní optimálnej teploty vykazovali najvyššiu aktivitu enzýmu pri teplote $t = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$, ktorá bola definovaná i pre použitie v danej metodike (vid' Tabuľka 5). Nefosforylovaný stav CHKtid peptidu bol pozorovaný v hraničnom teplotnom bode $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najnižšia hodnota fosforylácie bola dosiahnutá v teplotnom bode $1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabuľka 5: Fosforylácia CHKtid peptidu v rôznych teplotných podmienkach.

Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Fosforylácia [%]			Priemerná fosforylácia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II	Meranie III		
1	6,19	6,33	5,44	5,99	0,48
4	19,21	28,44	23,40	23,68	4,62
7	43,63	36,63	37,57	39,28	3,80
21	92,63	88,35	99,03	93,34	5,38
25	95,49	85,18	98,71	93,13	7,07
37	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
45	66,20	86,05	83,25	78,50	10,74
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

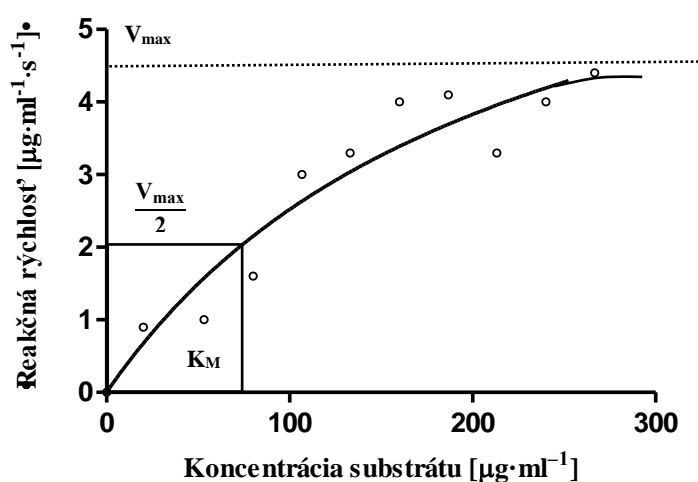
Pre dosiahnuté hodnoty bola stanovená krivka v tvare paraboly (vid' Graf 5). Teplotný bod s počiatočnou nulovou fosforyláciou bol stanovený pod hodnotu $1\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri teplote nad $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bol viditeľný postupný pokles fosforylácie.



Graf 5: Fosforylácia CHKtid peptidu vzhľadom na teplotu prostredia.

K stanoveniu aktivity MARK4 a jej zmenám vplyvom pôsobenia jednotlivých podmienok prostredia podľa enzymatickej kinetiky patrí i parameter reakčnej rýchlosti meniacej sa vzhľadom na stúpajúcu koncentráciu substrátu, ktorá bola testovaná následne po vyššie uvedenej optimalizácii metodiky.

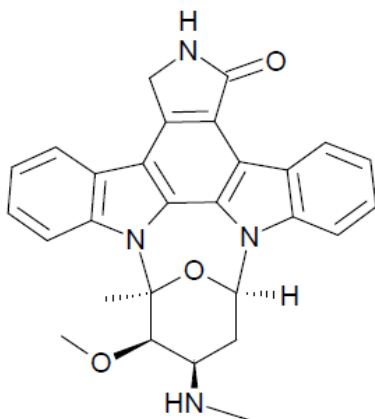
Vložení vstupných údajov do programu Prism pri zvolení kinetiky podľa Michaelisa–Mentenovej bolo možné zostaviť graf, v ktorom spojnice bodov predstavuje saturačnú krivku sýtenia enzýmu substrátom v tvare sigmoidy (vid' Graf 6) ako vyplýva z teoretického podkladu. Zo stúpajúcou hodnotou koncentrácie je možné pozorovať zvyšovanie reakčnej rýchlosti vplyvom vyššej reaktivity molekúl substrátu CHKtid peptidu s MARK4 enzýmom. Hodnota K_M stanovená z výpočtu programu Prism je $92,58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 6: Saturačná krivka zmeny reakčnej rýchlosti vplyvom sýtenia enzýmu CHKtid peptidom podľa Michaelisa-Mentenovej.

Po optimalizácii a overení platnosti podmienok v danom protokole podľa vyššie stanovených kritérií bolo možné ďalej testovať aktivitu jednotlivých inhibítorov. V práci boli použité 2 inhibítory: staurosporín a MARK/PAR-1.

Staurosporín (viď Obrázok 8) je inhibítor, ktorý sa nešpecificky viaže na ATP-väzobné miesto kinázy. Z použitých rozmedzí koncentrácií $0,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo možné pozorovať najprv 9%-nú inhibíciu pri koncentrácii $0,002 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. So stúpajúcou hodnotou staurosporínu sa postupne priamoúmerne zvyšovala inhibícia reakcie. Od bodu $0,63 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pri postupnom zvyšovaní množstva staurosporínu bolo zameraných 100 % inhibície reakcie. Smerodajná odchýlka daného typu inhibície staurosporínom dosiahla pri najvyššom rozptyle 2,37 % s asymptotickým približovaním k hodnote 0 prihliadajúc na výsledky, ktoré dosahovali od uvedenej koncentrácie $1,25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hodnotu 100 %. Stanovená hodnota polovice maximálnej inhibičnej konštanty IC_{50} určená pomocou programu Prism bola $19,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dané údaje možno pozorovať spracované v tabuľke (viď Tabuľka 6).

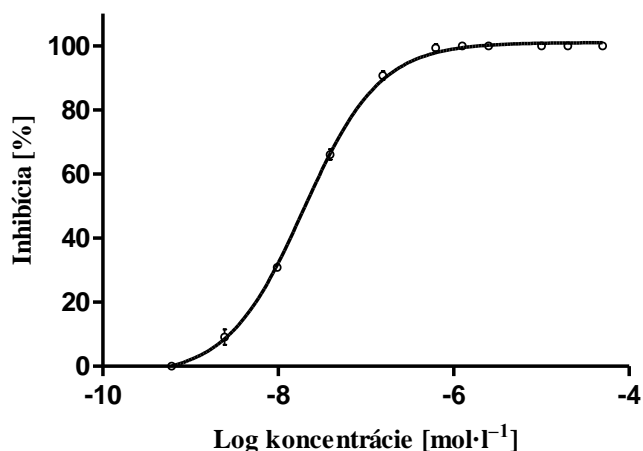


Obrázok 8: Štruktúra staurosporínu.

Tabuľka 6: Vplyv zmeny koncentrácie staurosporínu na inhibíciu MARK4 kinázy.

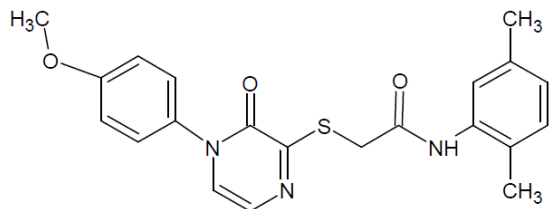
Koncentrácia [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Inhibícia [%]			Priemerná inhibícia [%]	SD[%]
	Meranie I	Meranie II	Meranie III		
0,0006	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,002	6,40	10,50	10,50	9,13	2,37
0,01	30,78	30,93	30,78	30,83	0,09
0,04	65,99	64,51	67,70	66,07	1,60
0,16	89,90	92,31	89,90	90,70	1,39
0,63	100,00	100,00	98,00	99,33	1,15
1,25	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
2,50	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
10,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
20,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00

Priebeh inhibície možno pozorovať v uvedenom grafe (viď Graf 7), kde je formou spojnice bodov vyjadrené lineárne stúpanie inhibície reakcie, ktorá postupne prechádza do formy priamky.



Graf 7: Inhibícia MARK4 kinázy vzhľadom k zmene koncentrácie staurosporínu.

Spolu s nešpecifickým inhibítorom staurosporínom bol zároveň testovaný inhibítor označený ako MARK/PAR-1 (viď Obrázok 9), ktorého vyšší potenciál spočíva v jeho špecifickom pôsobení na MARK enzýmy.



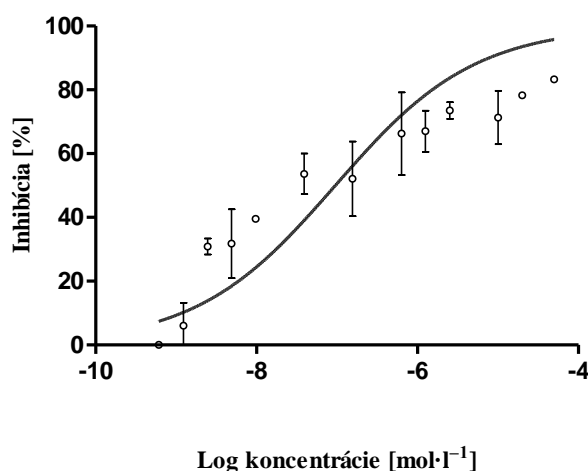
Obrázok 9: MARK/PAR-1 inhibítor aktivity.

V uvedenom rozsahu použitých koncentrácií 0,6 nmol·l⁻¹–50 μmol·l⁻¹ možno sledovať pomerne lineárny nárast inhibície. Najvyššia smerodajná odchýlka ± 12,99 % je pozorovateľná v bode 0,625 μmol·l⁻¹ v dôsledku zjavnej nesúrodosti v stanovenej inhibícii 75,44 % a 57,07 %. Rozptyl hodnôt možno pozorovať vo viacerých prípadoch meraní, pričom smerodajná odchýlka u jednotlivých výsledkov kolíše od 2,51 % v prípade koncentrácie 2 nmol·l⁻¹ až po najvyššiu spomínanú hodnotu 12,99 % pri meraní koncentrácie 0,625 μmol·l⁻¹. Napriek uvedeným skutočnostiam možno pozorovať stúpajúci trend inhibície so zvyšujúcou sa koncentráciou, ktorý dosahuje hodnotu ≥ 70 % v bode 2,5 μmol·l⁻¹. Pozorované údaje sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke (viď Tabuľka 7). V prípade použitej látky MARK/PAR-1 je z tvaru krivky stanovená IC₅₀ = 6,5 μmol·l⁻¹.

Tabuľka 7: Vplyv použitých koncentrácií MARK/PAR-1 na inhibíciu MARK4 kinázy.

Koncentrácia [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Inhibícia [%]		Priemerná inhibícia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II		
0,0006	0,00	0,00	0,00	0,00
0,001	11,12	0,95	6,04	7,19
0,002	29,08	32,63	30,86	2,51
0,005	24,15	39,38	31,77	10,77
0,010	39,52	-	39,52	-
0,039	58,15	49,16	53,66	6,36
0,156	43,82	60,35	52,09	11,69
0,625	57,07	75,44	66,26	12,99
1,25	62,44	71,59	67,02	6,47
2,50	75,39	71,68	73,54	2,62
10,00	65,41	77,25	71,33	8,37
20,00	78,3	-	78,30	-
50,00	83,3	-	83,30	-

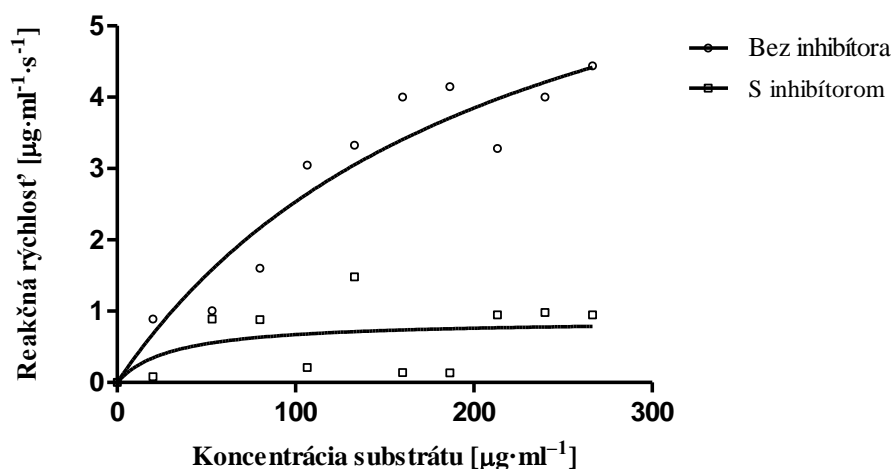
Stúpajúci trend inhibície možno pozorovať i v grafickom vyjadrení závislosti zmeny koncentrácie na percentuálnej inhibícii reakcie, ktorá má tvar krivky začínajúcej v oblasti 25%-nej inhibície s postupným nárastom až k 75 % (viď Graf 8).



Graf 8: Inhibícia MARK4 kinázy vzhľadom na koncentráciu MARK/PAR-1 inhibítora.

Z hľadiska skúmania kinetických parametrov možno sledovať vplyv inhibítora na zmenu reakčnej rýchlosti porovnaním s reakciou bez inhibície ako je uvedené i v grafe saturačnej krivky sýtenia enzýmu substrátom (viď Graf 6). Vynesením hodnôt zmeny intenzity fosforylácie v čase v jednotlivých stanovených bodoch koncentrácie prítomného substrátu CHKtid peptidu (viď Graf 9) možno sledovať uvedený priebeh inhibície a stanoviť jej druh na základe porovnania výsledného grafu s údajmi spracovanými v teoretickom podklade pre inhibičné reakcie. Z poskytnutých výsledkov možno stanoviť

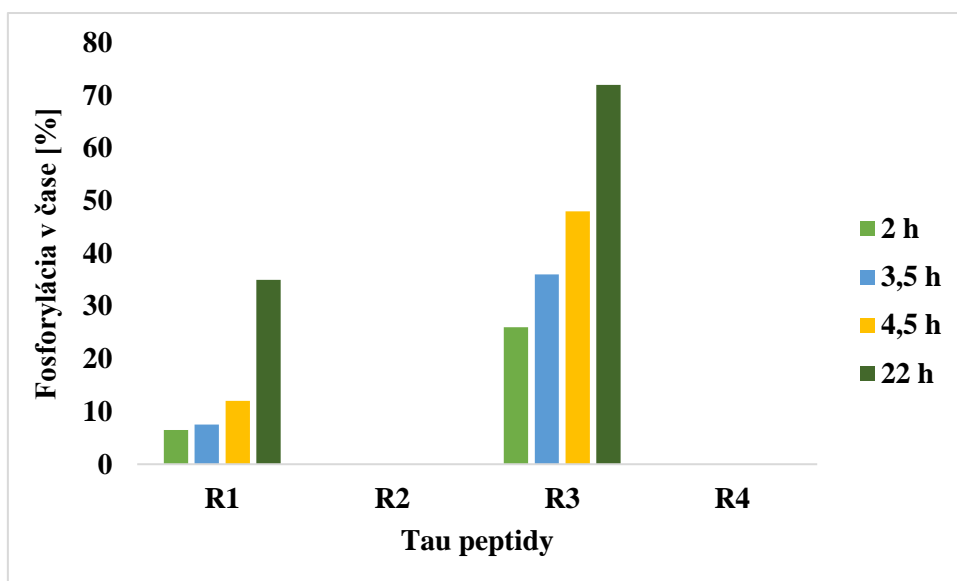
typ inhibície ako nekompetitívnej, keďže ani použitím nadbytku substrátu nedošlo k zvýšeniu V_{\max} , tým pádom molekula nekompetuje so substrátom.



Graf 9: Zmena reakčnej rýchlosti vplyvom aplikácie inhibítora.

Nakoľko optimalizácia i samotné testovanie bolo vykonané na CHKtid peptide, ktorý je univerzálnym substrátom pre kinázové assaye, pre overenie skutočnej platnosti na cieľnom prvku terapie, tau proteíne, bola optimalizovaná assay použitá i na peptidoch R1–R4 z MT-binding domain tau proteínu. Priebeh reakcie bol testovaný vo vyšších časových odstupoch v porovnaní s inkubáciou CHKtid peptidu v rozmedzí 2–22 h.

Stúpajúca fosforylácia bola pozorovaná v prípade peptidu R1 a R3. Ich stúpanie malo lineárny charakter, peptid R1 mal porovnateľne slabšiu fosforyláciu ako peptid R3. V prípade peptidu R1 bolo prvotné meranie po 2 h mierne pod 10 %, nad túto hodnotu stúpala fosforylácia po 4,5 h. Najvyššie dosiahnuté meranie bolo po 22 h 35 %. Peptid R3 vykazoval výrazné stúpanie fosforylácie pri 2 h nad 20 %. Lineárnym stúpaním bola postupne po 4 a 4,5 h dosiahnutá takmer 50%-ná fosforylácia a po uplynutí 22 h bola prekročená hodnota 70 %. Uvedené údaje možno pozorovať v priloženom grafe, kde fosforylácia v časovom priebehu je vyjadrená v stĺpcovom prevedení (viď Graf 10).



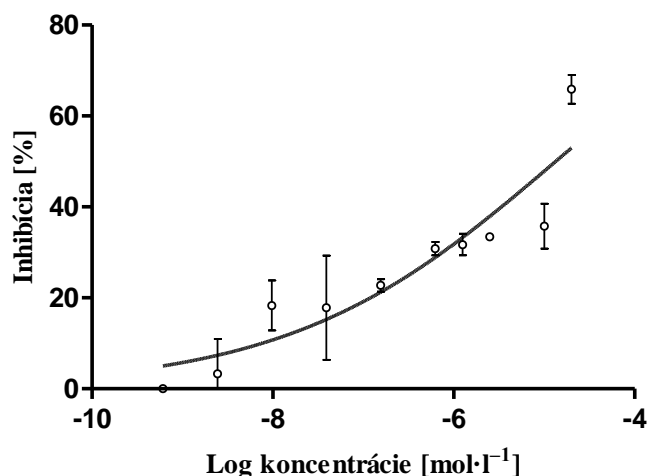
Graf 10: Fosforylácia jednotlivých sekvencií (R1–R4) tau peptidov v rôznych časových bodoch.

Na základe vykonanej optimalizácie a testovania modelových inhibítorov bol následne na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny vykonaný skrining látok vychádzajúci z látky L1, ktorej štruktúrny základ mal potenciál pre syntézu od nej odvodených inhibítorov. V testovanom rozsahu koncentrácií dosiahla najvyššej inhibície 65,87 % v bode $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ so stanovenou smerodajnou odchýlkou $\pm 3,19$ %. Inhibičná aktivita bola lineárneho charakteru pohybujúc sa od 3,33 % pri druhej najnižšej koncentrácii $0,002 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až po najvyššiu uvedenú koncentráciu $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pri 65,87%-nej inhibícii. Odchýlky meraní dosahovali 0,75–11,46 % v bodoch $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre najnižšiu a najvyššiu SD. Uvedené údaje možno pozorovať v priloženej tabuľke (vid' Tabuľka 8).

Tabuľka 8: Inhibícia aktivity MARK4 kinázy pôsobením látky L1.

Koncentrácia [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Inhibícia [%]			Priemerná inhibícia [%]	SD [%]
	Meranie I	Meranie II	Meranie III		
0,0006	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,002	-5,00	10,00	5,00	3,33	7,64
0,01	20,82	12,00	22,12	18,31	5,51
0,04	25,00	4,59	23,83	17,81	11,46
0,16	24,14	21,39	22,70	22,74	1,38
0,63	29,55	32,46	30,50	30,84	1,48
1,25	32,86	33,30	29,00	31,72	2,37
2,50	33,00	34,30	33,00	33,43	0,75
10,00	30,14	39,20	38,00	35,78	4,92
20,00	62,46	66,38	68,77	65,87	3,19

Výstupné údaje z tabuľky boli spracované v programe Prism 6.0 ako dose–response inhibičný vzťah, na základe ktorého bol zostrojený graf závislosti percentuálnej zmeny inhibície vzhľadom na koncentráciu použitej látky L1 (vid' Graf 11). Z údajov bola vyhodnotená $IC_{50} = 13,38 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf 11: Inhibícia MARK4 inhibítorom L1.

Použitím voľne dostupného softvéru Molinspiration Cheminformatics Software boli zanalyzované vlastnosti jednotlivých molekúl použitých v inhibičných reakciách (staurosporin, MARK/PAR-1) vrátane látky L1 a od nej odvodené látky TD1 zvolenej z meraní na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny aplikovanej pri charakterizácii a výbere potenciálnych liečiv ako súčasť tzv. drug design. K uvedeným analýzám bolo priradené i liečivo donepezil farmaceuticky schválené pre liečbu AD.

Pri stanovovaní sú do úvahy vzaté programom vypočítané vlastnosti: molárna hmotnosť v rozsahu hodnôt 379,5 Da u donepezilu až po 473,51 Da u TD1; čiastkový koeficient logP sa pohybuje v rozmedzí 0,62–4,10 pre uvedené molekuly L1 až donepezil; PSA predstavujúca súčet všetkých polárnych atómov prítomných na povrchu molekuly je v škále od 38,78 Å u donepezilu po 136,18 Å u L1. Molárny objem V_M ako parameter prihliadajúci na schopnosť prechodu molekúl cez hemoencefalitickú bariéru má rozsah 340–410 Å³ s najnižšou hodnotou u L1 a najvyššou u staurosporinu. Hodnoty nON a nOHNH predstavujúce parametre donorov (nON), resp. akceptorov (nOHNH) vodíkových väzieb v danom systéme majú nízke číselné hodnoty rádovo do desiatky; nON počty sa pohybujú v najvyššej hodnote 10 pre látku L1 a najnižšej rovnej 4 pre uvedený donepezil. nOHNH boli analyzované pre príslušné molekuly v rozsahu 0–3. Všetky číselné údaje možno sledovať v prehľadnej tabuľke uvedenej nižšie (viď Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Vybrané parametre charakteristiky inhibičných molekúl MARK4 a liečiva AD donepezilu pre drug design.

	staurosporin	MARK/PAR-1	L1	TD1	donepezil
LogP	3,88	3,43	0,62	3,96	4,10
PSA [Å]	69,46	73,23	136,18	113,78	38,78
Mr [Da]	466,54	395,48	445,37	473,51	379,5
V_M [Å³]	410,25	352,04	341,33	387,06	367,89
nON	7,00	6,00	10,00	8,00	4,00
nOHNH	2,00	1,00	3,00	3,00	0,00

6. Diskusia

Výsledkom tejto práce sú dáta z optimalizácie fosforylačnej reakcie enzýmu MARK4 kinázy reagujúcej s CHKtid peptidom. Metodika bola testovaná i na jednotlivých peptidoch (R1–R4) príslušnej sekvencie danej časti ľudského tau proteínu prítomného v axónoch neurónov, ktoré sú vplyvom hyperfosforylácie považované za jednu z príčin vzniku neurodegeneratívneho ochorenia ako je Alzheimerova choroba (Goedert *et al.*, 1988; Chin *et al.*, 2000). V práci je ďalej definovaná a experimentálne preukázaná optimálna teplota a pH prostredia pre MARK4, ako hlavné faktory vplývajúce na priebeh všetkých enzymatických reakcií (Campbell a Farrell 2012; Robinson 2015) a testovanie inhibítorov ako potenciálnych liečiv ochorenia Alzheimerova choroba.

6.1 Aplikácia hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF v porovnaní s inými dostupnými metódami pre enzymatické assaye

Charakterizácia práce z hľadiska porovnania s obdobnými výskumami zaoberajúcimi sa enzymatickou aktivitou a vplyvom enzýmov na rôzne pochody, kde použitá metodika je založená na spektrofotometrických (Simons a Gibson, 1999; Vermeirssen *et al.*, 2002; Hammond *et al.*, 2010), príp. fluorescenčných analýzach (Browning, 1972; He *et al.*, 1994; Gubareva *et al.*, 2002;), prináša vzhľadom k použitej hmotnostnej spektrometrii iný pohľad na spracovanie.

Enzymatická aktivita je pri spektrofotometrických meraniach určená ako vplyv zmeny absorbancie žiarenia vzhľadom na poskytnutie detekovateľnej zlúčeniny produktom. Takouto zlúčeninou je prevažne redukovateľné NAD(P)^+ , resp. oxidovateľné NAD(P)H (Illingworth, 1985). Nakoľko väčšina enzýmov prirodzene nevykazuje optické vlastnosti a najmä ich zmenu, prechod redoxného stavu zlúčeniny je vyvolaný reakciou s pomocnými enzýmami.

Pre optimálny priebeh reakcie je nutné zabezpečiť, aby zmena aktivity skúmaného enzýmu nesúvisela priamo s množstvom aplikovaných pomocných enzýmov, resp. aby za daných podmienok obsah pomocných enzýmov reakčnej zmesi zodpovedal množstvu prítomného sledovaného enzýmu (Kruger, 1995). Ďalej je potrebné prihliadnuť na fakt, že pomocné enzýmy sú často citlivé na vplyv kontaminantov spôsobujúcich skresľovanie reakcií a vyvodzovanie chybných výsledkov. Kontaminanty nebývajú prirodzene súčasťou len jedného prvku enzymatickej reakcie, ale môžu sa nachádzať vo viacerých jej komponentoch a i v malých množstvách (Rowntree a Kruger, 1992) vyvolať odlišnú odpoveď.

Fluorescenčná spektroskopia je vysoko citlivá a selektívna metóda využívajúca schopnosť látky aplikáciou svetelného lúča istej vlnovej dĺžky emitovať žiarenie. Vo väčšine prípadov látky nie sú schopné sami žiarenie emitovať, neobsahujú fluorofor, preto je k takýmto zlúčeninám pridaný (Lakowicz, 2006). Najväčšou nevýhodou fluorescenčných meraní je podliehanie efektu photobleachingu, ku ktorému dochádza v dôsledku deštrukcie samotného fluoroforu (Waters, 2013).

Jednak môže byť vyvolaná pôsobiacim pulzom žiarenia pri viacnásobnom meraní, ale i vplyvom svetelných lúčov pri prenose, resp. inkubácii zmesi. Stanovenie absorbančie, rovnako ako i vyžiareného kvanta je veľmi úzko späté s prostredím, v ktorom sa daná zmes s fluoroforom nachádza. Citlivo reaguje na zmeny pH a teploty, príp. koncentráciu niektorých iónov v roztoku a vzhľadom na ne dochádza k odlišnostiam (resp. skresleniam) pri stanovení emisnej vlnovej dĺžky (Gaigalas *et al.*, 2001).

V praxi najmä v minulosti aplikovanou metódou boli enzýmom katalyzované reakcie uvoľňujúce rádioaktívny prvok. Kľúčovým detegovaným prvkom bola zmena intenzity rádioaktivity (Winteringham a Disney, 1962; Dixit a Cuestas, 1973; Bourguet *et al.*, 2003). Výrazným problémom tejto metodiky je dostupnosť rádioaktívne značených substrátov reakcie, avšak z hľadiska bezpečnosti najmä zvyšovanie intenzity rádioaktivity a nakladanie s týmito látkami, ktoré nie sú prirodzene degradabilné vo voľnom prostredí. V súčasnosti je táto metóda s úpravami aplikovaná napríklad pre stanovenie aktivity enzýmov kľúčových v procesoch súvisiacich s tyroidnými hormónmi (Pavelka, 2010).

V porovnaní s uvedenými metódami je hmotnostná spektrometria technikou nevyžadujúcou značenie, rádioaktívne či fluorescenčné prvky, ani pomocné enzýmy, ktoré by spôsobovali kolorimetrické zmeny. Taktiež umožňuje aplikáciu menšieho množstva reagensí pri zachovaní kvality výsledkov (Northrop a Simpson, 1997). Prednosťou naprieč metódami je taktiež chemická stabilita aplikovaných spotov, ktorá pri uchovaní v bežných laboratórnych podmienkach umožňuje meranie i s väčším časovým odstupom na rozdiel od spektrofotometrických metód, kde je meranie nutné vykonať ihneď.

Veľkou výhodou MALDI-TOF je vysoká citlivosť detekcie a rýchlosť analýzy. Je charakteristická značnou odolnosťou vzhľadom na prítomnosť solí a rozličných pufrov či prípadných kontaminantov reakcie (Kang *et al.*, 2000). Je nutné podotknúť, že MALDI-TOF je spájaná s nižšou robustnosťou, nakoľko pri kryštalizácii matrice dochádza k nerovnomernému rozptylu vzorky, a tak k zníženiu reprodukovateľnosti údajov v rámci analyzovaných spotov (Liesener a Karst, 2005; Bouschen a Spengler, 2007).

Tento problém možno riešiť optimalizáciou protokolu, najmä vzhľadom na použitý typ matrice, jej pomerom k aplikovanému analytu, rozličnými aplikáciami matrice a vzorky na MALDI dosku zohľadňujúcimi rýchlosť uschnutia napr. použitím fast evaporation metódy (Vorm *et al.*, 1994) či použitého rozpúšťadla potenciálne interferujúceho pri precipitácii polymérov (Yalcin *et al.*, 1998), ktoré môžu výrazne znížiť nehomogenitu distribúcie analyzovaných látok. Spolu s použitými štandardmi možno MALDI-TOF aplikovať na enzymatické assaye s dobrou mierou reprodukovateľnosti (Tang *et al.*, 2002).

6.2 Optimalizácia metodiky

Výber a aplikácia danej MARK bola uskutočnená na základe výskumu zameraného na identifikáciu enzýmu fosforylujúceho Ser²⁶² tau proteínu (Drewes *et al.*, 1997), ktorý potvrdil hlavný podiel MARK na regulácii interakcie medzi proteínmi skupiny tau a mikrotubulmi v axónoch. Zo 4 známych izoformiem zvolená MARK4 vykazovala v imunohistochemických analýzach najvyššiu expresiu v granulovakuolárnych degeneračných telieskach akumulovaných v mozgu pacientov s AD (Lund *et al.*, 2014). Pri analýze vplyvu enzýmu MARK4 na jednotlivé miesta tau proteínu sme dokázali, že v rámci MT-binding domain nielen oblasť R1 so Ser²⁶² potvrdená švédskou výskumnou skupinou Lund *et al.* (Lund *et al.*, 2014), ale i oblasť R3 v mieste so Ser³²⁴ je schopná fosforylácie jeho pôsobením a tým zmene aktivity.

Pri laboratórnom testovaní dochádza k vzniku odchýľok od meraní, a tým chybovosti pri interpretácii dát spôsobenej nepresnosťami vyvolanými ľudskou chybou ale i prístrojovými obmedzeniami. Vzhľadom na obrovské množstvo vzoriek, ktoré je v súčasnosti spracovávané, vznikol veľký tlak na automatizáciu assaye, ktorá dokáže signifikantne zredukovať chybovosť spôsobenú vo vysokej miere ručným pipetovaním, ale i čas, za ktorý je možné získať výsledky práce (Jemal *et al.*, 1999; Christler *et al.*, 2020). V prípade enzymatických assayí hrá čas kľúčovú úlohu vzhľadom na prípravu a zmiešanie potrebných zložiek reakčnej zmesi.

V systéme bolo pre vyššiu precíznosť či reprodukovateľnosť zodpovedajúce základným podmienkam validácie nutné nájsť spôsob efektívnej semi-automatizácie protokolu. Potreba automatizácie je znásobená malými objemami zložiek reakčnej zmesi, ktoré sú charakteristické pre enzymatické assaye. V našom prípade bola automatizácia zabezpečená využitím Multidrop dávkovača pri stabilných objemoch jednotlivých reagens a Echo ultrazvukového prenášača pre malé objemy využitého pri aplikácii enzýmu rádovo už v desiatkach nanolitrov.

Vzhľadom na lokalizáciu enzýmu viazanú na ľudské telo, kde sú podmienky prostredia zabezpečujúce homeostázu fixne dané, bolo pri optimalizácii aplikované pH reakčnej zmesi 7,5. Na základe analýzy správania enzýmu v rôznych podmienkach pH je MARK4 obdobne reagujúca v rozptyle hodnôt pH 6,5–8,5. Nakoľko fyziologické pH je pri podmienkach prostredia ľudského mozgu regulované v rozmedzí pH okolo 7,0 (Brooks *et al.* 2016); stanovená hodnota je smerodajnou pre ďalší výskum.

V porovnaní s fyziologickou hodnotou telesnej teploty človeka, 37 °C, je teplota prostredia, v ktorej bola reakčná zmes inkubovaná, predstavujúca izbovú teplotu, 21 °C, pomerne rozdielna. Z výsledných ukazovateľov analýzy vplyvu teploty prostredia na schopnosť fosforylácie enzýmu (viď Tabuľka 5) vyplýva, že v teplotných bodoch 21–37 °C je efektivita pôsobenia MARK4 obdobná, a teda práca pri podmienkach izbovej teploty nenaruša výslednú aktivitu enzýmu. Pre danú prácu bolo použitie izbovej teploty kľúčové, nakoľko veľmi malé aplikované objemy (rádovo v µl) pri zachovaní dĺžky

inkubácie podliehajú vyparovaniu a výsledky by za daných okolností boli výrazne skreslené, príp. nedetegovateľné z dôvodu úplného odparenia inkubovanej zmesi.

6.3 Testovanie inhibítorov a screening látok

Z troch známych procesov inhibície aktivity proteínkináz–pseudosubstrátový mechanizmus (Knighton *et al.*, 1992), adenín mimetický mechanizmus (Russo *et al.*, 1996) a mechanizmus inaktivácie použitím oblastí iných ako aktivačné miesto (Roussel *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1997), sú MARK enzýmy charakteristické využitím adenín mimetického mechanizmu. Vyplýva to z ich zaradenia do funkčnej skupiny CAMK a podskupiny AMPK–related enzýmov (Manning, 2002). Adenín mimetický mechanizmus využíva peptidovej molekuly štruktúrne podobnej heterocyklu ATP. Tá sa viaže pomocou hydrofóbných väzieb do ATP–väzobného miesta enzýmu v jeho katalytickej doméne a efektívne konkuruje samotnému ATP.

Hoci sú nízkomolekulárne látky z hľadiska priestupnosti hematoencefalickou bariérou podľa stanovených parametrov uvádzaných Lipinskim *et al.* (Lipinski *et al.*, 1997) veľmi vhodnými kandidátmi pre testovanie ako potenciálne inhibítory enzymatickej aktivity, i tu sa stretávame s viacerými komplikáciami. Jedny sú zamerané priamo na súvis s priestupnosťou do mozgu, druhé sa zaoberajú štruktúrou a s ňou spojenými prekážkami.

Nakoľko je CNS najkomplexnejšou sústavou ľudského tela vymedzenou dôležitou štruktúrou v podobe hematoencefalitickej bariéry, len zhruba 2 % liečiv je schopných danú bariéru prekonať (Pardridge, 2002). Determinácia charakteru a štruktúry je preto v tomto prípade kľúčová a v súčasnosti pozostáva z komplexu analýz zvaných multiparametrová optimalizácia (MPO-skóre). V bežne aplikovaných analýzach ako sú Lipinskeho pravidlá 5 (Lipinski *et al.*, 1997) či Zlatý trojuholník (Johnson *et al.*, 2009) uplatňovaných pre orálne podávané nízkomolekulárne látky sú presne zdefinované „cut–off“ hodnoty, v rámci ktorých platí rovnocennosť všetkých molekúl spĺňajúcich tieto podmienky. V porovnaní s nimi je analýza MPO–skóre tzv. mäkkou (soft) analýzou pozerajúcou na uvedenú látku z komplexnejšieho hľadiska, t.j. ak daná látka nespĺňa striktnie 1 z uvedených parametrov, za daný parameter dostáva nižšie skóre, no z testovania vylúčená nie je.

Hoci nemožno poprieť fakt, že väčšina nízkomolekulárnych látok špecificky pôsobiacich v CNS spĺňa kritériá pre Lipinskeho pravidlá a Zlatý trojuholník, mäkká analýza MPO-skóre umožňuje iný pohľad na dáta pri výskumoch CNS liečiv, ktoré sú vo vývoji, a ponúkajú sľubné výsledky hoci sú na hranici „cut–off“ hodnôt bežných analýz (Strømgaard *et al.*, 2017).

Rozsiahla skupina proteínkináz, do ktorej zaraďujeme MARK4, je charakteristická značnou homológiou v katalytickej doméne. Pre štúdium charakteru správania týchto druhov enzýmov je vo všeobecnosti prívetivá, ale pri hľadaní selektívnych inhibítorov predstavuje problém

a vysporiadanie sa s ňou je viazané na porovnávanie potenciálnej aktivity skúmaného liečiva s viacerými navzájom interagujúcimi enzýmami. K uvedenému je potrebné zohľadniť i fakt, že z hľadiska teórie enzymatickej kinetiky možno kompetitívny inhibítor vytesniť z reakcie pridaním nadmerného množstva aplikovaného substrátu. Ak za substrát budeme považovať ATP, potom jeho vyšší podiel v organizme môže vyvolať zníženú aktivitu nízkomolekulárneho ATP-kompetitívneho inhibítora. Preto je nutné pri testovaní aktivity zvážiť uvedenú problematiku a hľadať látky schopné pôsobenia i v uvedenom prípade.

Zo známych inhibítorov MARK4 bol testovaný modelový staurosporine. Tento alkaloid predstavuje vysoko aktívnu molekulu potláčajúcu aktivitu viacerých druhov tyrozínkináz (Nakano *et al.*, 1987) i serín/treonínkináz (Tamaoki *et al.*, 1986; Gadbois *et al.*, 1992). Jedná sa o účinný, no nešpecifický inhibítor, ktorý bol rôzne chemicky upravovaný pre zvýšenie špecificity pri testovaní. Izolované deriváty boli skúmané pre rôzne proteínkinázové izoformy, ich aktivita sa menila vzhľadom k použitému typu enzýmu, mala zvyčajne stúpajúcu tendenciu, avšak žiadny nevykazoval zhodné výsledky pre viaceré izoformy (Meyer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990; Mizuno *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2019).

Pri experimentálnom testovaní staurosporinu bola potvrdená jeho vysoká aktivita už pri nízkych koncentráciách, s IC_{50} rovných $0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ktorá poukazuje na výbornú využiteľnosť a účinnosť tohto modelového inhibítora. Nakoľko však testovanie v *in vitro* podmienkach neberie do úvahy ďalšie enzýmy z proteínkinázovej skupiny interagujúce so štruktúrou tau proteínu (cdk, GSK3,...), nie je možné uvedený inhibítor aplikovať v ďalších experimentoch ako liečivo a jeho úloha, ako už z vyššie uvedeného vyplýva, spočíva skôr v kontrole mechanizmu fungovania assaye.

Špecificky reagujúcich inhibítorov, ktoré by potenciálne reagovali s enzýmami MARK existuje niekoľko. V práci bol testovaný inhibítor aktivity MARK/PAR-1, ktorý nesie názov podľa skupiny MARK enzýmov, s ktorými interaguje. Objavený bol na základe štúdie od Timm *et al.* (Timm *et al.*, 2011), ktorí sa zamerali na takmer 18 000 látok navrhnutých v spolupráci s Leibniz inštitútom pre molekulárnu farmakológiu a podľa zadaných kritérií špecificity a nízkej hodnoty IC_{50} vybrali 12 látok ako ATP-kompetitívnych inhibítorov špecificky reagujúcich s MARK kinázami. Medzi nimi sa s označením 39621 nachádzal i MARK/PAR-1 inhibítor aktivity. Táto štúdia však využila ako cieľový enzým inú izoformu MARK, MARK2. V porovnaní s nami testovanou MARK4 vykazuje pomerne dobrú aktivitu (viď Tabuľka 7). Zároveň je nutné zdôrazniť jej špecificitu v porovnaní s predchádzajúcim alkaloidom, čo je pre jej použitie kľúčové. Uvedené výsledky síce vykazujú rozptyl hodnôt potenciálne spôsobený nehomogenitou kryštálov zmesi na MALDI doske ako je uvedené vyššie, avšak opakovaním experimentu by sa uvedené rozdiely mohli výrazne zredukovať. V prospech aktivity tejto látky na MARK4 je stanovená hodnota $IC_{50} = 0,29 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viď Výsledky).

Optimalizovaná assay spolu s testovaním potenciálnych inhibítorov bola využitá ďalej ako súčasť projektu na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny, kde na základe skríningu počítačovo vopred navrhnutých zlúčenín so špecifickými vlastnosťami presne zadefinovanými pre prechod hematoencefalitickou bariérou a cieľovou reaktivitou s MARK4 v mozgu umožnila navrhnutie a prechod do testovania na bunkových systémoch niekoľkým nízkomolekulárnym látkam.

Skríning bol navrhnutý podľa všeobecne uplatňovaných pravidiel podobne ako v štúdií Timma et al. Na základe počítačového profilovania bolo skonštruovaných 1 221 potenciálnych inhibítorov podľa testovaného modelu látky L1 (viď Tabuľka 8) spĺňajúcej všetky kritériá pre aplikáciu.

Z výstupu parametrov stanovených pomocou softvéru Molinspiration Cheminformatics Software možno posúdiť jednotlivé hodnoty (viď Tabuľka 9) z hľadiska Lipinskeho pravidiel 5 pre sledovanú látku L1 i testované inhibítory staurosporin, MARK/PAR-1 inhibítor aktivity v porovnaní s dostupným liečivom donepezilom cieľným na inú dráhu vzniku a prejavu AD. Prahovú hodnotu 500 Da molárnej hmotnosti neprekročila žiadna z uvedených molekúl. Najvyššiu hmotnosť má v tomto prípade staurosporin, ktorý však pri 466,54 Da stále spĺňa uvedenú požiadavku, L1 má blízku hodnotu 445,37 Da. Čiastkový octanol–voda koeficient logP, ktorý v kladných hodnotách nesmie presiahnuť cut–off rovné 5, je parameter splnený všetkými 4 molekulami.

Podľa štúdie Hansch et al. (Hansch *et al.*, 1968) pre analýzu správania hypnotík vzhľadom k lipofilite molekúl bolo determinované ideálne logP pre molekuly vstupujúce do CNS v oblasti ≤ 2 . Štandardný parameter podľa Lipinskeho platný skôr pre orálne podávané molekuly spĺňajú všetky molekuly, uvedené prísnejšie kritérium však len jedna. Najnižšiu hodnotu logP = 0,62 má látka L1, k jej hodnote najbližší je MARK/PAR-1 inhibítor aktivity s logP = 3,43 viac než 1,7x prevyšujúci uvedenú „cut– off“ = 2. Z hľadiska atómov predstavujúcich donory a akceptory vodíkových väzieb sú oba parametre splnené, t.j. neprekračujú stanovenú „cut–off“ 10 akceptorov vodíkových väzieb pri najvyššej hodnote v maximálnej povolenej hranici 10 u L1 a za ňou v tesnom zastúpení 7 akceptorov u staurosporinu a 6 u MARK/PAR-1. Povolených donorov väzieb by malo byť ≤ 5 ; v uvedených systémoch sa vyskytujú i v „0–početnom“ zastúpení (donepezil).

Z hľadiska Lipinskeho pravidiel 5 sú parametre splnené, látky sú vhodné k drug design, hoci optimálny logP koeficient nepresahujúci odporúčanú hranicu 2 je prítomný len u L1. Tento parameter je však vhodným indikátorom potenciálnej úspešnosti takto navrhnutej molekuly, i keď vzhľadom k uvedenému koeficientu je nutné konštatovať, že najvyššia hodnota logP = 4,1 sa vyskytuje práve u látky donepezil, ktorá je v súčasnosti farmaceuticky schválená a i napriek uvedenej nezodpovedajúcej miere prísnejšieho kritéria logP ≤ 2 sa využíva pri liečbe AD.

Testovaná inhibícia MARK4 kinázy molekulou L1 bola porovnávaná s výsledkami experimentálnych štúdií spoločnosti Carina Biosciences, Inc. V stanovenej koncentrácii $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bola vyhodnotená 71,9%-ná inhibícia MARK4 kinázy. Výsledok stanovený nami optimalizovanou metodikou predstavoval 65,87 % so smerodajnou odchýlkou $\pm 3,19 \%$ v rovnakom bode koncentrácie $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pri $\text{IC}_{50} = 13,38 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Uvedené údaje slúžiace ako externá kontrola kvality výstupu poukazujú na správnosť aplikovanej metodiky, a teda úspešnosť optimalizácie protokolu použitého pre štúdie inhibítorov enzýmu MARK4.

Zúženie výberu pôvodných 1 221 zvolených látok prebiehalo na ÚMTM v sérii 2 nadväzujúcich skrínigov. Primárnym skrínigom, pri ktorom bola pri stabilnej koncentrácii $10 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sledovaná inhibícia reakcie bolo vylúčených 63 % látok. Z vybraných 37 % bolo v sekundárnom skrínigu sledované kritérium hodnoty IC_{50} , pri ktorom všetky látky pod hranicou $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ postúpili do ďalšej fázy testovania. Celkovo bolo z pôvodného počtu testovaných potenciálnych inhibítorov zvolené 1 % látok ako potenciálne zaujímavých pre ďalšie štúdie.

Z nich zvolená látka TD1 odvodená od L1 vykazuje veľmi dobrú aktivitu, v jej prospech je i stanovená hodnota IC_{50} rovných $0,32 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V porovnaní s IC_{50} látky L1, vykazuje niekoľkonásobný pokles, čo je kľúčové pre jej aplikáciu ako budúceho liečiva. Pri drug design analýze v porovnaní s L1 (viď Tabuľka 9) vykazuje podobné vlastnosti vo všetkých stanovených parametroch. Hodnota $\log P$ v jej prípade však stúpla viac než 6,3x na hodnotu 3,96. K poklesu hodnôt došlo v prípade polarity či akceptorov vodíkových väzieb z pôvodných 10 u L1 na 8. Hoci došlo v porovnaní s L1 k menším zmenám, vo výsledku analyzované parametre u oboch látok, teda L1 i výslednej TD1, spĺňajú podmienky platné pre Lipinskeho pravidlá 5. Otázna je zmena funkcie vzhľadom k vyššej hodnote $\log P$ presahujúcej odporúčanú hranicu 2 a jej následné správanie pri samotnej interakcii s membránami.

7. Záver

MALDI-TOF hmotnostná spektrometria je v súčasnej dobe aplikovaným nástrojom pre stanovenie aktivity rôznych druhov enzýmov. Nakoľko je túto techniku možné semi-automatizovať, stala sa dostupným prostriedkom pre HTS analýzy potenciálnych liečiv.

V uvedenej bakalárske práci bola táto mäkká ionizačná technika využitá pre optimalizáciu protokolu stanovujúceho enzymatickú aktivitu MARK4 zodpovednej za hyperfosforyláciu kľúčových oblastí tau proteínu v axónoch neurónov popísaných ako jeden z prvých príznakov vzniku neurodegeneratívneho ochorenia Alzheimerova choroba.

S výstupnými hodnotami $0,12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ substrátu CHktid peptidu, $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzýmu MARK4 a $44 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ATP pre semi-automatizovaný protokol bolo možné ďalej pracovať. V rámci testovania aktivity boli overované i podmienky vplývajúce na pôsobenie enzýmu. Zvolené výstupné hodnoty, pri ktorých reakcia prebieha dobre, sú 7,5 pH a izbová teplota. Okrem univerzálneho substrátu CHktid peptidu boli testované i skutočné peptidy vyskytujúce sa v MT-binding domain tau proteínu, R1–R4, kedy pri daných reakčných podmienkach bola analyzovaná fosforylácia R1 a R3 peptidu označené koncovými aminokyselinami Ser²⁶² a Ser³²⁴.

Aplikácii metodiky pre ďalší výskum venovaný cieľnému hľadaniu potenciálnych inhibítorov predchádzalo testovanie na modelových inhibítoroch, staurosporin a MARK/PAR-1. Z uvedených látok lepšie reagoval staurosporin, ktorý však v dôsledku nízkej špecificity reakcie, respektíve ko-reakcie s viacerými cieľovými enzýmami pre tau proteín, je vhodný len ako nešpecifický modelový príklad pozitívnej kontroly reakcie. Testovaný špecificky reagujúci MARK/PAR-1 inhibítor aktivity vyžaduje ešte ďalšie merania, avšak aj jeho aktivita bola overená ako funkčná vzhľadom k použitým dátam z optimalizovanej metodiky. Získané údaje z experimentálneho testovania potvrdzujú úspešnosť implementácie metodiky pre skrining potenciálnych inhibítorov.

Uvedená analýza v rámci projektu výskumu liečiv Alzheimerovej choroby na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny na základe výstupných údajov z optimalizácie pokračovala ďalej a zo skonštruovaných liečiv podľa počítačového návrhu odvodeného od zvolenej látky L1 bolo vybrané 1 % substancií vhodných k ďalším klinickým testom, medzi nimi i látka TD1 vykazujúca vlastnosti vhodné pre prechod cez hematoencefalitickú bariéru.

8. Literatura

Abbott, A., Dolgin, E. (2016): Failed Alzheimer's trial does not kill leading theory of disease. *Nature*, vol. 540 (issue 7631), 15-16.

Abraham, A., Meng, Y., Llinas, M., Huang, Y., Hamani, C., Mainprize, T., Aubert, I., Heyn, C., Black, S., Hynynen, K., Lipsman, N., Zinman, L. (2019): First-in-human trial of blood-brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nature Communications*, vol. 10 (issue 1).

Alberts, B. (2005): Úvod do molekulární biologie buňky In *Základy buněčné biologie*: (2nd edition). Espero, Ústí nad Labem.

Alzforum. NIC5-15. (2019): [online] [navštívené 16. 12. 2019]. Dostupné z <https://www.alzforum.org/therapeutics/nic5-15>

Alzheimer, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-Gerichtliche Medizin*, vol. 64, 146-148.

Arispe, N., Pollard, H., Rojas, E. (1993): Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90 (issue 22), 10573-10577.

Beavis, R., Chait, B., Fales, H. (1989): Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 3 (issue 12), 432-435.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002): *Biochemistry* (5th edition). W. H. Freeman, New York.

Berkowitz, S., J. Houde, D. (2015): The Complexity of Protein Structure and the Challenges it Poses in Developing Biopharmaceuticals. In *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*, pp. 1-21. Elsevier, Amsterdam, New York.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E., Mandelkow, E. (1993): Phosphorylation of Ser²⁶² strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, vol. 11 (issue 1), 153-163.

Biogen Plans Regulatory Filing for Aducanumab in Alzheimer's Disease Based on New Analysis of Larger Dataset from Phase 3 Studies. [online] [navštívené 16. 12. 2019]. Dostupné z <http://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-plans-regulatory-filing-aducanumab-alzheimers-disease>

Blomberg, C. (2007): Enzyme Kinetics. In *Physics of Life* (1st edition), pp. 255-265. Elsevier, Amsterdam, New York.

Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, vol. 294 (issue 5), 1351-1362.

Bohrmann, B., Baumann, K., Benz, J., Gerber, F., Huber, W., Knoflach, F., Messer, J., Oroszlan, K., Rauchenberger, R., Richter, W., Rothe, C., Urban, M., Bardroff, M., Winter, M., Nordstedt, C., Loetscher, H. (2012): Gantenerumab: A Novel Human Anti-A β Antibody Demonstrates Sustained Cerebral Amyloid- β Binding and Elicits Cell-Mediated Removal of Human Amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 28 (issue 1), 49-69.

- Bourguet, N., Torr ton, J., Galy, O., Arondel, V., Goutx, M. (2003): Application of a Specific and Sensitive Radiometric Assay for Microbial Lipase Activities in Marine Water Samples from the Lagoon of Noum a. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69 (issue 12), 7395-7400.
- Bouschen, W., Spengler, B. (2007): Artifacts of MALDI sample preparation investigated by high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization (SMALDI) imaging mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 266 (issue 1-3), 129-137.
- Br nd n, C., Tooze, J. (1999): *Introduction to protein structure* (2nd edition). Garland Pub, New York.
- Browning, E. (1972): Fluorometric enzyme assay for choline and acetylcholine. *Analytical Biochemistry*, vol. 46 (issue 2), 624-638.
- Buxbaum, J., Liu, K., Luo, Y., Slack, J., Stocking, K., Peschon, J., Johnson, R., Castner, B., Cerretti, D., Black, R. (1998): Evidence That Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme Is Involved in Regulated α -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273 (issue 43), 27765-27767.
- Camarasa, C., Cobo, F. (2018): Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, pp. 167-180. Academic Press, London, Oxford, San Diego, Cambridge.
- Campbell, M., Farrell, S. (2012): *Biochemistry* (7th edition). Brooks/Cole Cengage Learning, Pacific Grove.
- Carlomagno, Y., Chung, D., Yue, M., Castanedes-Casey, M., Madden, B., Dunmore, J., Tong, J., DeTure, M., Dickson, D., Petrucelli, L., Cook, C. (2017): An acetylation–phosphorylation switch that regulates tau aggregation propensity and function. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292 (issue 37), 15277-15286.
- Clarke, K. (2013): Enzymes as biocatalysts. In *Bioprocess Engineering*, pp. 75-96. Woodhead Publishing, Cambridge, Philadelphia, New Delhi.
- Clark, L., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D., Nasreddine, Z., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., Andreadis, A., D'Souza, I., Lee, V., Reed, L., Trojanowski, J., Zhukareva, V., Bird, T., Schellenberg, G., Wilhelmsen, K. (1998): Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95 (issue 22), 13103-13107.
- Coric, V., Salloway, S., van Dyck, C., Dubois, B., Andreasen, N., Brody, M., Curtis, C., Soininen, H., Thein, S., Shiovitz, T., Pilcher, G., Ferris, S., Colby, S., Kerselaers, W., Dockens, R., Soares, H., Kaplita, S., Luo, F., Pachai, C., Bracoud, L., Mintun, M., Grill, J., Marek, K., Seibyl, J., Cedarbaum, J., Albright, J., Feldman, H., Berman, R. (2015): Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat. *JAMA Neurology*, vol. 72 (issue 11).
- Cornish-Bowden, A. (1979): *Fundamentals of enzyme kinetics* (1st edition). Butterworths, Oxford.
- Currier, C. (2012). *Introductory biochemistry*. Research World, Delhi.
- Dai, Y., Whittal, R., Li, L. (1999): Two-Layer Sample Preparation: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and Protein Mixtures: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and Protein Mixtures. *Analytical Chemistry*, vol. 71 (issue 5), 1087-1091.

- Dixit, P., Cuestas, R. (1973): Radiometric Assay of Citrate Condensing Enzyme (Citrate Synthetase) in Liver Tissue and Mitochondria. *Clinical Chemistry*, vol. 19 (issue 10), 1106-1111.
- Dobson, P., Doig, A. (2005): Predicting Enzyme Class From Protein Structure Without Alignments. *Journal of Molecular Biology*, vol. 345 (issue 1), 187-199.
- Drewes, G., Ebneith, A., Preuss, U., Mandelkow, E., Mandelkow, E. (1997): MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption. *Cell*, vol. 89 (issue 2), 297-308.
- Duka, V., Lee, J., Credle, J., Wills, J., Oaks, A., Smolinsky, C., Shah, K., Mash, D., Masliah, E., Sidhu, A., Reddy, H. (2013): Identification of the Sites of Tau Hyperphosphorylation and Activation of Tau Kinases in Synucleinopathies and Alzheimer's Diseases. *PLoS ONE*, vol. 8 (issue 9).
- Durham, H., Roy, J., Dong, L., Figlewicz, D. (1997): Aggregation of Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase Proteins in a Culture Model of ALS. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology*, vol. 56 (issue 5), 523-530.
- Eigen, M. (1968): New looks and outlooks on physical enzymology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 1 (issue 1).
- Elliott, W., Elliott, D. (1997): *Biochemistry and molecular biology* (1st edition). Oxford University Press, Oxford.
- Ferrier, D. (2017): *Biochemistry* (7th edition). Wolters Kluwer, Alphen aan den Rijn, Philadelphia.
- Forman, M., Trojanowski, J., Lee, V. (2004): Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, vol. 10 (issue 10), 1055-1063.
- Gadbois, D., Hamaguchi, J., Swank, R., Bradbury, E. (1992): Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 184 (issue 1), 80-85.
- Gaigalas, A., Li, L., Henderson, O., Vogt, R., Barr, J., Marti, G., Weaver, J., Schwartz, A. (2001): The development of fluorescence intensity standards. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 106 (issue 2).
- Genentech's Crenezumab Fails Two Phase III Trials in Alzheimer's. (2019): In *GEN: Genetic Engineering & Biotechnology News*. [online]. [navštívené 17.12.2019]. Dostupné z <https://www.genengnews.com/news/genentechs-crenezumab-fails-two-phase-III-trials-in-alzheimers/>
- Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R. (1989): Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, vol. 3 (issue 4), 519-526.
- Goedert, M., Wischik, C., Crowther, R., Walker, J., Klug, A. (1988): Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85 (issue 11), 4051-4055.
- Gross, J. (2017): *Mass Spectrometry: A Textbook* (3rd edition). Springer International Publishing, New York.
- Grützmaker, H., Aulinger, F., Franke, G., Spitteller, G. (1969): *Massenspektrometrie*: Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1968. *Organic Mass Spectrometry*, vol. 2 (issue 4), 431-432.

Gubareva, L., Webster, R., Hayden, F. (2002): Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Research*, vol. 53 (issue 1), 47-61.

Hammond, E., Li, C., Ferro, V. (2010): Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. *Analytical Biochemistry*, vol. 396 (issue 1), 112- 116.

Hanger, D., Hughes, K., Woodgett, J., Brion, J., Anderton, B. (1992): Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neuroscience Letters*, vol. 147 (issue 1), 58-62.

Hansch, C., Steward, A., Anderson, S., Bentley, D. (1968): Parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 11 (issue 1), 1-11.

Hardy, J., Higgins, G. (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, vol. 256 (issue 5054), 184-185.

Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Morishima-Kawashima, M. (1992): Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267 (issue 24), 17047-17054.

Hatzakis, N., Wei, L., Jorgensen, S., Kunding, A., Bolinger, P., Ehrlich, N., Makarov, I., Skjot, M., Svendsen, A., Hedegård, P., Stamou, D. (2012): Single Enzyme Studies Reveal the Existence of Discrete Functional States for Monomeric Enzymes and How They Are “Selected” upon Allosteric Regulation. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134 (issue 22), 9296-9302.

He, H., Wang, X., Pan, R., Wang, D., Liu, M., He, R. (2009): The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*, vol. 10 (issue 1).

He, W., Voznyi, Y., Huijman, J., Geilen, G., Karpova, E., Dudukina, T., Zaremba, J., van Diggelen, O., Kleijer, W. (1994): Prenatal diagnosis of sanfilippo disease type C using a simple fluorometric enzyme assay. *Prenatal Diagnosis*, vol. 14 (issue 1), 17-22.

Hippius, H., Neundörfer, G. (2003): The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, vol. 5 (issue 1), 101-108.

Hung, S., Fu, W. (2017): Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *Journal of Biomedical Science*, vol. 24 (issue 1).

Chick, H. (1910): On the ‘heat coagulation’ of proteins. *The Journal of Physiology*, vol. 40 (issue 5), 404-430.

Christler, A., Felföldi, E., Mosor, M., Sauer, D., Walch, N., Dürauer, A., Jungbauer, A. (2020): Semi-automation of process analytics reduces operator effect. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43 (issue 5).

Illingworth, J. (1985): *Methods of enzymatic analysis* (3rd edition). *Biochemical Education*, vol. 13 (issue 1).

Janowicz, P., Leinenga, G., Götz, J., Nisbet, R. (2019): Ultrasound-mediated blood-brain barrier opening enhances delivery of therapeutically relevant formats of a tau-specific antibody. *Scientific Reports*, vol. 9 (issue 1).

- Jaskolla, T., Lehmann, W., Karas, M. (2008): 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105 (issue 34), 12200-12205.
- Jemal, M., Teitz, D., Ouyang, Z., Khan, S. (1999): Comparison of plasma sample purification by manual liquid–liquid extraction, automated 96-well liquid–liquid extraction and automated 96-well solid-phase extraction for analysis by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 732 (issue 2), 501-508.
- Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., Schomburg, D. (2019): BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. *Nucleic Acids Research*, vol. 47 (issue D1), D542-D549.
- Jessen, F. (2019): Früherkennung der Alzheimer-Krankheit und Ansätze der Prävention. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, vol. 62 (issue 3), 255-260.
- Johnson, T., Dress, K., Edwards, M. (2009): Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 19 (issue 19), 5560-5564.
- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., Nagata, Y. (2004): Structural Basis for Allosteric Regulation of the Monomeric Allosteric Enzyme Human Glucokinase. *Structure*, vol. 12 (issue 3), 429–438.
- Kang, M., Tholey, A., Heinzle, E. (2000): Quantitation of low molecular mass substrates and products of enzyme catalyzed reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 14 (issue 21), 1972-1978.
- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, vol. 60 (issue 20), 2299-2301.
- Knighton, D., Pearson, R., Sowadski, J., Means, A., Ten Eyck, L., Taylor, S., Kemp, B. (1992): Structural basis of the intrasteric regulation of myosin light chain kinases. *Science*, vol. 258 (issue 5079), 130-135.
- Kodíček, M., Karpenko, V. (2013): *Biofyzikální chemie* (3rd edition). Academia, Praha.
- Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R. (2018): *Biochemie: chemický pohled na biologický svět* (2nd edition). Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
- Köpke, E., Tung, Y., Shaikh, S., Alonso, A., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (1993): Microtubule-associated Protein Tau: Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268 (issue 32), 24374-24384.
- Kotyk, A., Janacek, K. (1975): *Cell Membrane Transport: Principles and Techniques* (2nd edition). Plenum Press, New York.
- Kruger, N. (1995): Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity. *Phytochemistry*, vol. 38 (issue 5), 1065-1071.
- Lakowicz, J. (ed.). (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US, New York.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999): Constitutive and regulated β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96 (issue 7), 3922–3927.

- Lee, G., Cowan, N., Kirschner, M. (1988): The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science*, vol. 239 (issue 4837), 285-288.
- Lennarz, W., Lane, M. (2013): *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2nd edition). Academic Press, London, Oxford, San Diego, Cambridge.
- Liesener, A., Karst, U. (2005): Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 382 (issue 7), 1451-1464.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., Feeney, P. (1997): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 23 (issue 1-3), 3-25.
- Littlechild, J. (2013): Protein structure and function. In: Ganellin, R., Roberts, S., Jefferis, R. (eds.): *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*, pp. 57-79. Academic Press, Waltham, Oxford, Amsterdam.
- Lue, L., Kuo, Y., Roher, A., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J., Rydel, R., Rogers, J. (1999): Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, vol. 155 (issue 3), 853-862.
- Lund, H., Gustafsson, E., Svensson, A., Nilsson, M., Berg, M., Sunnemark, D., von Euler, G. (2014): MARK4 and MARK3 associate with early tau phosphorylation in Alzheimer's disease granulovacuolar degeneration bodies. *Acta Neuropathologica Communications*, vol. 2 (issue 1).
- Macdonald, M. (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, vol. 72 (issue 6), 971-983.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., Takashima, A. (2007): Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments. *Biochemistry*, vol. 46 (issue 12), 3856-3861.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A., Takashima, A. (2006): Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience Research*, vol. 54 (issue 3), 197-201.
- Mahdi, J., Kelly, D. (2001): Chapter 2: Lyases. In *Biotechnology Set* (1st edition), pp. 41-171. Wiley-VCH Verlag GmbH, Vienna.
- Manning, G. (2002): The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, vol. 298 (issue 5600), 1912-1934.
- Matouš, B. (2010): *Základy lékařské chemie a biochemie* (1st edition). Galén, Praha.
- Mattson, M., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., Rydel, R. (1992): β -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, vol. 12 (issue 2), 376-389.
- McKee, J., McKee, T. (1996): *Biochemistry*. WCB Wm. C. Brown Publishers.
- McKee, T., McKee, J. (2009): *Biochemistry: the molecular basis of life* (4th edition). Oxford University Press, Oxford.

- Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Röseler, J., Möller, M., Caravatti, G., Matter, A. (1989): A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and *In vitro* anti-proliferative as well as *In vivo* anti-tumor activity. *International Journal of Cancer*, vol. 43 (issue 5), 851-856.
- Mizuno, K., Saido, T., Ohno, S., Tamaoki, T., Suzuki, K. (1993): Staurosporine-related compounds, K252a and UCN-01, inhibit both cPKC and nPKC. *FEBS Letters*, vol. 330 (issue 2), 114-116.
- Monod, J., Wyman, J., Changeaux, J. (1964): On The Nature Of Allosteric Transition: A Plausible Model. *Journal of Molecular Biology*, vol. 1965 (issue 12), 88-118.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., Weil, P. (2009): *Harper's Illustrated Biochemistry* (28th edition). McGraw Hill, New York.
- Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y., Iba, H. (1987): Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein. *The Journal of Antibiotics*, vol. 40 (issue 5), 706-708.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Buxbaum, J., Mohs, R., Davis, K., Davies, P., Greengard, P. (2000): Correlation Between Elevated Levels of Amyloid β -Peptide in the Brain and Cognitive Decline. *JAMA*, vol. 283 (issue 12), 1571–1577.
- Neve, R., Harris, P., Kosik, K., Kurnit, D., Donlon, T. (1986): Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Molecular Brain Research*, vol. 1 (issue 3), 271-280.
- Nord, F. (ed.). (1960): *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Northrop, D., Simpson, F. (1997): New concepts in bioorganic chemistry beyond enzyme kinetics: Direct determination of mechanisms by stopped-flow mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 5 (issue 4), 641-644.
- Novak, P., Zilka, N., Zilkova, M., Kovacech, B., Skrabana, R., Ondrus, M., Fialova, L., Kontsekova, E., Otto, M., Novak, M. (2019): AADvac1, an Active Immunotherapy for Alzheimer's Disease and Non Alzheimer Tauopathies: An Overview of Preclinical and Clinical Development. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, vol. 6 (issue 1), 63-69.
- Nussinov, R., Tsai, C. (2013): Allostery in Disease and in Drug Discovery. *Cell*, vol. 153 (issue 2), 293- 305.
- Oldendorf, W., Szabo, J. (1976): Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, vol. 230 (issue 1), 94-98.
- Palmer, T., Bonner, P. (2011): *Enzyme Inhibition*. In *Enzymes*, pp. 126-152. Woodhead Publishing, Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi.
- Palmer, T., Bonner, P. (2007): *Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry* (2nd edition). Woodhead Publishing, Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi.
- Pan, Y., Tsai, C., Ma, B., Nussinov, R. (2010): Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends in Genetics*, vol. 26 (issue 2), 75-83.
- Pardridge, W. (1991): *Peptide Drug Delivery to the Brain*. Raven Press, New York.

- Pardridge, W. (2002): "Why Is The Global CNS Pharmaceutical Market So Under-Penetrated?". *Drug Discovery Today*. vol. 7 (issue 1): 5-7.
- Patrick, G. (2005): *Introduction to medicinal chemistry* (3rd edition). Oxford University Press, Oxford.
- Paul, P., Sangeetha, V., Deepika, R. (2019): Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (1st edition), pp. 107-125. Academic Press, London, Oxford, San Diego, Cambridge.
- Pavelka, S. (2010): Radiometric enzyme assays: development of methods for extremely sensitive determination of types 1, 2 and 3 iodothyronine deiodinase enzyme activities. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 286 (issue 3), 861-865.
- Pelley, J. (2007). *Elsevier's Integrated Biochemistry* (1st edition). Mosby Publishing, Maryland Heights.
- Pihlgren, M., Vukicevic, M., Gafner, V., Piorkowska, K., Chuard, N., Giriens, V., Valdes, P., Nazeeruddin, S., Colin, P., Pfeifer, A., Schneider, B., Muhs, A. (2016): Efficacy of Aci-35, A Liposomal Anti-Phospho Tau Vaccine in Two Different Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia*, vol. 12 (issue 7), P260-P261.
- Poorkaj, P., Bird, T., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W., Raskind, M., Schellenberg, G. (1998): Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of Neurology*, vol. 43 (issue 6), 815-825.
- Preisler, J., Foret, F., Karger, B. (1998): On-Line MALDI-TOF MS Using a Continuous Vacuum Deposition Interface. *Analytical Chemistry*, vol. 70 (issue 24), 5278-5287.
- Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., Karagiannidou, M. (2016): World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia. In *World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future*, pp. 1-140. *Alzheimer's Disease International (ADI)*.
- Pundir, C. (2015): Kinetic Properties of Enzyme Nanoparticles. In *Enzyme Nanoparticles*, pp. 33-41. William Andrew, Waltham, Oxford.
- Purich, D. (2010a): Kinetic Behavior of Enzyme Inhibitors. In *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*, pp. 485-574. Academic Press, London, Burlington, San Diego.
- Purich, D. (2010b): *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control* (1st edition). Academic Press, London, Burlington, San Diego.
- Ramsauer, M., Krause, D., Dermietzel, R. (2002): Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *The FASEB Journal*, vol. 16 (issue 10), 1274-1276.
- Rattray, M., Maragakis, N., Beart, P., Robinson, M. (2017): *Neurodegenerative Diseases: Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets* (1st edition). Springer International Publishing, New York.
- Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretschmar, T., Yayon, A., Rothe, C. (2003): Human Combinatorial Fab Library Yielding Specific and Functional Antibodies against the Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278 (issue 40), 38194-38205.

- Reese, T., Karnovsky, M. (1967): Fine Structural Localization Of A Blood-Brain Barrier To Exogenous Peroxidase. *The Journal of Cell Biology*, vol. 34 (issue 1), 207-217.
- Robinson, P. (2015): Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, vol. 59 (issue 0), 1-41.
- Roth, M., Maresh, E., Plymire, D., Zhang, J., Corbett, J., Robbins, R., Patrie, S. (2013): Surface Preparation Strategies for Improved Parallelization and Reproducible MALDI-TOF MS Ligand Binding Assays. *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 5 (issue 1), 6-10.
- Roussel, R., Brodeur, S., Shalloway, D., Laudano, A. (1991): Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88 (issue 23), 10696-10700.
- Roux, G., Jarray, R., Guyot, A., Pavoni, S., Costa, N., Théodoro, F., Nassor, F., Pruvost, A., Tournier, N., Kiyani, Y., Langer, O., Yates, F., Deslys, J., Mabondzo, A. (2019): Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Scientific Reports*, vol. 9 (issue 1).
- Rowntree, E., Kruger, N. (1992): Inhibition of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase by imidodiphosphate. *Plant Science*, vol. 86 (issue 2), 183-189.
- Russo, A., Jeffrey, P., Patten, A., Massagué, J., Pavletich, N. (1996): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, vol. 382 (issue 6589), 325-331.
- Satyanarayana, U., Chakrapani, U. (2013): *Biochemistry* (4th edition). Elsevier India, New Delhi.
- Schrank, T., Bolen, D., Hilser, V. (2009): Rational modulation of conformational fluctuations in adenylate kinase reveals a local unfolding mechanism for allostery and functional adaptation in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106 (issue 40), 16984-16989.
- Schulz, G., Schirmer, R. (1979): *Principles of protein structure*. Springer-Verlag, Vienna.
- Siegel, G. (1999): *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects* (6th edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Silverman, R., Holladay, M. (2015): *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (3rd edition). Academic Press, San Diego, Waltham.
- Simons, H., Gibson, T. (1999): Rapid continuous colorimetric enzyme assay for penicillin G acylase. *Biotechnology Techniques*, vol. 13 (issue 6), 365-367.
- Simutis, F., Sanderson, T., Pilcher, G., Graziano, M. (2018): Nonclinical Safety Assessment of the γ -Secretase Inhibitor Avagacestat. *Toxicological Sciences*, vol. 163 (issue 2), 525-542.
- Strømgaard, K., Krosgaard-Larsen, P., Madsen, U. (eds.). (2017): *Textbook of drug design and discovery* (5th edition). CRC Press, Boca Raton.
- Summers, C., Flowers, R. (2000): Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate. *Protein Science*, vol. 9 (issue 10), 2001-2008.

- Tagami, S., Yanagida, K., Kodama, T., Takami, M., Mizuta, N., Oyama, H., Nishitomi, K., Chiu, Y., Okamoto, T., Ikeuchi, T., Sakaguchi, G., Kudo, T., Matsuura, Y., Fukumori, A., Takeda, M., Ihara, Y., Okochi, M. (2017): Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. *Cell Reports*, vol. 21 (issue 1), 259-273.
- Takahashi, I., Kobayashi, E., Nakano, H. (1990): Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 255 (issue 3), 1218-1221.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., Tomita, F. (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 135 (issue 2), 397-402.
- Tang, K., Allman, S., Jones, R., Chen, C. (2002): Quantitative analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption. *Analytical Chemistry*, vol. 65 (issue 15), 2164-2166.
- Theunis, C., Crespo-Biel, N., Gafner, V., Pihlgren, M., López-Deber, M., Reis, P., Hickman, D., Adolfsson, O., Chuard, N., Ndao, D., Borghgraef, P., Devijver, H., Van Leuven, F., Pfeifer, A., Muhs, A., Iijima, K. (2013): Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy. *PLoS ONE*, vol. 8 (issue 8).
- Timm, T., von Kries, J., Li, X., Zempel, H., Mandelkow, E., Mandelkow, E. (2011): Microtubule Affinity Regulating Kinase Activity in Living Neurons Was Examined by a Genetically Encoded Fluorescence Resonance Energy Transfer/Fluorescence Lifetime Imaging-based Biosensor. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286 (issue 48), 41711-41722.
- Vassar, R., Bennett, B., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E., Denis, P., Teplow, D., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M., Biere, L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999): Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, vol. 286 (issue 5440), 735-741.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2002): Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 51 (issue 1), 75-87.
- Vodrážka, Z. (1996): *Biochemie* (2nd edition). Academia, Praha.
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2013): *Principles of biochemistry* (4th edition). John Wiley & Sons, Hoboken.
- Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M. (1994): Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry*, vol. 66 (issue 19), 3281– 3287.
- Waters, J. (2013): Live-Cell Fluorescence Imaging. In: Sluder, G., Wolf, D. (eds.): *Digital Microscopy*, vol. 114, pp. 125-150. Academic Press, San Diego, Waltham, Oxford, London, Amsterdam,
- Weber, S., Abbruscato, T., Brownson, E., Lipkowski, A., Polt, R., Misicka, A., Haaseth, R., Bartosz, H., Hruba, V., Davis, T. (1993): Assessment of an in vitro blood-brain barrier model using several [Met5]enkephalin opioid analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 266 (issue 3), 1649-1655.

- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S., Kirschner, M. (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 72 (issue 5), 1858-1862.
- Wilson, K., Walker, J. (2010): *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th edition). Cambridge University Press, Cambridge.
- Winteringham, F., Disney, R. (1962): Radiometric Assay of Acetylcholinesterase. *Nature*, vol. 195 (issue 4848), 1303-1303.
- Wischik, C., Edwards, P., Lai, R., Roth, M., Harrington, C. (1996): Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93 (issue 20), 11213-11218.
- Xiang, F., Beavis, R. (1993): Growing protein-doped sinapic acid crystals for laser desorption: An alternative preparation method for difficult samples. *Organic Mass Spectrometry*, vol. 28 (issue 12), 1424-1429.
- Xu, W., Harrison, S., Eck, M. (1997): Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*, vol. 385 (issue 6617), 595-602.
- Yalcin, T., Dai, Y., Li, L. (1998): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 9 (issue 12), 1303-1310.
- Zhou, B., Hu, Z., Zhang, H., Li, J., Ding, W., Ma, Z. (2019): Bioactive staurosporine derivatives from the *Streptomyces* sp. NB-A13. *Bioorganic Chemistry*, vol. 82, 33-40.
- Zuo, W., Jiang, S., Guo, Z., Feldman, M., Tuljapurkar, S. (2018): Advancing front of old-age human survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115 (issue 44), 11209-11214.