

# ELEKTROCHEMIE JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM INTERAKCE MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY-9 A KOLAGENU

Ondřej Zítka<sup>1,2</sup>, Dalibor Húska<sup>2</sup>, Vojtěch Adam<sup>2,3</sup>, Libuše Trnková<sup>4</sup>, René Kizek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno,

<sup>2</sup>Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>3</sup>Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>4</sup>Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno,

E-mail: [kizek@sci.muni.cz](mailto:kizek@sci.muni.cz)

## Abstrakt

Studium protein-protein interakcí v *in vitro* podmínkách je velmi zajímavé a přináší řadu unikátních výsledků. Hlavním cílem naší práce bylo studovat matrixovou metaloproteinázu 9 (MMP-9) a její interakce s kolagenem. Primárně jsme se zaměřili na optimalizaci chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy pro detekci MMP-9 a interakce s kolagenem. Za optimálních podmínek (čas akumulace 90 s, základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr pH 5, rozpouštěcí proud 1  $\mu$ A) byl stanoven detekční limit pro MMP-9 jako 100 pM. Kolagenu o koncentraci 1  $\mu$ g/ml byl akumulován po dobu 90 s na povrch rtuťové kapkové elektrody (HMDE). Po této byla modifikovaná HMDE omyta ve vodě a ponořena do roztoku MMP-9 (5  $\mu$ l) o koncentraci 1 ng/ml po dobu 90 s. Zjistili jsme, že po aplikaci MMP-9 na kolagen se signál kolagenu zvýšil přibližně dvakrát a pozice se posunula na -1,63 V oproti detekci samotného kolagenu a MMP-9 (-1,4 V). Lze usuzovat, že vzrůst signálu kolagenu ovlivňuje MMP-9 tím, že kolagen je štěpen na menší fragmenty, které jsou lépe přístupné na povrch HMDE a dávají vyšší signál. Výsledky byly ověřeny pomocí gelové chipové elektroforézy. Dále jsme použili diferenční pulsní voltometrii Brdičkovu reakci pro studium ovlivnění aktivity MMP-9 zvýšenou teplotou a koncentrací zinečnatých iontů, jako kofaktoru pro tyto enzymy. Aktivita MMP-9 v prostředí zinečnatých iontů je vyšší v porovnání s experimentem kolagen-MMP-9 bez jejich přítomnosti.

## Úvod

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou početnou skupinou zinek-dependentních proteinů, které mají za úkol štěpení a přestavování jednotlivých součástí pojivové tkáně (kolagen, elastin, želatina a kasein). Degradace pojivové tkáně je děj, který probíhá při ontogenetických změnách v organismu, jako je například růst, morfogeneze, ale také hojení ran a poškození tkání. S tím také souvisí aktivita MMP při onemocnění a patologických procesech (záněty, kožní či nádorová onemocnění). Skupina těchto enzymů hraje důležitou roli v řadě procesů a proto není divu, že se v organismu vyskytují ve více formách. Je známo kolem 20-ti typů MMP podle presyntetického úseku na chromozomech a specifitou k substrátu <sup>1</sup>. Díky metodám rentgenové krystalografie a nukleární magnetické rezonance je dnes známá struktura mnoha MMP <sup>2,3</sup>.

Většina těchto enzymů (kromě membránových MMP) je z buňky sekretována ve formě proenzymu, který je podle potřeby pro samotné štěpení aktivován ionty zinku. Můžeme se tedy domnívat, že by zde mohl existovat typ transportu iontů zinku a to na bázi transportního proteinu, který by mohl doposud neznámým způsobem přenášet zinek pro aktivní štěpení tkáně metaloproteinázami. Jedním z takových přenašečů je nízkomolekulární protein metalothionein <sup>4,5</sup>.

Studium protein-protein interakcí v *in vitro* podmínkách je v době, kdy se pozornost mnoha vědeckých skupin po celém světě obrací směrem k proteomu, velmi zajímavé a přináší řadu unikátních výsledků. Primárně jsme se zaměřili na optimalizaci chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy pro detekci MMP-9 a interakcí s kolagenem. Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza byla použita pro detekci několika biologicky důležitých peptidů <sup>6,7</sup> a proteinů jako metalothionein <sup>8-14</sup>, alpha-synuclein <sup>15</sup>, MutS protein <sup>16</sup>, glutathion-S-transferasa <sup>17</sup>, thrombin <sup>18</sup>. Navíc, Ostatná a kol. prokázala, že lze tuto elektrochemickou metodu použít pro studium strukturních změn bovinního sérového albuminu <sup>19,20</sup>. Dále naše pozornost směřovala na studium různých způsobů aktivace MMP-9. Výsledky byly ověřeny pomocí gelové chipové elektroforézy <sup>21</sup>. Hlavním cílem této práce je ukázat, že aplikace moderních elektrochemických metod v kombinaci s klasickými molekulárně-biologickými technikami při řešení určitých problémů v biologii může být velmi výhodná.

## Experimentální část

### *Chemikálie*

Lidská MMP-9 byla dodána od firmy Chemicon International (Temecula, USA). Lyofilizovaný kolagen byl získán od Výzkumného ústavu pletářského (Brno, Česká republika). Ostatní použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich v ACS čistotě, pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) byly připraveny v vodě ACS čistoty (Sigma-Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pracovní roztok byl připravován denně ředěním zásobních roztoků. Hodnoty pH byly měřeny s použitím WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), spojeným s osobním počítačem (Weilheim). pH-elektroda (SenTix-H) byla pravidelně kalibrována souborem WTW pufrů. Všechny roztoky byly před analýzou filtrovány přes teflonový filtr  $0,45 \mu\text{m}$  (MetaChem, Torrance, CA, USA). Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěna pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA,  $18 \text{ M}\Omega$ ).

### *Adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza*

Elektrochemické analýzy byly prováděny na AUTOLABu (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z visící rtuťové kapkové elektrody jako pracovní elektrody s plochou  $0,4 \text{ mm}^2$ , argentochloridové elektrody ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$ ) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Analyzované vzorky byly před detekcí deoxygenovány probubláním argonem (99,999%), saturovaným ve vodě po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Software GPES 4.9 (EcoChemie) byl použit pro zpracování hrubých dat (vyhlazování, korekce na základní hladinu). Experimentální podmínky pro detekci MMP pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí (AdTS) techniky chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA) byly optimalizovány.

### *Diferenční pulsní voltametrie Brdičkova reakce*

Elektrochemické analýzy byly prováděny na přístroji  $\mu\text{AUTOLAB III}$  (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z visící rtuťové kapkové elektrody jako pracovní elektrody s plochou  $0,4 \text{ mm}^2$ , argentochloridové elektrody ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$ ) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Základní elektrolyt ( $1 \text{ mM Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  a  $1 \text{ M}$

amonný pufr;  $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{pH} = 9,6$ ). Parametry diferenční pulsní voltametrie byly následující: počáteční potenciál  $-0,6$  V, konečný potenciál  $-1,6$  V, modulační čas  $0,057$  s, časový interval  $0,2$  s, potenciálový krok  $1$  mV, modulační amplituda  $250$  mV, teplota  $37$  °C, která byla udržována pomocí průtokového přístroje JULABO F12/ED (Labortechnik GmbH, Německo).

#### *Chipová gelová elektroforéza – Experion*

Analýzy byly prováděny na chipové gelové elektroforéze Experion (Bio-Rad, USA). Všechny analyzované vzorky byly ředěny tak, aby koncentrace proteinů nepřesáhla  $300$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Následně byly  $4$   $\mu\text{l}$  tohoto roztoku smíchány s  $2$   $\mu\text{l}$  redukčního pufru (systémový pufr ve směsi merkaptoethanolem (100%) v poměru 30:1 (v/v)). Tato směs byla ponechána  $4$  min. při  $100$  °C a poté bylo přidáno  $84$   $\mu\text{l}$  vody (ACS). Po naplnění chipu gelem a přípravě barvicího roztoku byla zředěná směs vzorku, redukčního pufru a vody ( $6$   $\mu\text{l}$ ) dávkována do systému. Jako standard byl použit Pro260 Ladder (Bio-Rad). Pro inkubaci vzorků před analýzou byl použit thermomixer (Eppendorf 5430, USA).

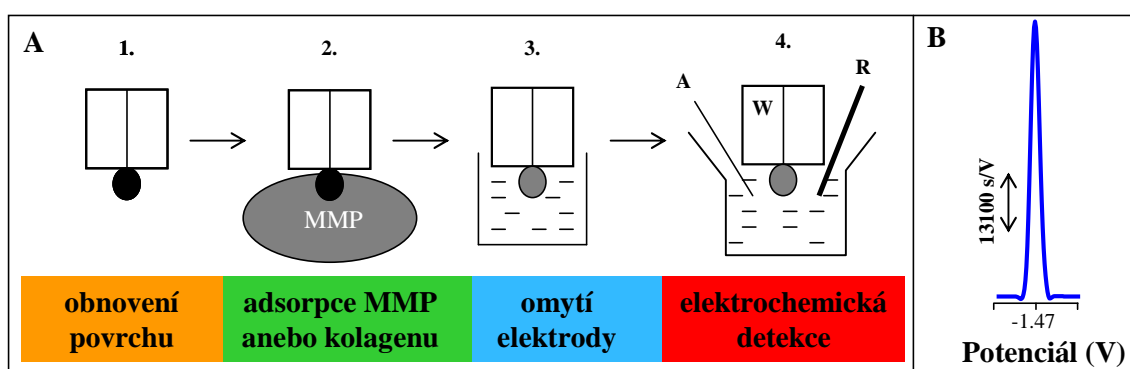
## **Výsledky a diskuse**

### ***Detekce matrixové metaloproteinázy 9***

Navrhli jsme elektrochemickou metodu založenou na katalytickém vylučování vodíku, označovanou jako pík H, za které jsou odpovědné  $-\text{SH}$  a  $\text{NH}_2$  skupiny MMP. Detekce probíhala pomocí adsorptivní přenosové techniky (Obr.1A). Nejdříve jsme hledali elektrochemické parametry pro analýzu metaloproteinázy. Prvním parametrem, jenž byl optimalizován, byla doba akumulace metaloproteinázy na rtuťové elektrodě. Základní koncentrace metaloproteinázy byla velmi nízká ( $0,01$  ng/ml) a detekce probíhala v borátovém pufru  $\text{pH} = 7,6$ . Jednotlivé časy akumulace byly určeny na  $30$ ,  $60$ ,  $90$ ,  $120$ ,  $150$  a  $180$  s. Zjistili jsme, že s dobou akumulace roste i výška píku až do  $90$  s, kde dosahuje svého maxima, poté výška píku klesá.

Dalším krokem bylo zjistit, jak se metaloproteináza chová v různých pufrech. Byla vybrána následující pufovaná prostředí: acetátový pufr ( $\text{pH} 4,6$ ); Britton-Robinson pufr ( $\text{pH} 6,5$ ), fosfátový pufr ( $\text{pH} 6,95$ ) a borátový pufr ( $\text{pH} 7,6$ ). V acetátovém pufru jsme pozorovali nejvyšší odezvu. Zároveň lze říci, že nižší  $\text{pH}$  je pro elektrochemickou analýzu metaloproteinázy vhodnější než  $\text{pH}$  vyšší. Každý pufr, tedy i různé  $\text{pH}$ , dává vznik signálu metaloproteinázy v mírně odlišném potenciálu. Acetátový pufr v  $-1,47$  V (Obr. 1B); Britton-

Robinson -1,62 V, fosfátový pufr -1,71 V a borátový pufr -1,74 V. Za pozorované změny v potenciálech píků jsou pravděpodobně odpovědné rozdíly v průběhu elektrodové reakce. Dalším experimentem bylo sledování závislosti výšky píku metaloproteinázy o koncentraci 1 ng/ml na různém pH acetátového pufru. Bylo zjištěno, že optimálním je pH 5. Odezvu signálu metaloproteinázy v acetátovém pufru pH = 5 výrazně ovlivňuje aplikovaný rozpouštěcí proud. Byly sledovány tyto hodnoty rozpouštěcího proudu (1, 2, 4, 6, 8, 10 a 12  $\mu\text{A}$ ). S tím, jak roste hodnota rozpouštěcího proudu, klesá signál metaloproteinázy. Proto jsme zvolili hodnotu rozpouštěcího proudu 1  $\mu\text{A}$ . Limit detekce byl stanoven jako  $3 \times \text{signál/šum}$  dle Longa a Winefordnera<sup>22</sup> jako 100 pM<sup>23</sup>.



**Obr 1:** (A) Schéma adsorptivní rozpouštěcí přenosové techniky (AdTS) použité pro detekci metalothioneinu; (1.) obnova povrchu visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE); (2.) adsorpce MMP resp. Kolagenu v kapce roztoku na povrch HMDE při otevřeném potenciálu; (3.) omytí elektrody v deionizované vodě; (4.) analýza MMP anebo kolagenu metodou CPSA při zapojení elektrod A-pomocná (uhlíková tyčka); W-pracovní (HMDE); R-referentní (Ag/AgCl/KCl). (B) CPSA voltamogram MMP. Základním elektrolytem byl acetátový pufr (pH 4,6). AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál -1.85 V, teplota 20°C, doba akumulace 90 s.

### Příprava kolagenu

Samotná příprava roztoku kolagenu není příliš technologicky jednoduchou záležitostí. V případě rozpouštění kolagenu ve vodě jsme velice limitováni jeho omezenou rozpustností, za což je odpovědná jeho kompaktní struktura. Vlivem mechanického působení (třepání, míchání) lze dosáhnout omezeného rozpouštění kolagenu, ale pravděpodobně za poškození vyšších proteinových struktur. Zlepšení fyzikálních vlastností kolagenní hmoty je možné docílit působením sníženého tlaku. Bylo zjištěno, že v takové kolagenní hmotě vznikají nehomogenní shluky (není ukázáno). Určení koncentrace kolagenu spektrofotometricky je

proto velmi obtížné. Alternativní metodou, jak zjistit koncentraci kolagenu, se zdá být elektrochemická detekce pomocí metody square wave voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě, kde je pozorován charakteristický voltametrický záznam. V experimentu byl kolagen rozpouštěn ve vodě, případně kyselině chlorovodíkové (9%). Suspenze byla třepána pomocí Vortex 2 (400 rpm) 15 minut. Kolagen se poměrně velmi dobře rozpouštěl v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Získaný signál kolagenu se zvyšoval v závislosti na jeho koncentraci. V případě, že byl kolagen rozpouštěn pouze v demineralizované vodě, byla jeho rychlost rozpouštění silně omezená

V následujícím experimentu byl studován vliv různé koncentrace kyseliny chlorovodíkové na rozpustnost kolagenu. Pro tento účel byly připraveny roztoky HCl (od 0,1 až po 10%) a ke každému bylo naváženo 100 mg kolagenu. Takto připravený 1 ml roztoku byl umístěn na třepačku a po dobu 30 min. intenzivně protřepáván (400 rpm). Poté byly vzorky analyzovány pomocí square wave voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě (doba akumulace 120 s, frekvence 200 Hz, základní elektrolyt: acetátový pufr pH 5, počáteční potenciál 0 V a konečný potenciál 1,5 V). Bylo možné pozorovat, že s narůstající koncentrací kyseliny chlorovodíkové dochází k nárůstu obsahu rozpuštěného kolagenu ve sledovaném vzorku. Na druhou stranu jsou roztoky obsahující kolagen velmi kyselé (pH 0,5 až 1,5), což může negativně ovlivňovat nativní strukturu proteinu. Do dalších experimentů jsme zvolili rozpouštění v prostředí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 9 % (*m/m*).

### *Interakce kolagenu s MMP-9*

Jedním z hlavních cílů této práce bylo studovat aktivaci MMP-9. Kolagen patří mezi hlavní substráty MMP v organismu. Rozhodli jsme se přistoupit k optimalizaci a následné elektrochemické detekci interakce MMP-9 s kolagenem. Nejdříve jsme optimalizovali dobu akumulace kolagenu na rtuťovou elektrodu. Ostatní parametry byly pro analýzu kolagenu stejné jako u MMP-9. Nejvhodnější doba akumulace byla 90 s. Následně jsme mohli přistoupit ke studiu interakce MMP-9 a kolagenu. Nejvhodnější podmínky pro štěpení kolagenu MMP-9 (1 ng/ml) byly v prostředí 0,05 M Tris - HCl pH = 7,6 + 0,2 M NaCl + 0,01 M CaCl<sub>2</sub>.

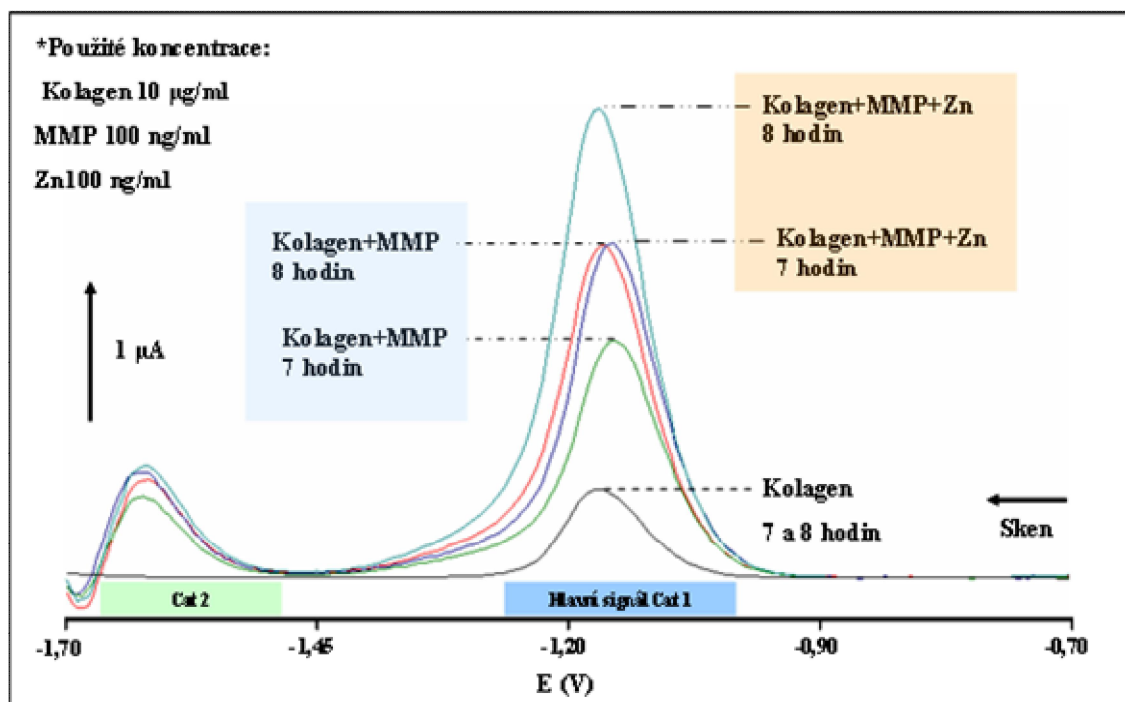
Nyní jsme mohli provést analýzu vlastní interakce, která probíhala následovně. Použili jsme vzorek kolagenu o koncentraci 1 µg/ml a akumulovali ho po dobu 90 s na HMDE. Po této době jsme HMDE omyli ve vodě o ACS čistotě a ponořili do kapky vzorku MMP-9 o koncentraci 1 ng/ml a opět akumulovali 90 s. Po uplynutí této doby byla HMDE omyta a analýza mohla proběhnout. Zjistili jsme že po aplikaci MMP-9 na kolagen se signál kolagenu

zvýšil přibližně dvakrát a pozice se posunula na -1,63 V oproti detekci samotného kolagenu a MMP-9 (-1,4 V). Pro ověření jsme snížili koncentrace obou látek o polovinu, tedy na 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a změřili jsme samotný kolagen a poté po aplikaci 0,5  $\text{ng/ml}$  MMP-9. Vlivem toho signál poklesl oproti koncentracím 1  $\mu\text{g/ml}$  téměř o polovinu a rovněž tak i signál po interakci klesl o polovinu. Lze usuzovat, že vzrůst signálu kolagenu ovlivňuje MMP-9 tím, že byl kolagen štěpen na menší fragmenty, které jsou lépe přístupné k povrchu pracovní elektrody a poskytují tak vyšší signál. Výsledky byly potvrzeny pomocí gelové chipové elektroforézy (není ukázáno).

### *Brdičkova reakce jako další nástroj pro studium MMP-9*

Jak bylo výše ukázáno, CPSA je vhodným nástrojem pro studium interakcí MMP-9 s kolagenem.

I přes citlivost použité elektrochemické techniky není vhodná pro sériové analýzy a studium řady různých faktorů, které mohou aktivitu MMP-9 ovlivnit. Proto nás zajímalo, jestli jsme schopni takové interakce studovat i pomocí další elektrochemické metody. Pro tento účel jsme zvolili metodu diferenční pulsní voltametrie v Brdičkově roztoku<sup>24</sup>. Byly použity roztoky o zásobní koncentraci: kolagen 1  $\text{mg/ml}$  (v 9% HCl), MMP-9 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{ZnCl}_2$  10  $\mu\text{g/ml}$ . Příprava pracovního elektrolytu probíhala tak, že nejprve byl do pracovní elektrochemické nádoby obsahující 2 ml Brdičkovy soluce nadávkován zásobní roztok kolagenu v objemu 20  $\mu\text{l}$  za odebrání ekvivalentního objemu Brdičkovy soluce z nádoby. Výsledná koncentrace kolagenu v pracovním roztoku Brdičkovy soluce tak činila 10  $\mu\text{g/ml}$ . Po přidání kolagenu byla teplota pracovního roztoku zvýšena z laboratorní na teplotu fyziologickou, tedy 37 °C pomocí průtokové nádoby připojené na termostat Julabo a byla přidána MMP-9. Dále následovaly tři varianty analýzy. První varianta byla detekce samotného kolagenu o množství 20  $\mu\text{g}$  (Obr. 2, modrá křivka). Druhá varianta byla detekce kolagenu (20  $\mu\text{g}$ ) s MMP-9 o množství 200  $\text{ng}$  (Obr. 2, zelená křivka). Třetí varianta analýzy probíhala ve směsi kolagen (20  $\mu\text{g}$ ), MMP-9 (200  $\text{ng}$ ) a  $\text{ZnCl}_2$  o množství 200  $\text{ng}$  (Obr. 2, červená křivka). Roztoky byly utěsněny v nádobce parafilmem, aby nedocházelo k vypařování vzorků, které bylo během osmihodinové analýzy minimální (do pěti procent z celkového objemu).

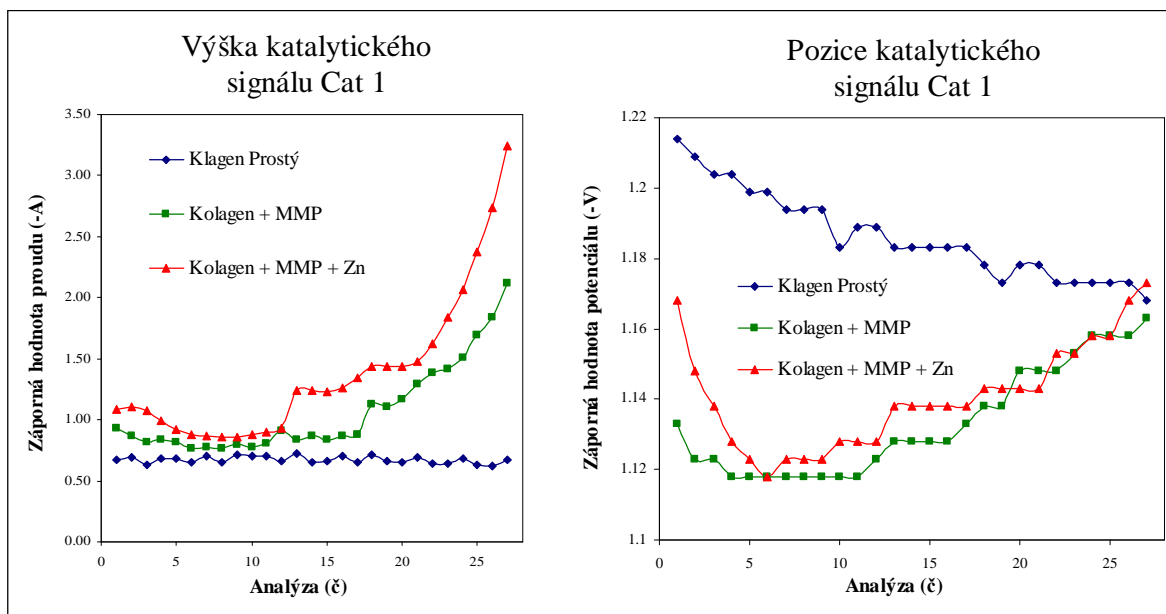


**Obr. 2:** Typické voltamogramy kolagenu inkubovaného v prostředí MMP.9.

Interakce kolagenu s MMP-9 přinesla zajímavé výsledky. Pík, který zodpovídá za přístupnost elektroaktivních skupin proteinů (-SH, -NH<sub>2</sub>) s názvem Cat1 se v průběhu inkubace těchto dvou proteinů postupně zvyšoval. Tento fakt je možné vysvětlit interakcí MMP-9 s kolagenem, kde docházelo k postupné degradaci kolagenu a tím se zvyšoval počet elektroaktivních skupin schopných elektrochemické přeměny na povrchu pracovní elektrody (Obr. 2 a Obr. 3, zelená křivka). Signál samotného kolagenu se během inkubace příliš neměnil (Obr. 3, modrá křivka).

Tyto proteiny ve své struktuře obsahují zinečnaté ionty, které je schopen transportovat protein metalothionein. Proto jsme celý experiment zjednodušili a analyzovali směs kolagenu, MMP-9 a zinečnatých iontů. Výsledek našich analýz je možné vidět na Obrázcích 2 a 3, červená křivka. Elektrochemický signál Cat1 se zvyšoval po celou dobu inkubace. Přibližně v 360. minutě došlo ke zlomu a signál vzrostl během následujících několika desítek minut téměř o padesát procent. Struktura kolagenu je kompaktní a je velmi pravděpodobné, že tento zlom značí štěpení této struktury na menší fragmenty. Nejzajímavějším výsledkem je, že aktivita MMP-9 v prostředí zinečnatých iontů (100 ng/ml) je vyšší v porovnání s experimentem kolagen-MMP-9 bez přítomnosti těchto iontů (Obr. 3).





**Obr. 3:** Závislost výšky a pozice signálu Cat 1 na délce interakce mezi MMP-9 a kolagenem. Časový rozestup mezi analýzami byl 17 minut.

## Závěr

V této práci se nám podařilo unikátní volbou metod pro analýzy prokázat možnost využití elektrochemických metod pro studium aktivity matrixové metaloproteinázy 9, která je hlavním prvkem v degradaci a přestavování živočišné extracelulární matrix. Nejprve byly optimalizovány postupy elektrochemické detekce pomocí chronopotenciometrické analýzy ve spojení s adsorpční přenosovou technikou. Následně byla touto metodou testována možnost elektrochemického monitorování změn při vazbě MMP na substrát kolagenu, jenž byl akumulován na povrch pracovní elektrody. To vše nám dalo dostatek podkladů pro další práci, která se týkala ověření experimentálního schématu pomocí chipové elektroforézy. Tou bylo prokázáno, že zvýšená teplota může aktivovat u MMP-9 štěpení v přítomnosti substrátu kolagenu. S těmito výsledky jsme se opět vrátil k elektrochemické analýze. Zvolili jsme metodu diferenční pulsní voltametrie - Brdičkovy reakce. Tou jsme získali experimentální data, která svědčí o průběhu enzymatického působení MMP-9 na kolagen při fyziologické teplotě a o zvýšení aktivity v případě aplikování ekvimolárního množství zinkových iontů.

## Poděkování

Tento výzkum byl finančně podporován granty GA AV IAA401990701 a 2A-1591/122 - MPO.

## Literatura

1. Puente X.S., Sanchez L.M., Overall C.M., Lopez-Otin C.: *Nat. Rev. Genet.* 4, 544 (2003).
2. Bode W.: *Proteases and the Regulation of Biological Processes* 70, 1 (2003).
3. Borkakoti N.: *J. Mol. Med.* 78, 261 (2000).
4. Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R.: *Curr. Protein Pept. Sci., v tisku*, (2009).
5. Hamer D. H.: *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913 (1986).
6. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Electroanalysis* 10, 403 (1998).
7. Selesovska-Fadrna R., Fojta M., Navratil T., Chylkova J.: *Anal. Chim. Acta* 582, 344 (2007).
8. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
9. Petrlova J., Krizkova S., Zitka O., Hubalek J., Prusa R., Adam V., Wang J., Beklova M., Sures B., Kizek R.: *Sens. Actuator B-Chem.* 127, 112 (2007).
10. Sestakova I., Kopanica M., Havran L., Palecek E.: *Electroanalysis* 12, 100 (2000).
11. Strouhal M., Kizek R., Veccek J., Trnkova L., Nemecek M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
12. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
13. Krizkova S., Zitka O., Adam V., Beklova M., Horna A., Svobodova Z., Sures B., Trnkova L., Zeman L., Kizek R.: *Czech J. Anim. Sci.* 52, 143 (2007).
14. Fabrik I., Krizkova S., Huska D., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Eckschlager T., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis* 20, 1521 (2008).
15. Masarik M., Stobiecka A., Kizek R., Jelen F., Pechan Z., Hoyer W., Jovin T. M., Subramaniam V., Palecek E.: *Electroanalysis* 16, 1172 (2004).
16. Palecek E., Masarik M., Kizek R., Kuhlmeier D., Hassmann J., Schulein J.: *Anal. Chem.* 76, 5930 (2004).
17. Brazdova M., Kizek R., Havran L., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 115 (2002).
18. Sanchez J. L. A., Baldrich E., Radi A. E. G., Dondapati S., Sanchez P. L., Katakis I., O'Sullivan C. K.: *Electroanalysis* 18, 1957 (2006).
19. Ostatna V., Palecek E.: *Electrochim. Acta* 53, 4014 (2008).
20. Ostatna V., Uslu B., Dogan B., Ozkan S., Palecek E.: *J. Electroanal. Chem.* 593, 172 (2006).
21. Krizkova S., Hrdinova V., Adam V., Burgess E. P. J., Kramer K. J., Masarik M., Kizek R.: *Chromatographia* 67, S75 (2008).
22. Long G. L., Winefordner J. D.: *Anal. Chem.* 55, A712 (1983).

23. Huska D., Adam V., Zitka O., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis*, in press, (2009).
24. Petrova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).