

MUNI
SCI

Využití kapilární elektroforézy pro studium enzymů

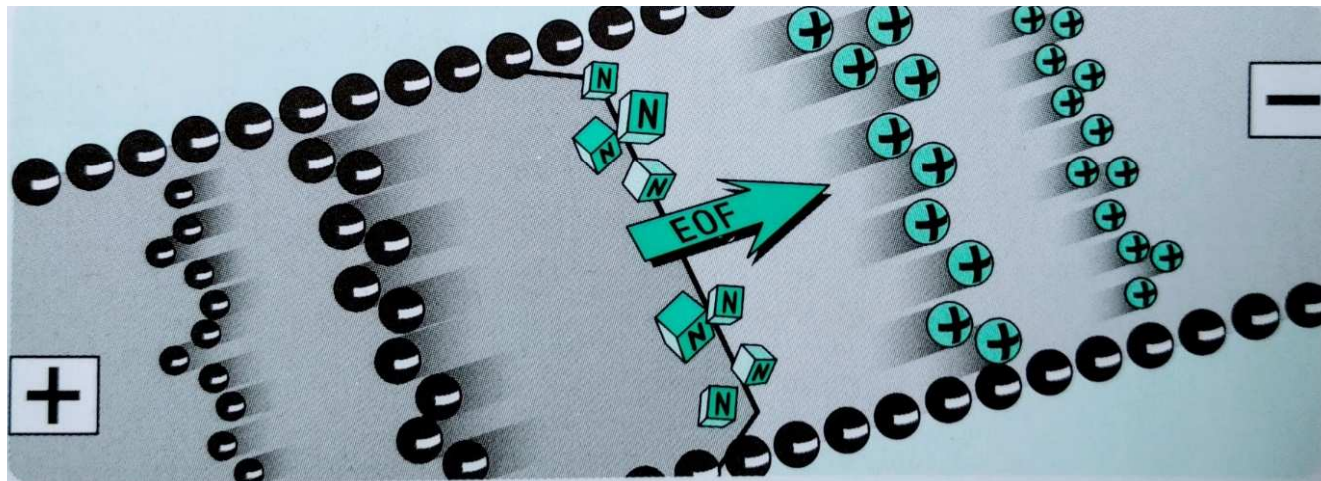
Nové směry v bioanalytické chemii

Roman Řemínek

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova
univerzita, Kamenice 5, 62500 Brno

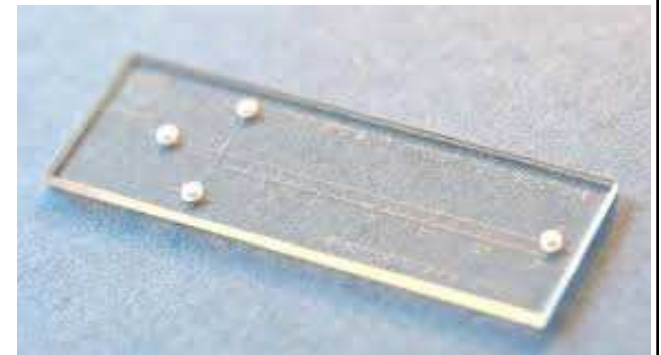
Kapilární elektroforéza

- Capillary Electrophoresis (CE)
- Elektroforéza = separační technika založená na rozdílech rychlosti migrace látek ve stejnosměrném elektrickém poli



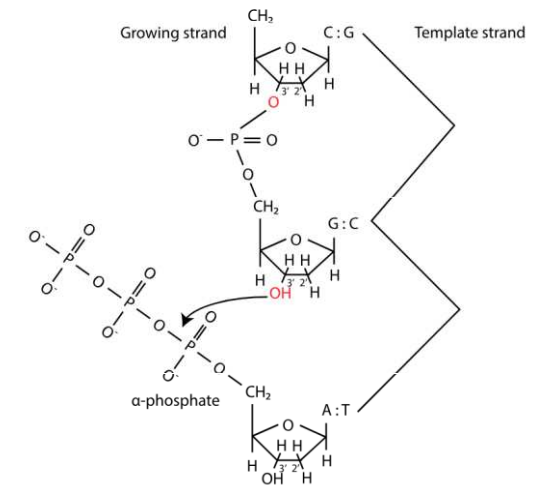
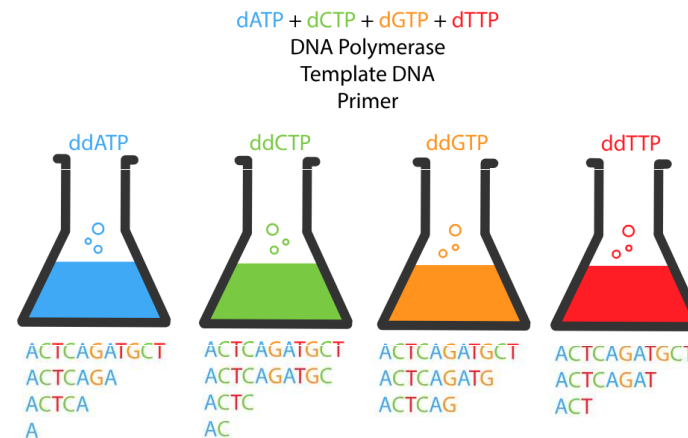
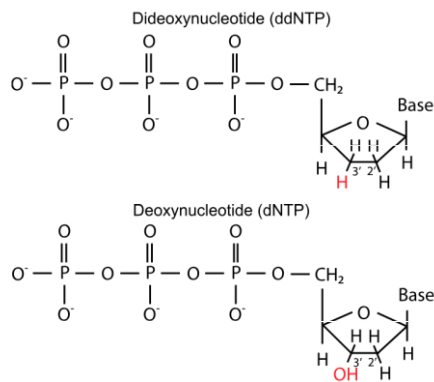
Historie CE

- 1807 - Kataforéza
- 1930 - Volná elektroforéza
- 1939 - Zónová elektroforéza
- 1967 - CE
- 1987 - 1. komerčně dostupný CE systém
- 1990–2003 - projekt lidského genomu
- 1992 - CE na čipu



Projekt lidského genomu

- Sangerova metoda sekvenování DNA

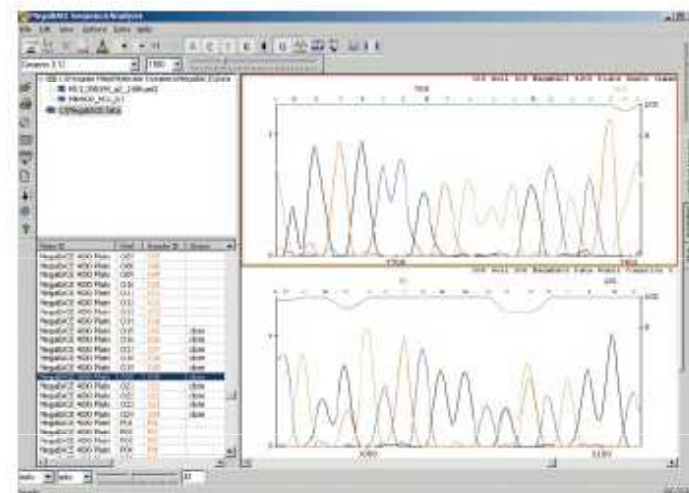
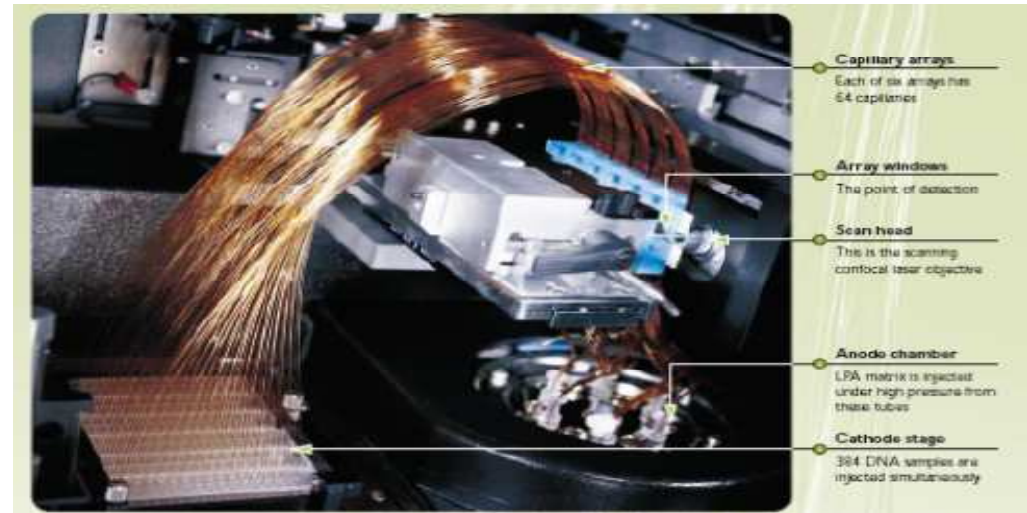


Primer

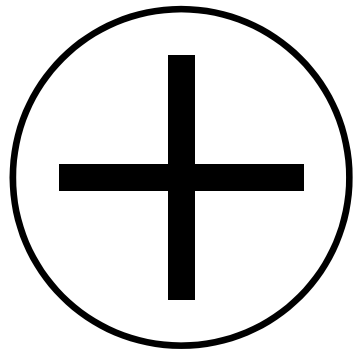
ACGTACGTACTCAGATGCT
 ACGTACGTACTCAGATGC
 ACGTACGTACTCAGATG
 ACGTACGTACTCAGAT
 ACGTACGTACTCAGA
 ACGTACGTACTCAG
 ACGTACGTACTCA
 ACGTACGTACTC
 ACGTACGTACT
 ACGTACGTAC
 ACGTACGTA



Projekt lidského genomu



CE - princip separace



$$F_E = q E$$



$$F_F = -6 \pi \eta r v$$

$$q E = 6 \pi \eta r v$$

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

$$v = \mu_e E$$

v = ion velocity

μ_e = electrophoretic mobility

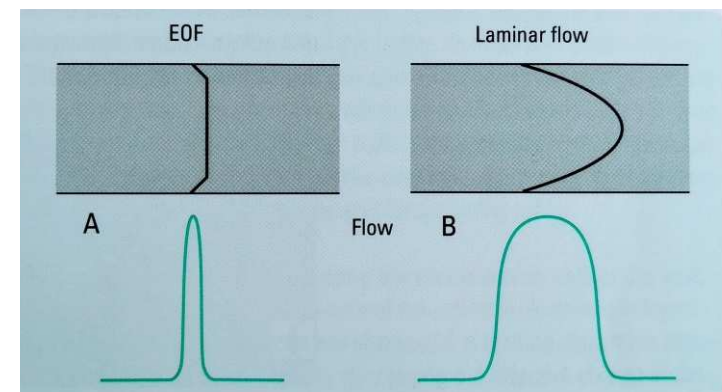
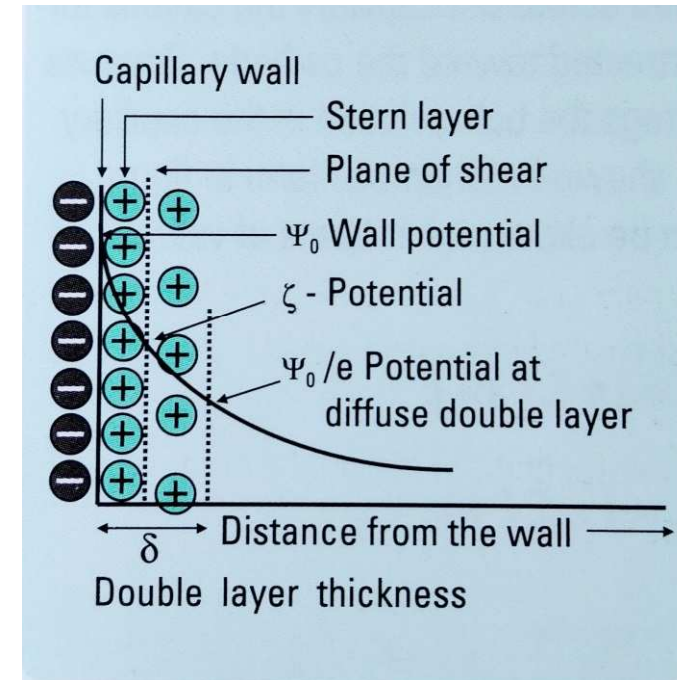
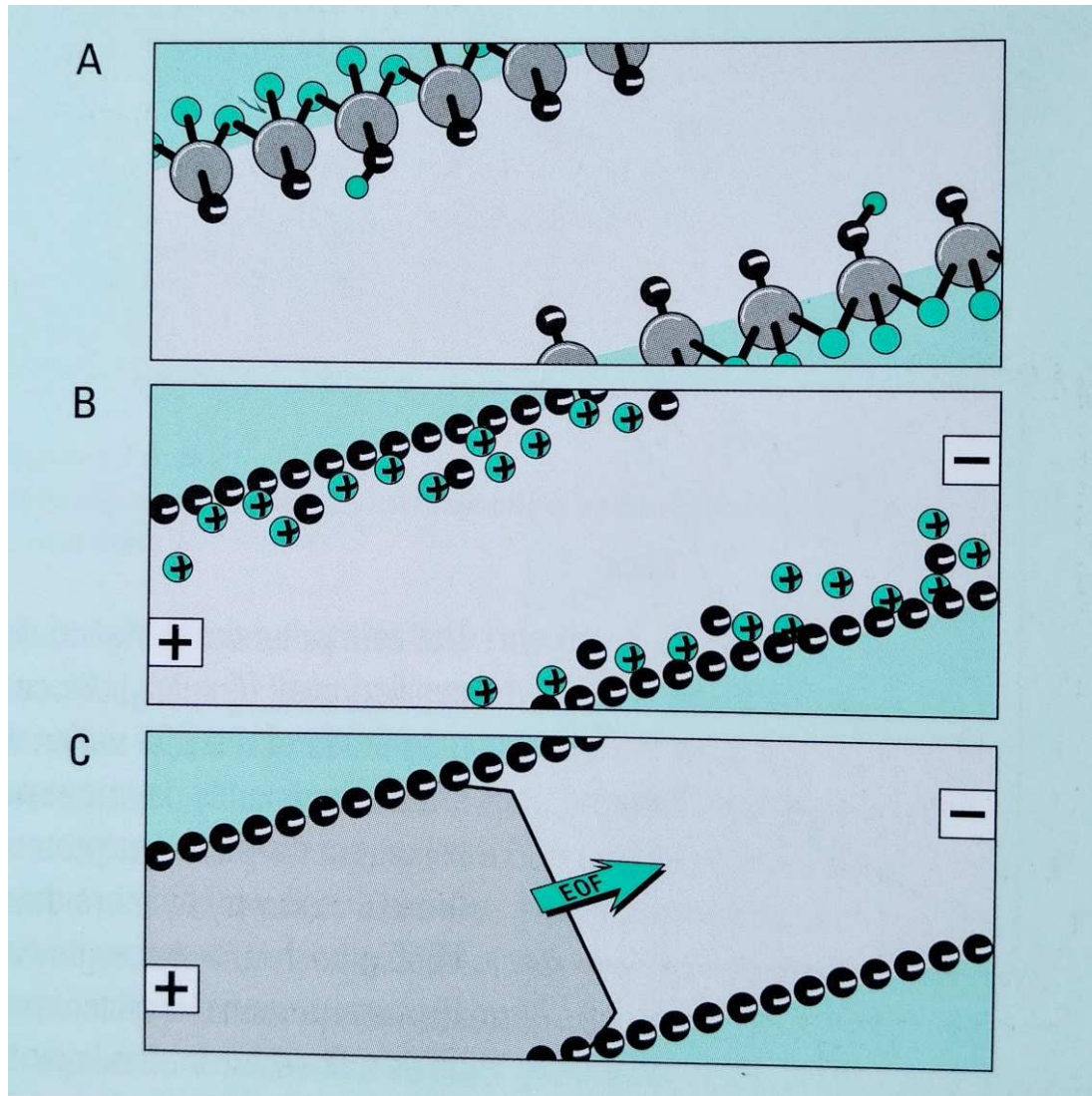
E = applied electric field

q = ion charge

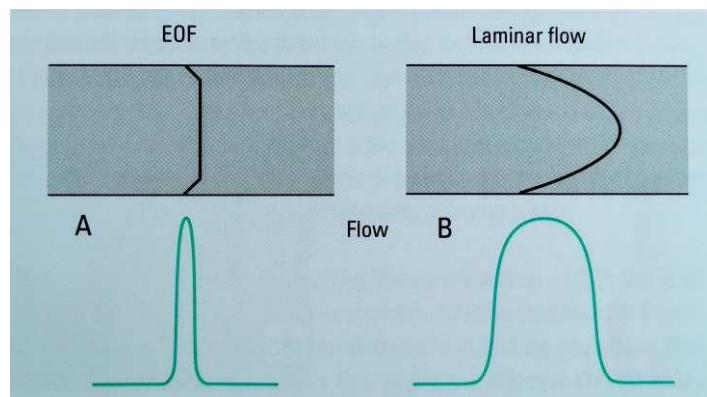
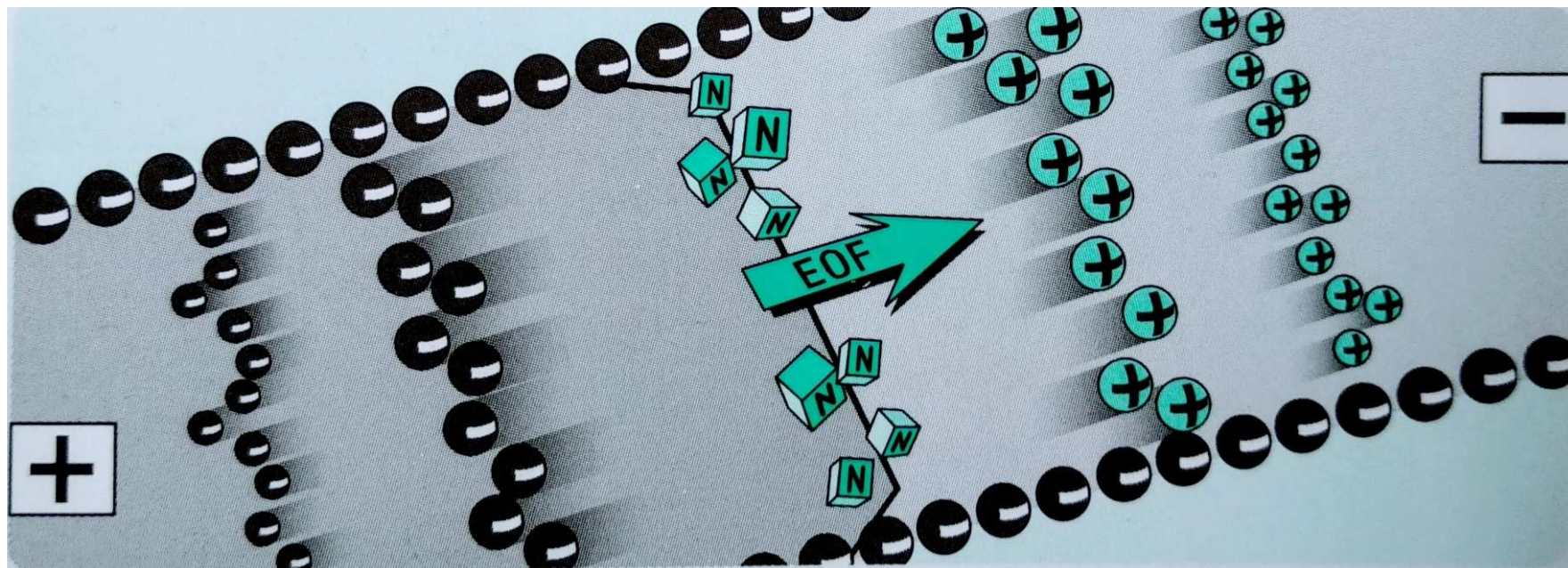
η = solution viscosity

r = ion radius

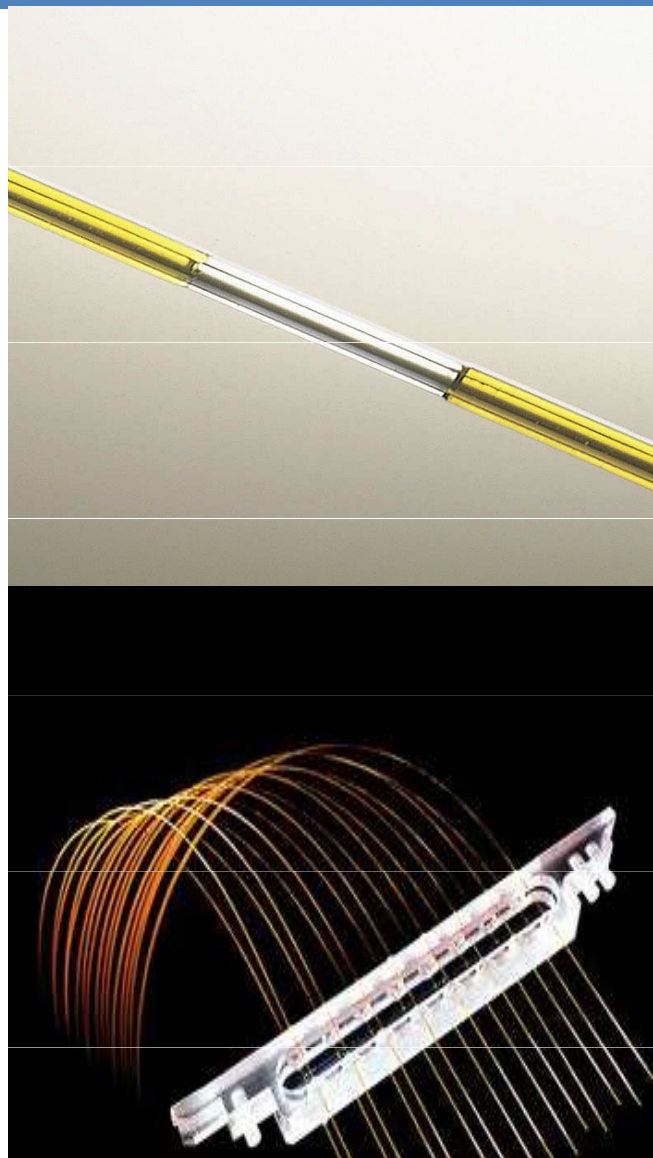
Elektroosmotický tok



CE - princip separace



Výhody a omezení CE



+ Aplikační diverzita

⇒ od atomů po celé buňky, variabilita detekce

+ Vysoká separační účinnost

⇒ až miliony teoretických pater

+ Malá spotřeba vzorku

⇒ jednotky až desítky nL

+ Malá spotřeba chemikálií

⇒ desítky mL týdně

+ Automatizace

⇒ Minimální riziko experimentální chyby

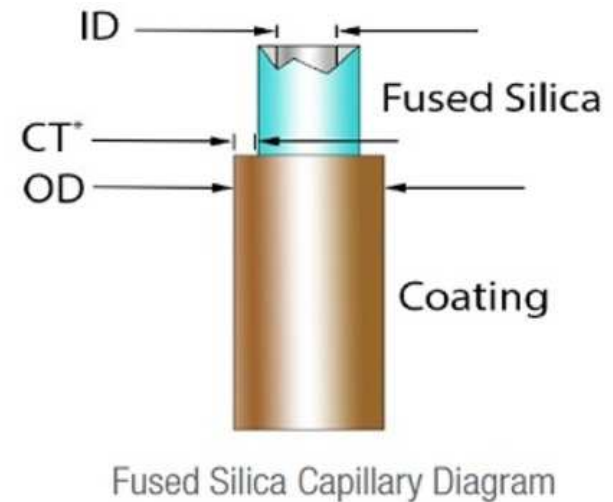
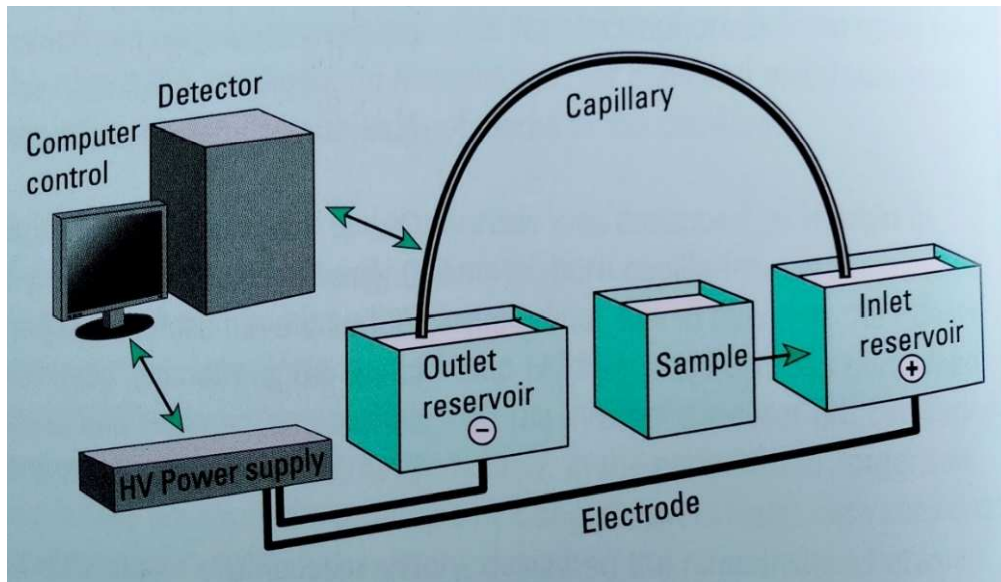
⇒ Vysoká propustnost systému

- **Citlivost** (v porovnání s HPLC)

- **Robustnost** (v porovnání s HPLC)



Instrumentace CE



Agilent 7100



Backman Coulter
800 Plus



PrinCE NEXT

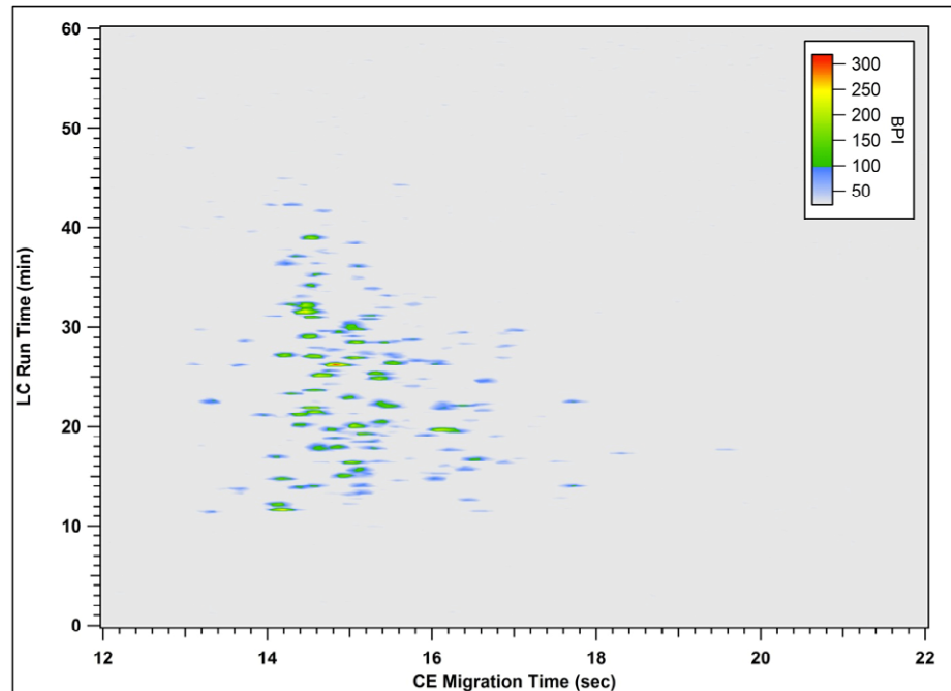
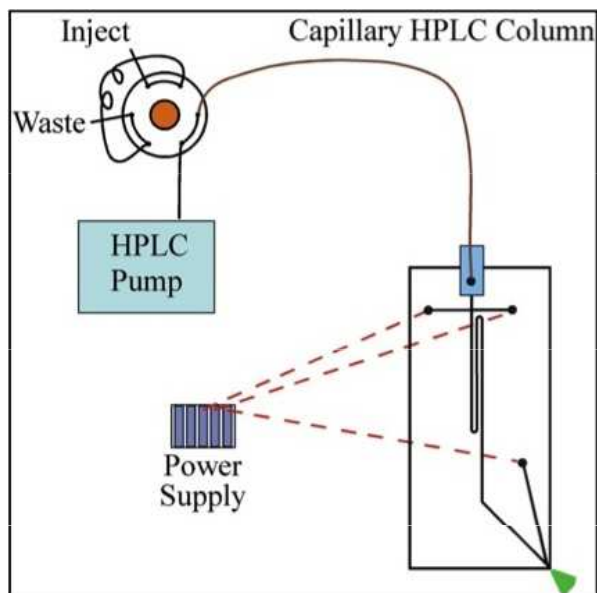


Lumex Capel-205

CE a (U)HPLC

- CE v současnosti představuje ortogonální techniku k (U)HPLC

⇒ 1. výběr separačního systému podle analytu
2. 2D separace

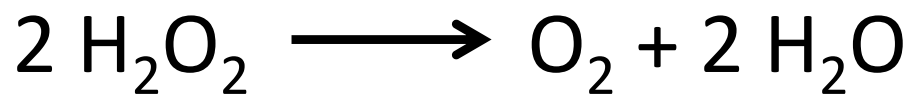


Praktické aplikace CE

- Analýzy DNA (RNA)
- + aplikace ve forenzní analýze
- Separace proteinů (Projekt lidského proteomu)
 - Analýzy a studium protilátek
 - QC při výrobě bio-farmaceutických preparátů (protilátky, vakcíny, proteiny, peptidy)
 - Bioanalýzy ve výzkumu
- + omezené množství vzorku, případně obtížné podmínky

Enzymy

- Enzym = biologický katalyzátor
- enzymy snižují aktivační energii reakce => výrazné zrychlení ($10^8 - 10^{14} \times$ oproti nekatalizované reakci)

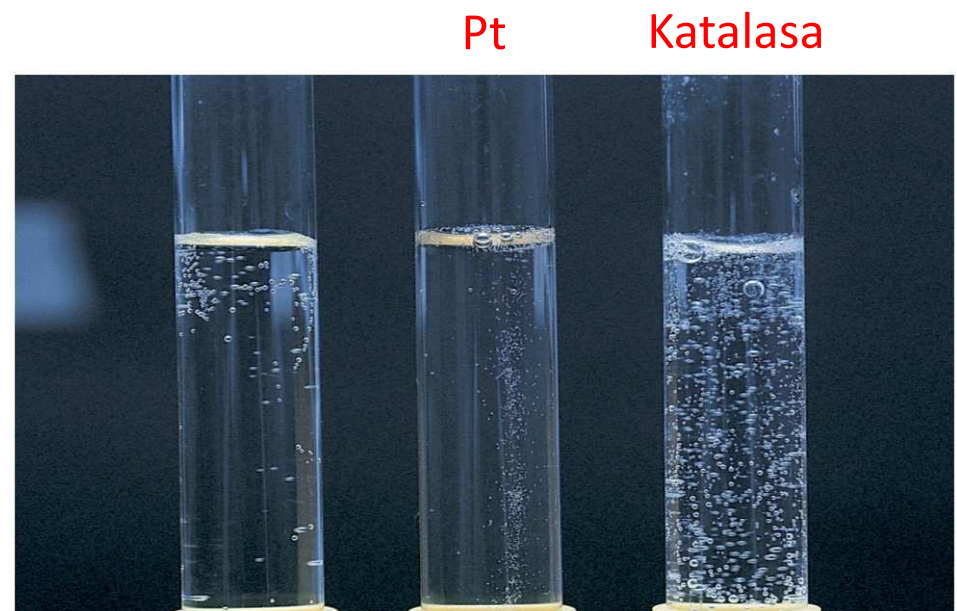


Rychlostní konstanta:

Bez katalýzy: $0,23 \text{ s}^{-1}$

Pt: $1,3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$

Katalasa: $3,7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$



Enzymy

- Význam - prakticky všechny biologické reakce v organismu jsou řízeny enzymaticky
- potravinářství a průmyslová výroba
 - biotechnologie
 - léčiva
 - cíl léčiv v organismu

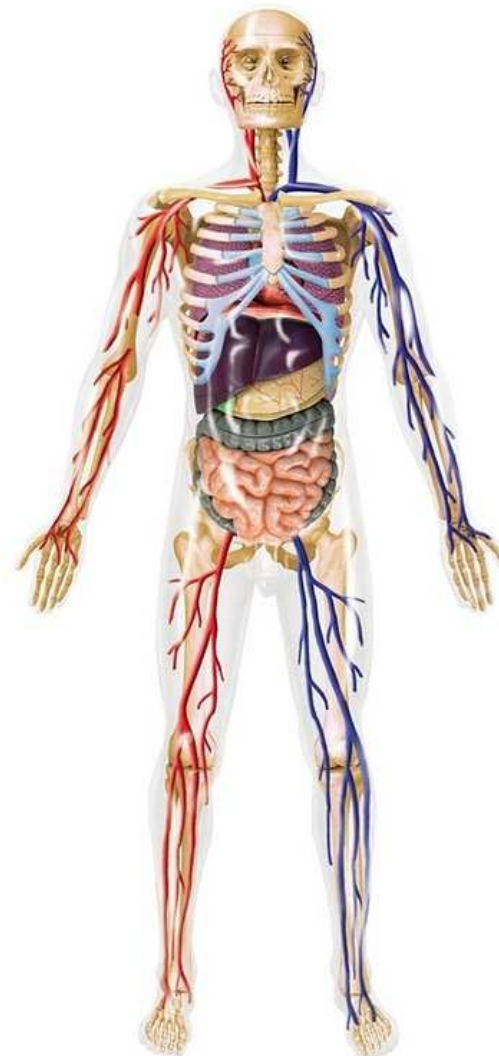
Vývoj léčiv



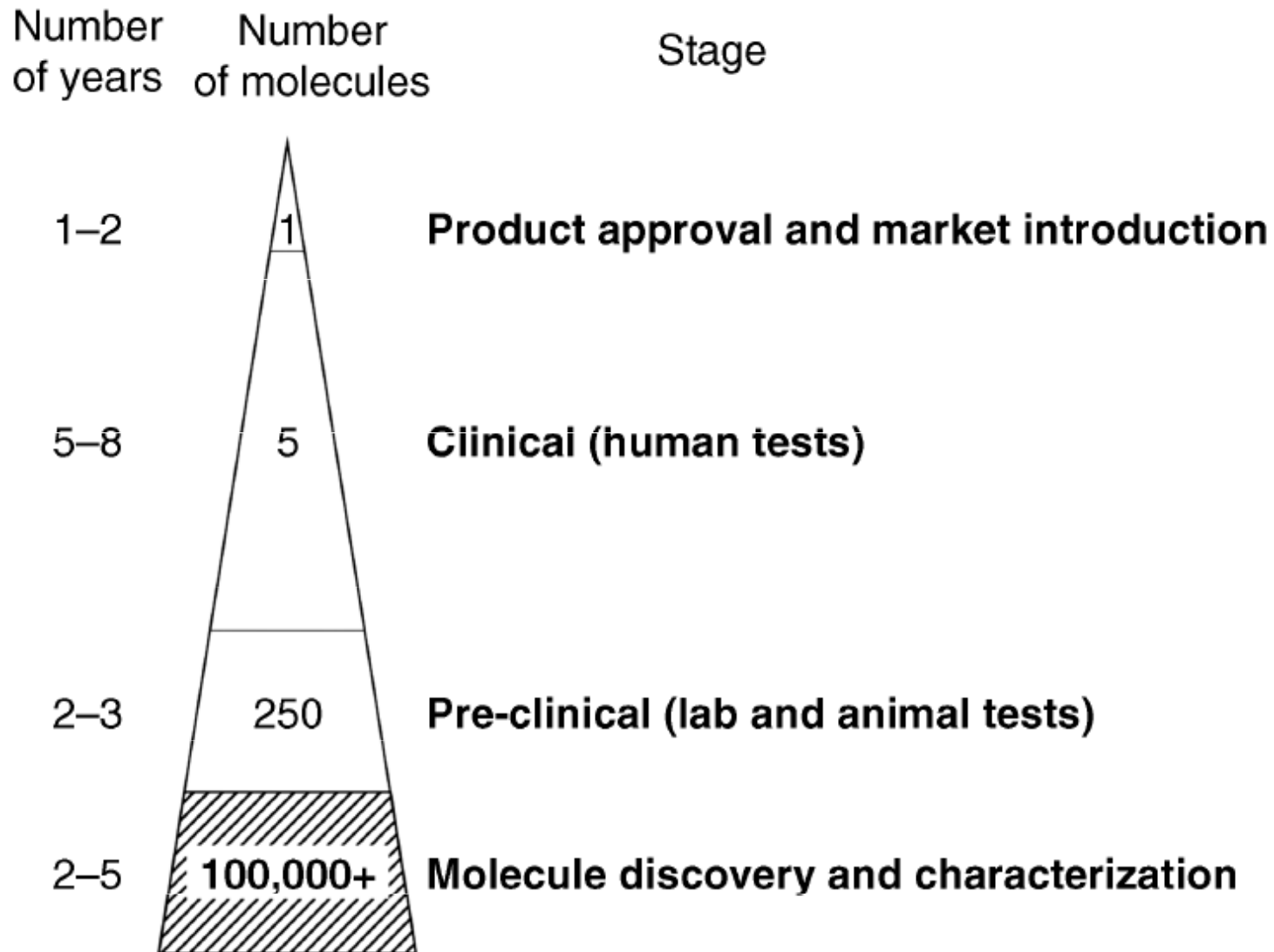
Farmakodynamika



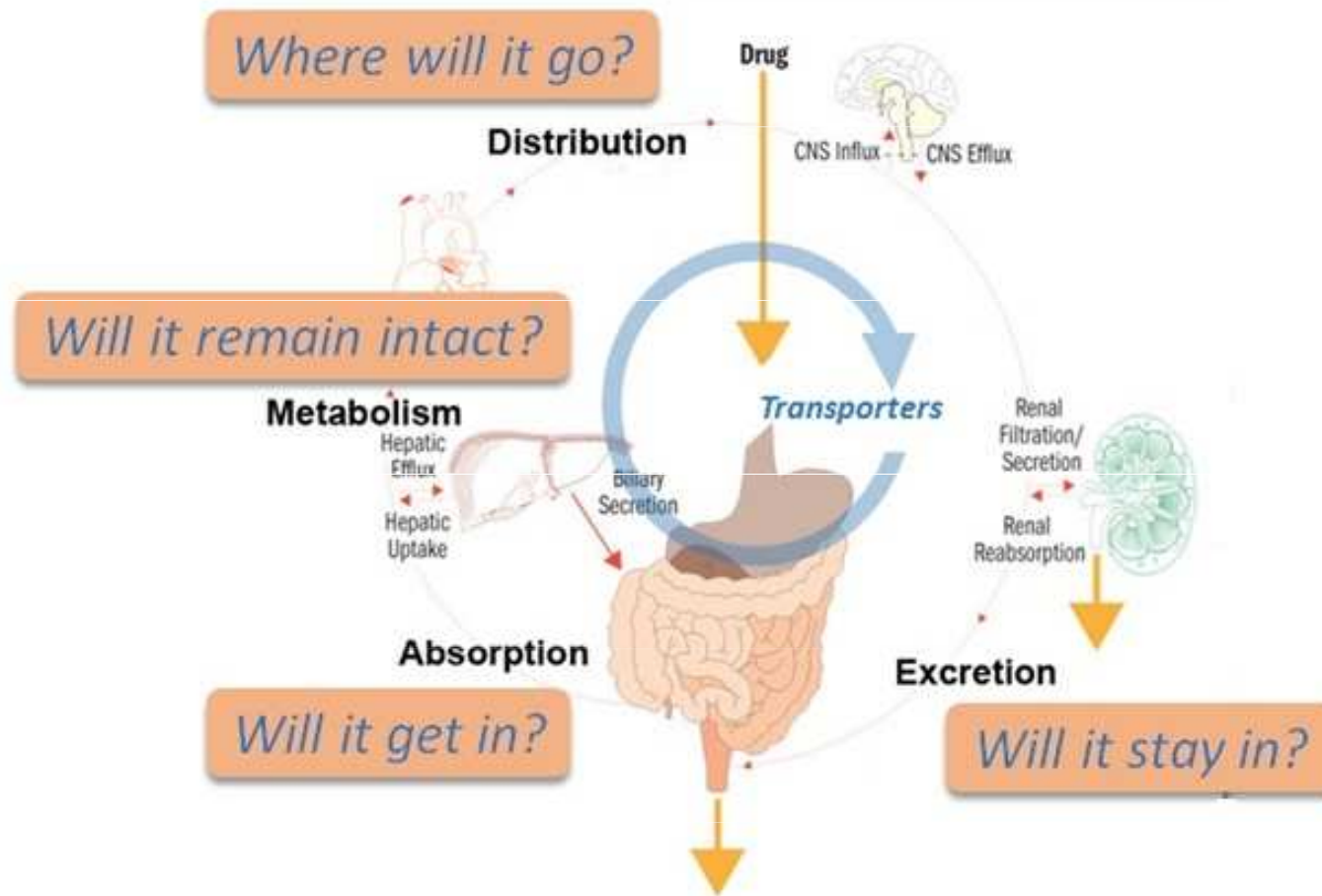
Farmakokinetika



Vývoj léčiv



Vývoj léčiv

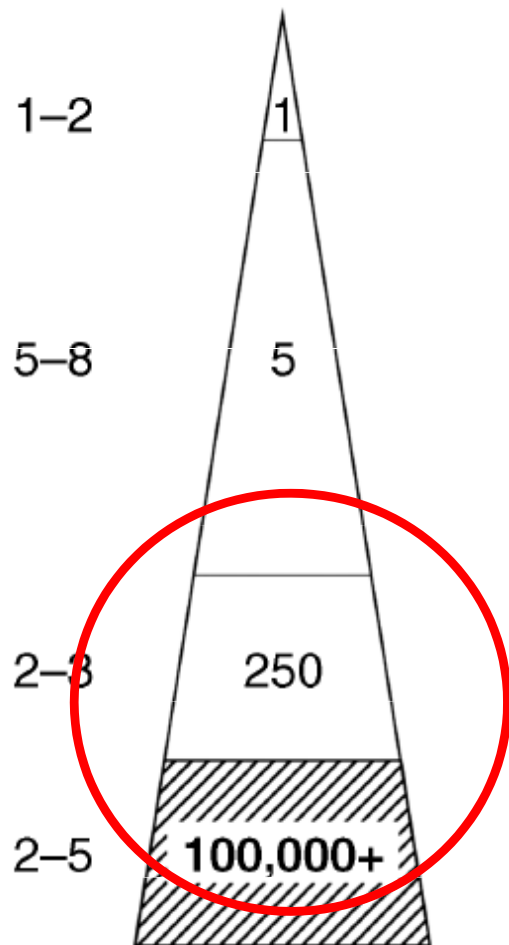


⇒ **ADME/tox studie**

Vývoj léčiv

Number of years Number of molecules

Stage



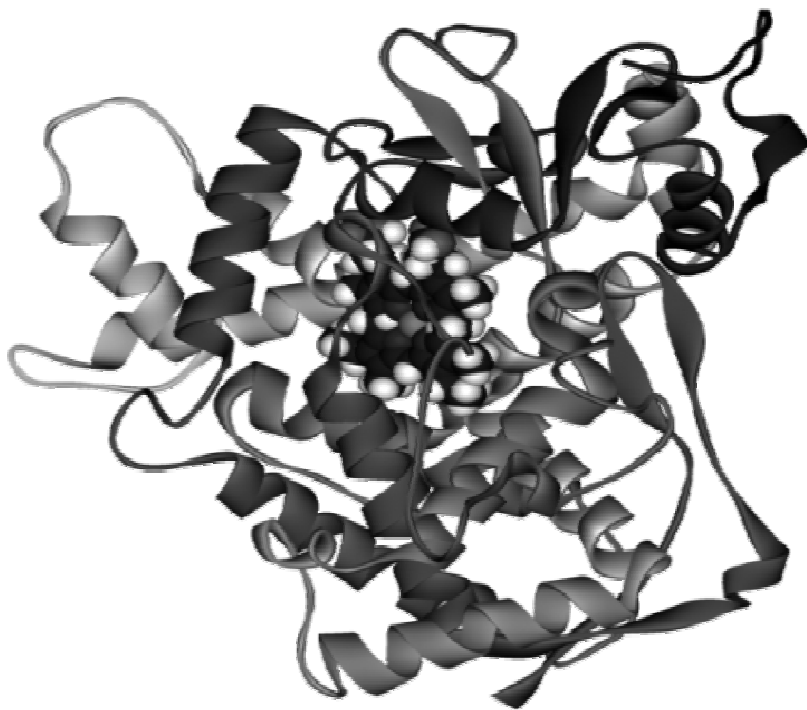
Dosing frame?
Administration frequency?
Dose-exposure relationship
linearity?
Drug-drug interactions?
etc.

ADME/tox →

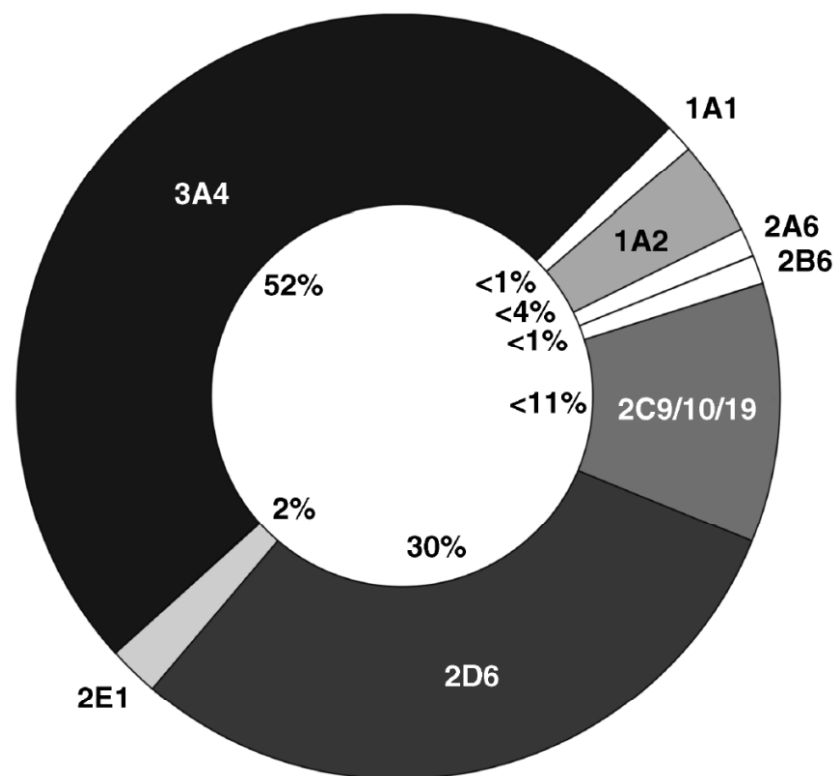
←
Intrinsic clearance
Bioavailability
Drug half-life
Kinetic parameters
Inhibition parameters
etc.

Studium metabolismu léčiv

- cytochromy P450 (CYP), hem-thiolátové oxidoreduktázy, zodpovídají za biotransformaci přibližně 90 % běžně používaných léčiv

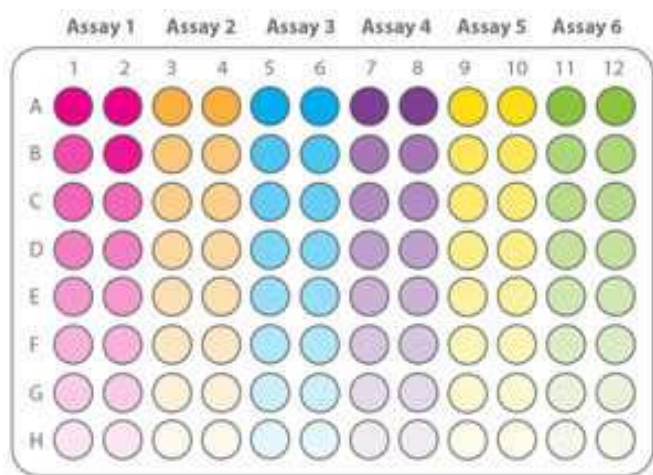


Model struktury CYP2C9.

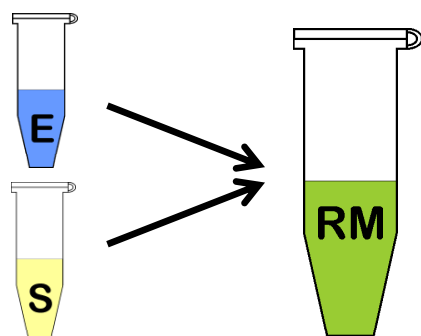


Podíl jednotlivých isoform CYP na metabolismu léčiv u člověka.

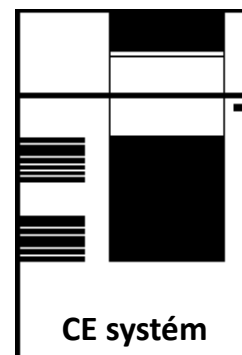
Stanovení aktivity CYP pomocí CE



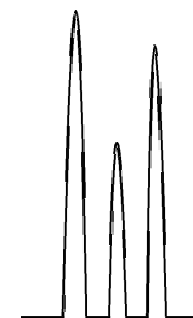
bez nutnosti použití fluorescenčně nebo radiometricky značených sloučenin



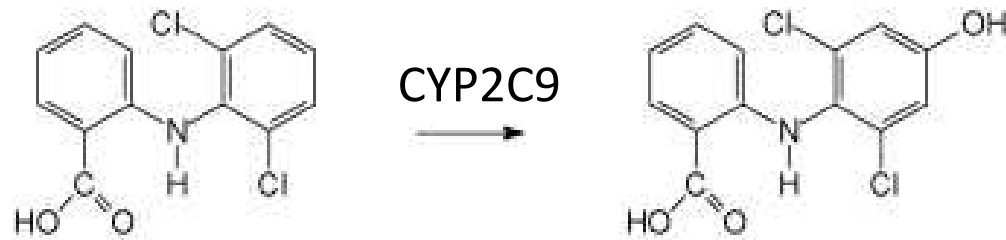
Inkubace



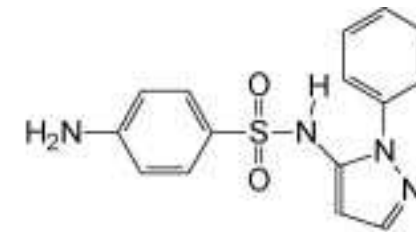
Analýza



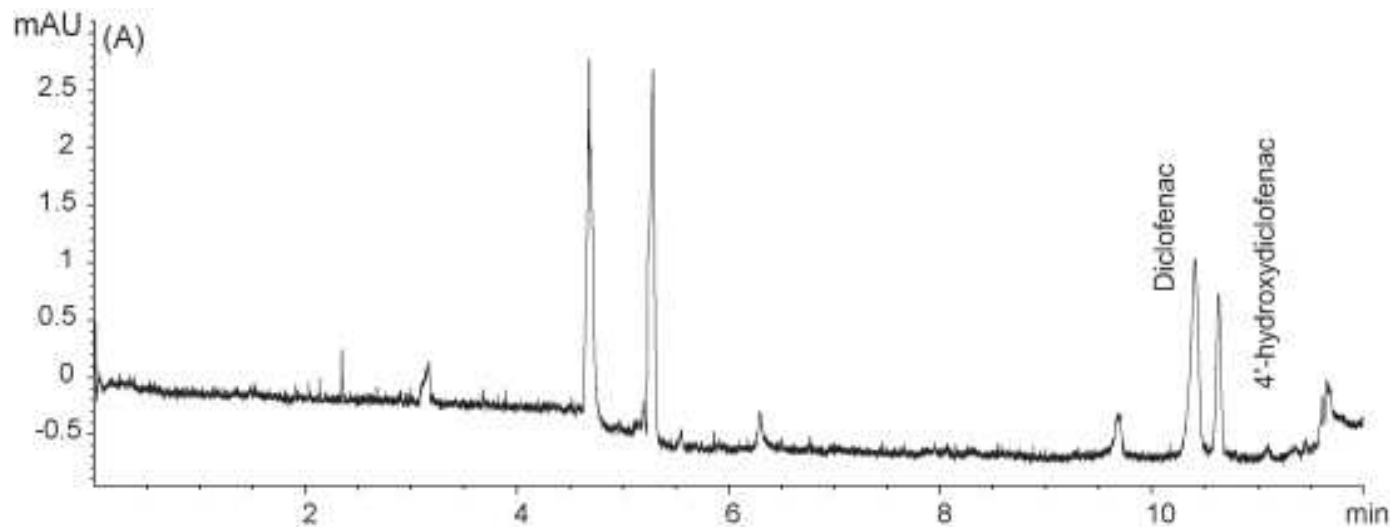
Příklad studie v off-line uspořádání



4'-hydroxylace diklofenaku



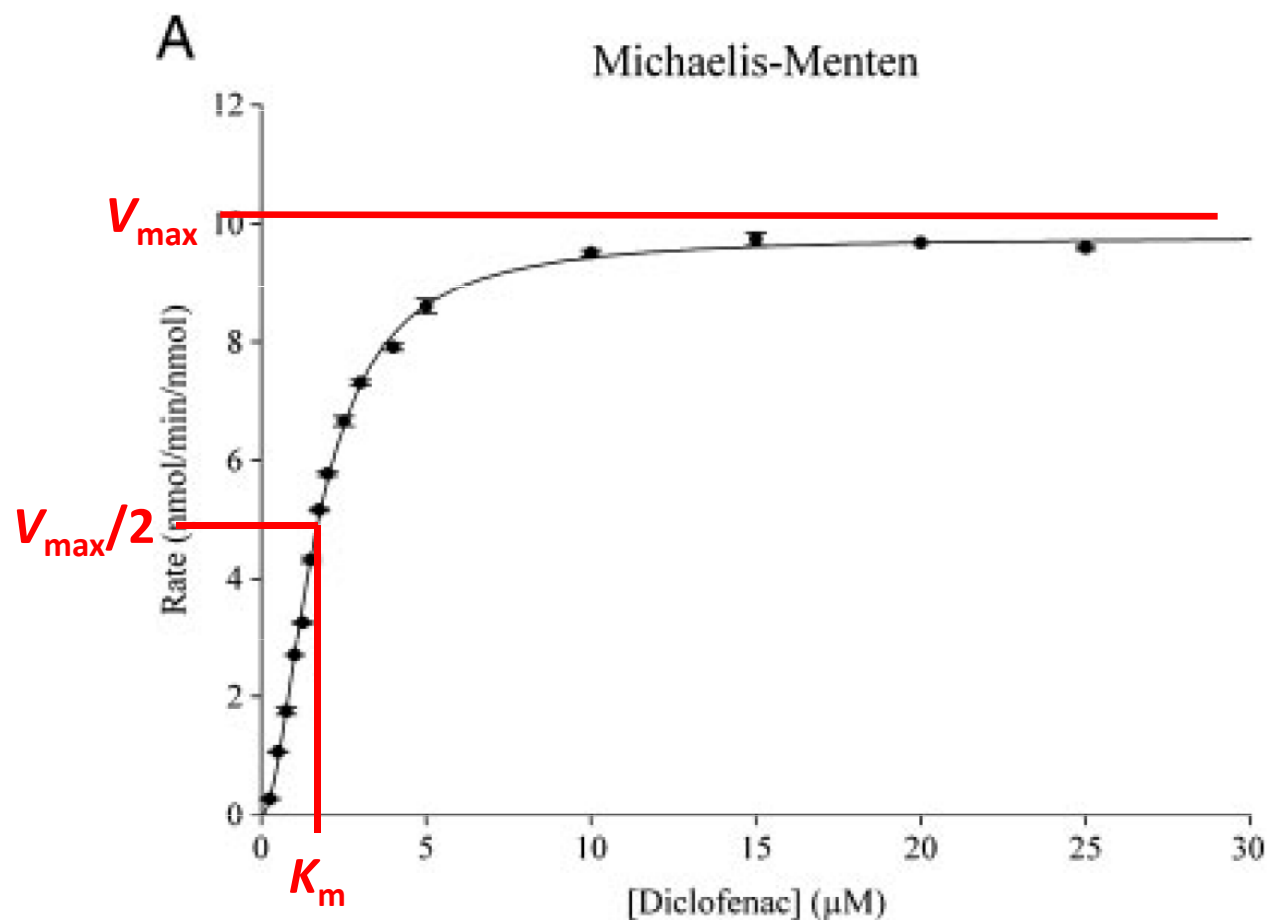
SULFAPHENAZOLE



Kinetika enzymové reakce

- Michaelisova konstanta - K_m
- Mezní (limitní) rychlost reakce - V_{max}

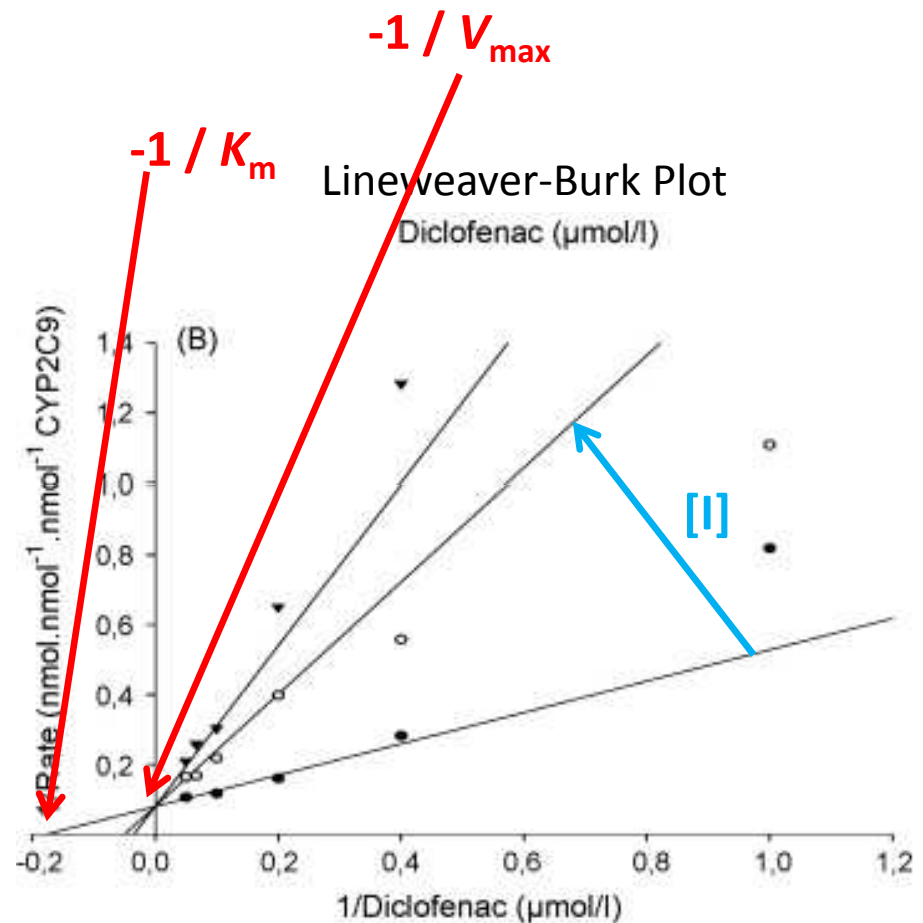
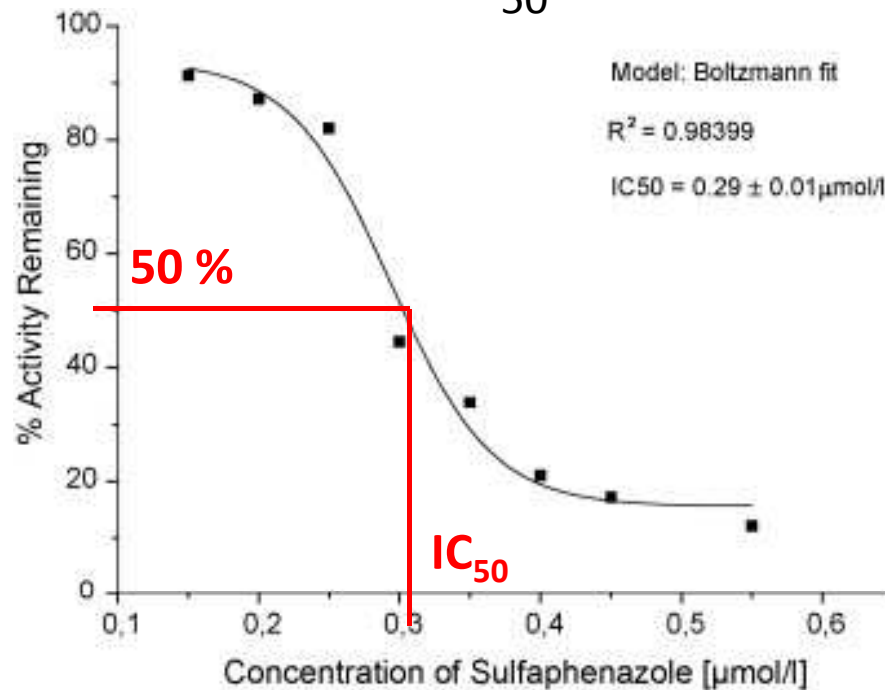
$$K_m = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$



Inhibice enzymové reakce

- 50% inhibiční koncentrace - IC_{50}
- Inhibiční konstanta - K_i
- Cheng-Prusoffova rovnice:

$$K_i = \frac{1 + [S] / K_m}{IC_{50}}$$

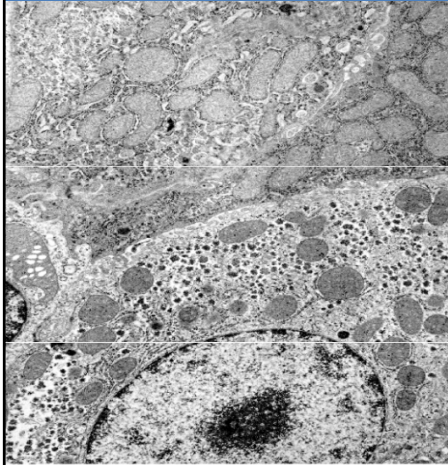


Lékové interakce

- vzájemné ovlivňování souběžně podávaných preparátů, kdy alespoň jeden z nich působí jako inhibitor nebo induktor cytochromů P450
- Např.:
 1. indukce: rifampicin + cyklosporin A
 2. inhibice: sulfaphenazol + warfarin



2. příklad studie v off-line uspořádání



Hepatocyt

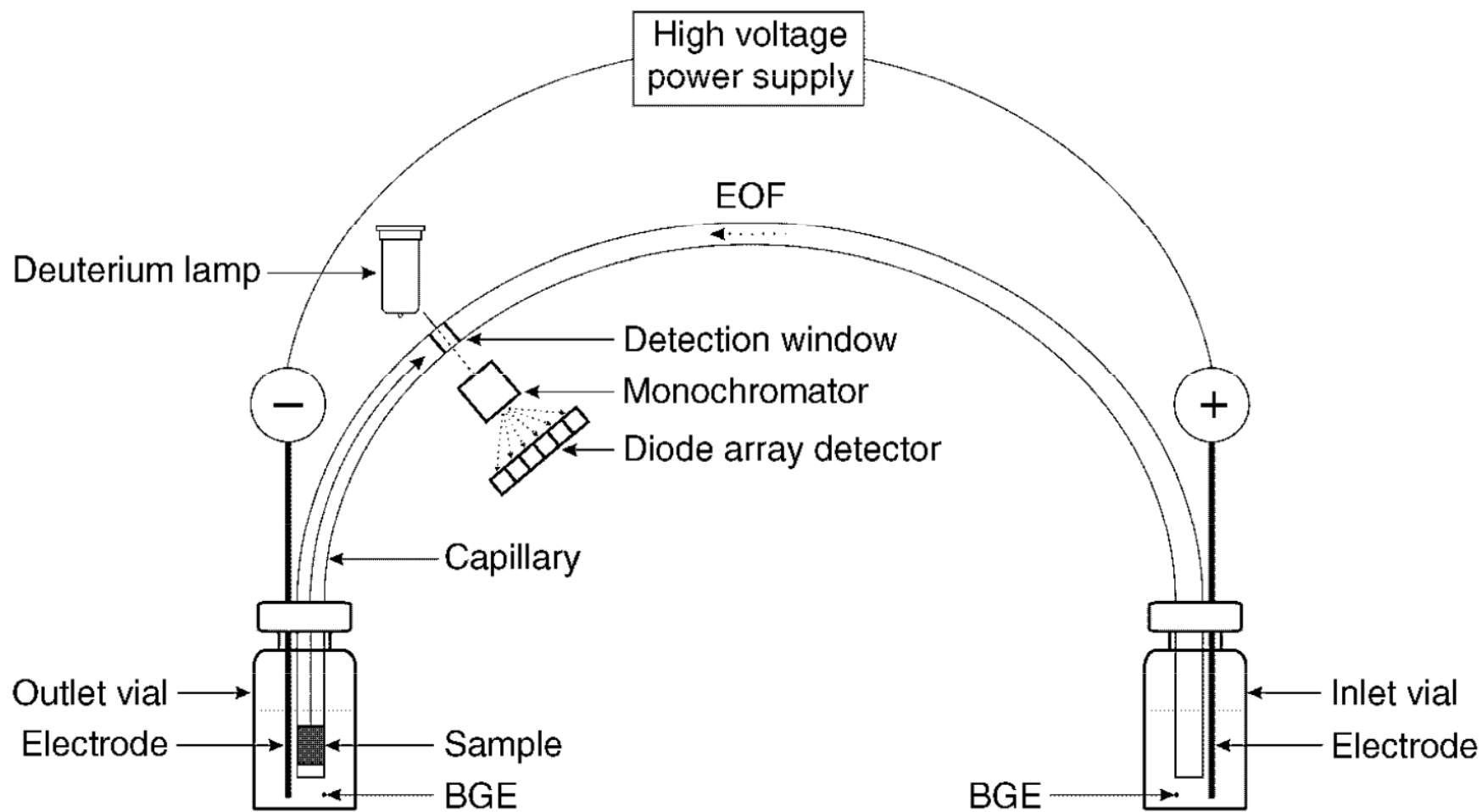
Lidské jaterní mikrosomy

= Malé vezikuly získané z endoplazmatického retikula homogenizované jaterní tkáň

- + vysoká koncentrace CYP
- + zastoupení všech isoform CYP
- + vysoká enzymová aktivita
- + jednoduchá příprava a použití
- + vysoká stability při skladování a inkubaci

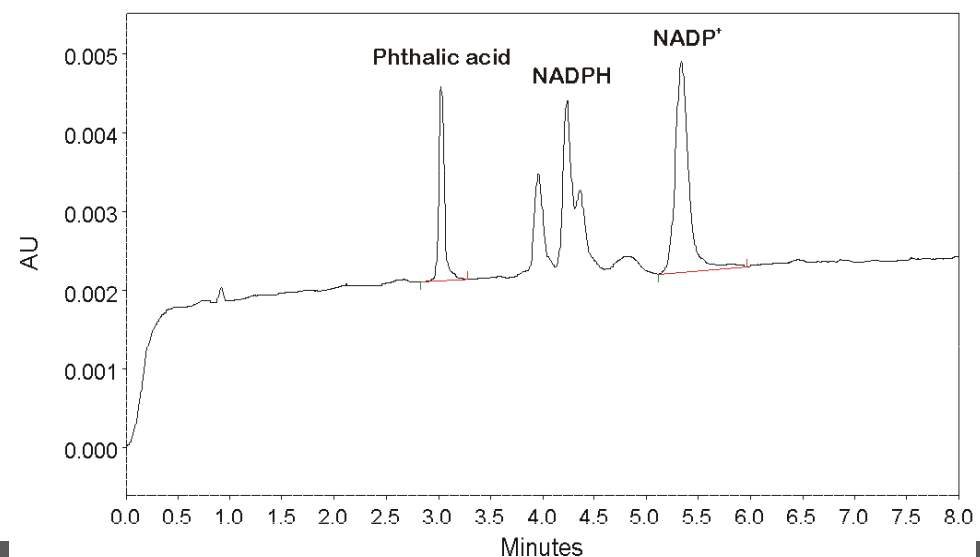
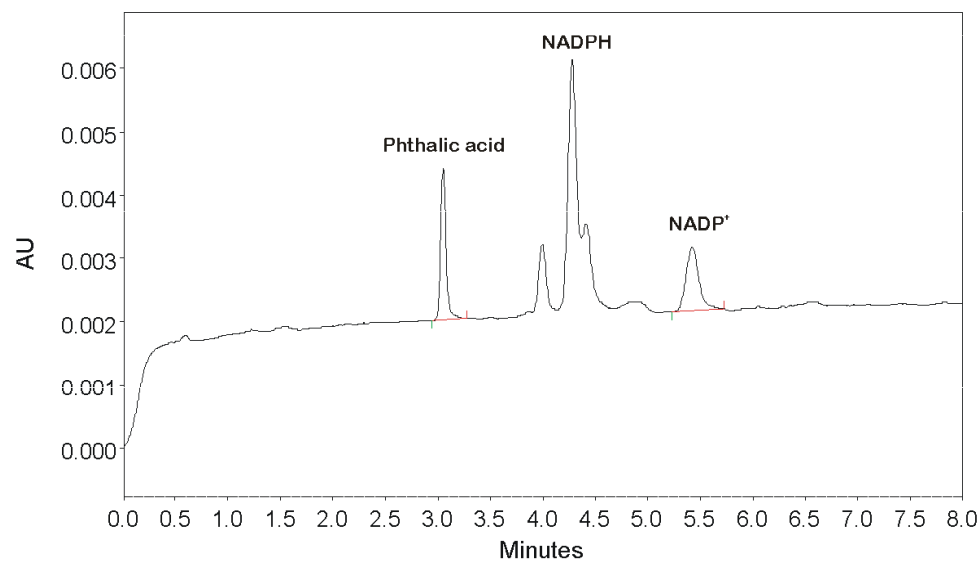


Dávkování z krátkého konce



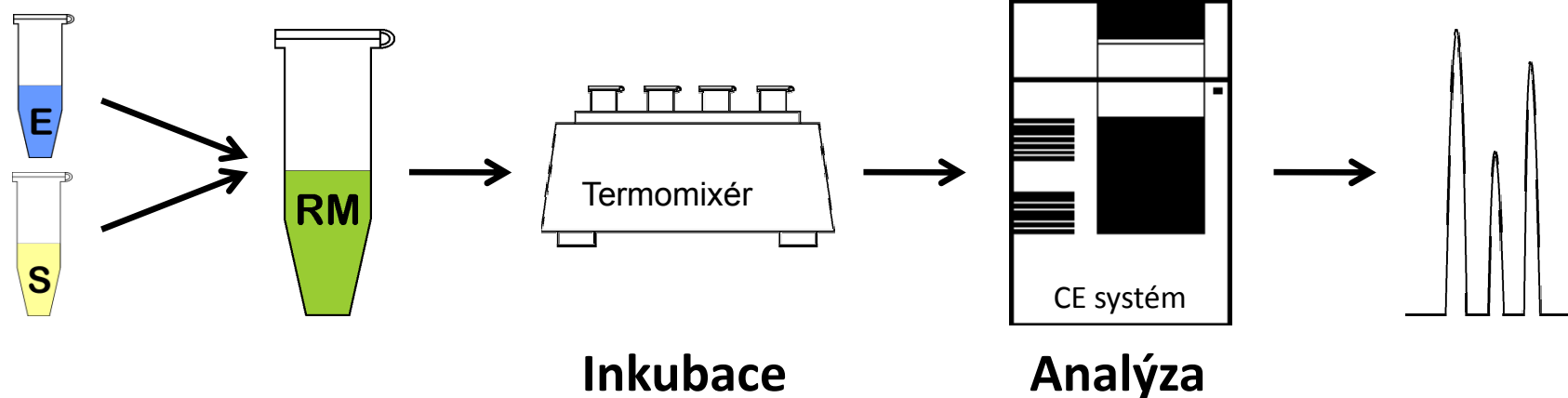
Stanovení stability léčiv

Bufuralol	-
Bupivakain	+
Cyclosporin	+
Cisapride	-
Erythromycin	+
Lidokain	+
Nifedipin	-
Propranolol	-
Quinidin	-
R-Warfarin	-
Testosteron	-
Verapamil	-

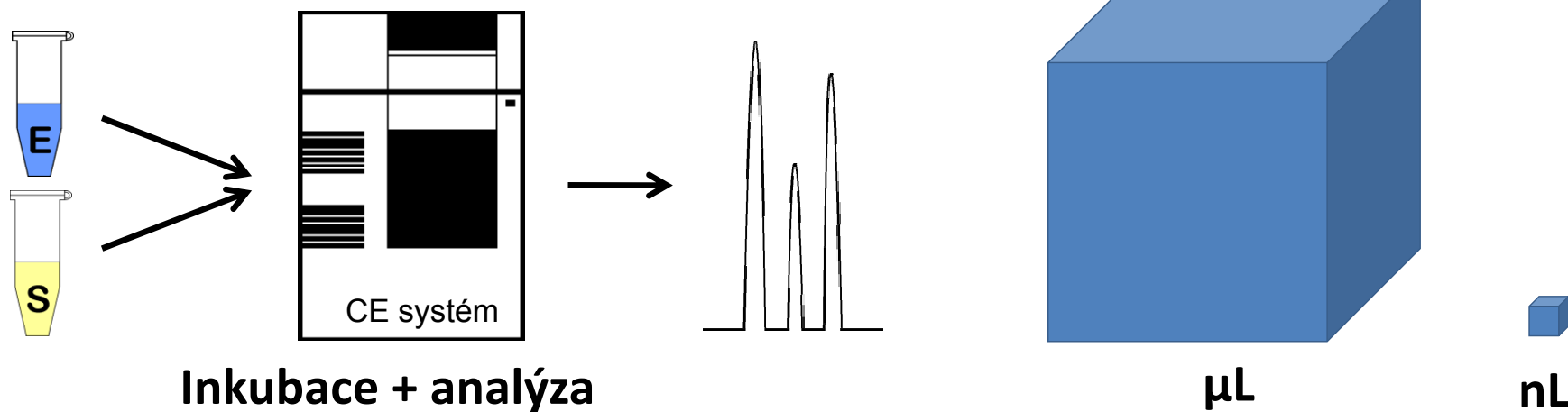


On-line uspořádání CE

Off-line



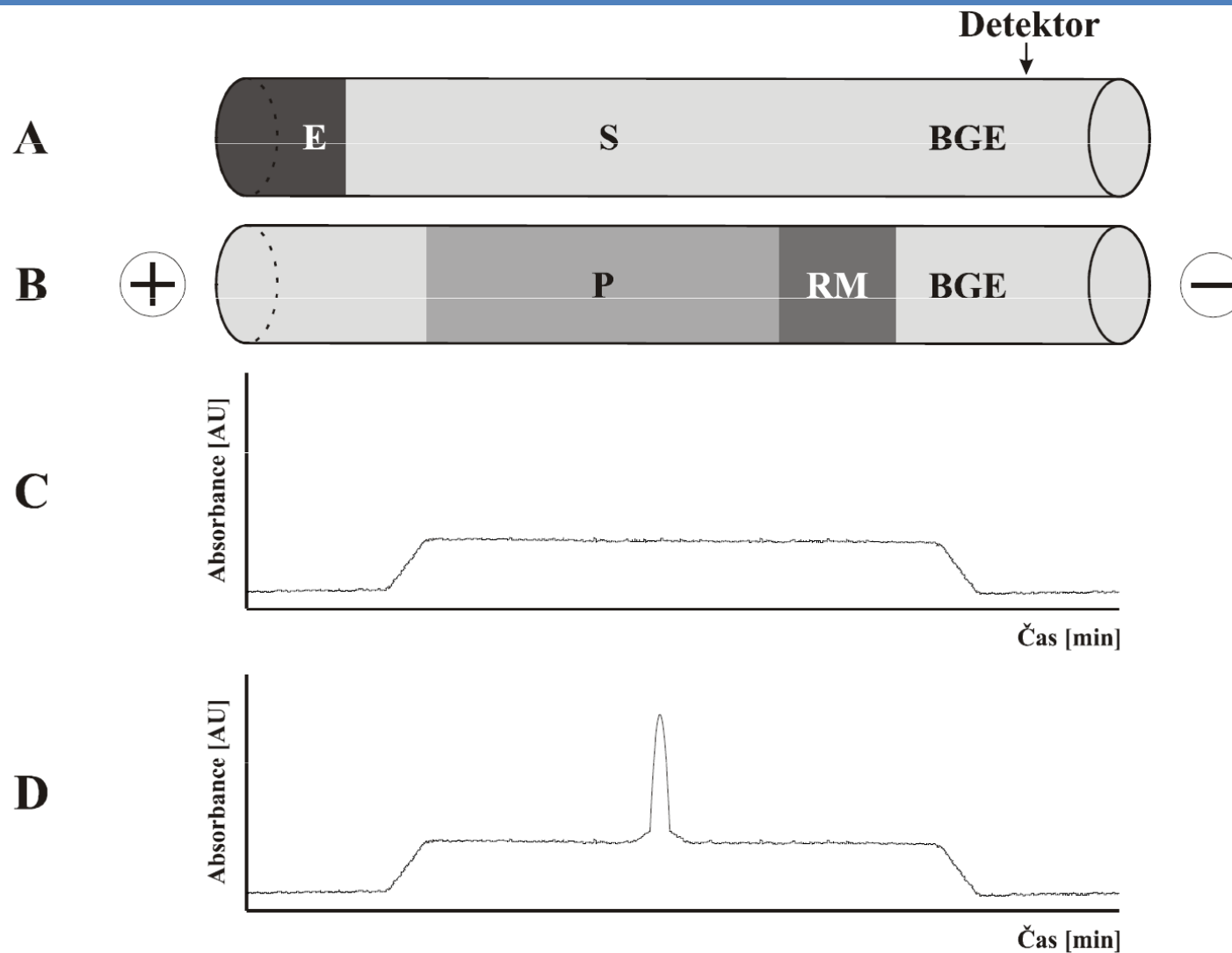
On-line



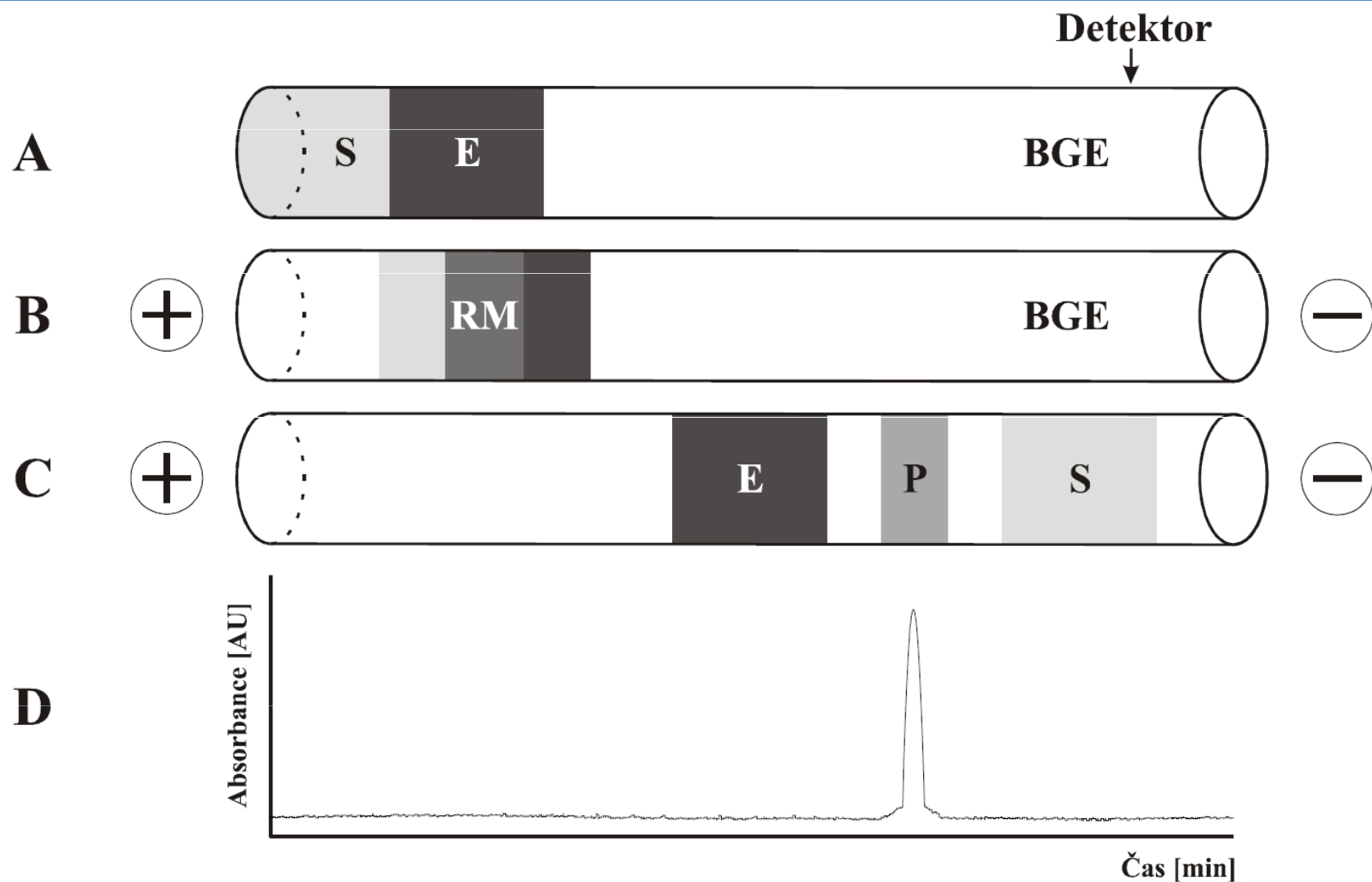
On-line uspořádání CE

1. Elektroforetický zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA, Electrophoretically Mediated MicroAnalysis)
 - a. Kontinuální mód
 - b. Zonální mód
2. Míchání difuzí
 - a. Podélnou (At-Inlet)
 - b. Příčnou (TDLFP, Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles)
3. Imobilizovaný Enzymový reaktor (IMER, IMmobilized Enzyme Reactor)

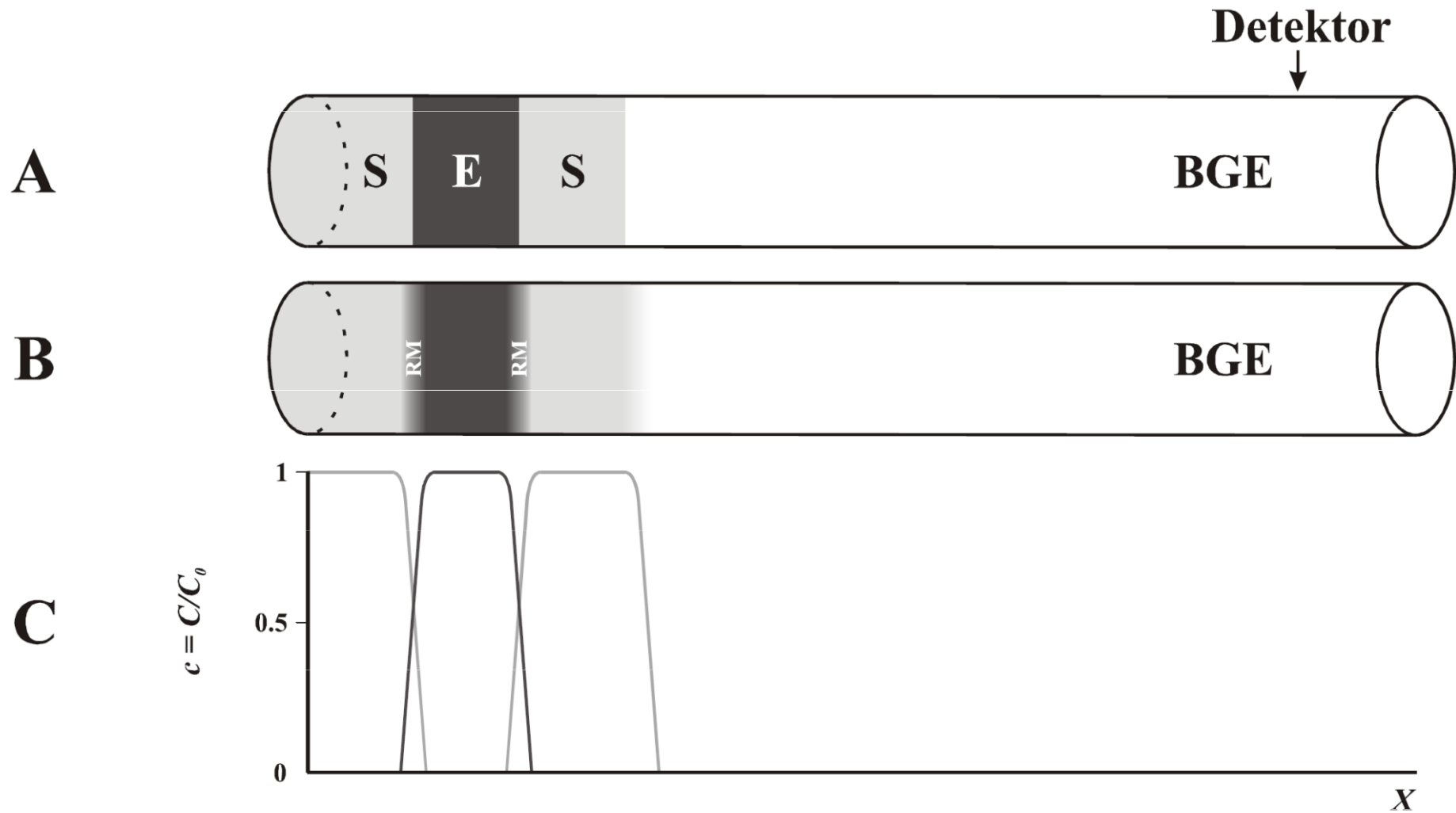
1a. EMMA, kontinuální mód



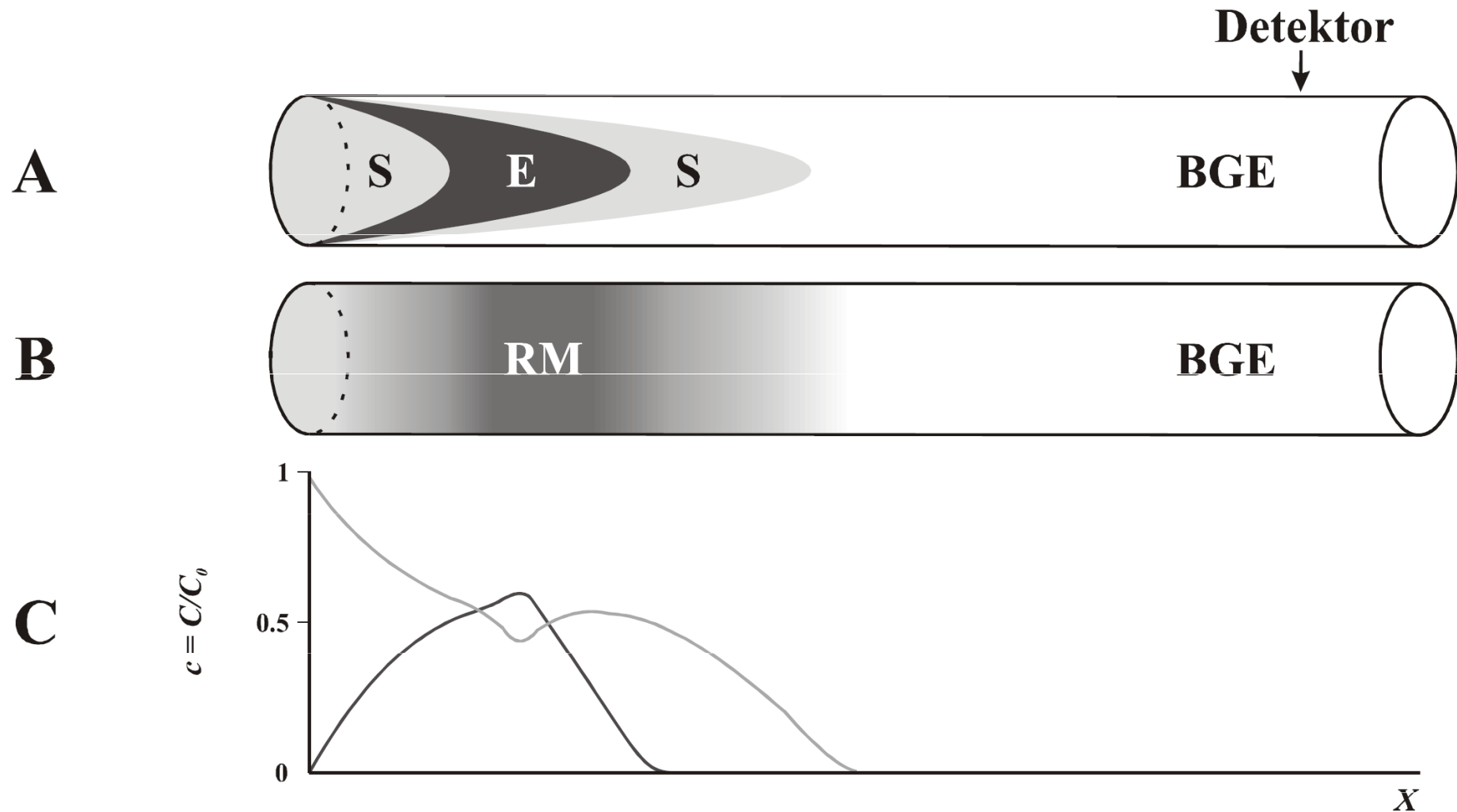
1b. EMMA, zonální mód



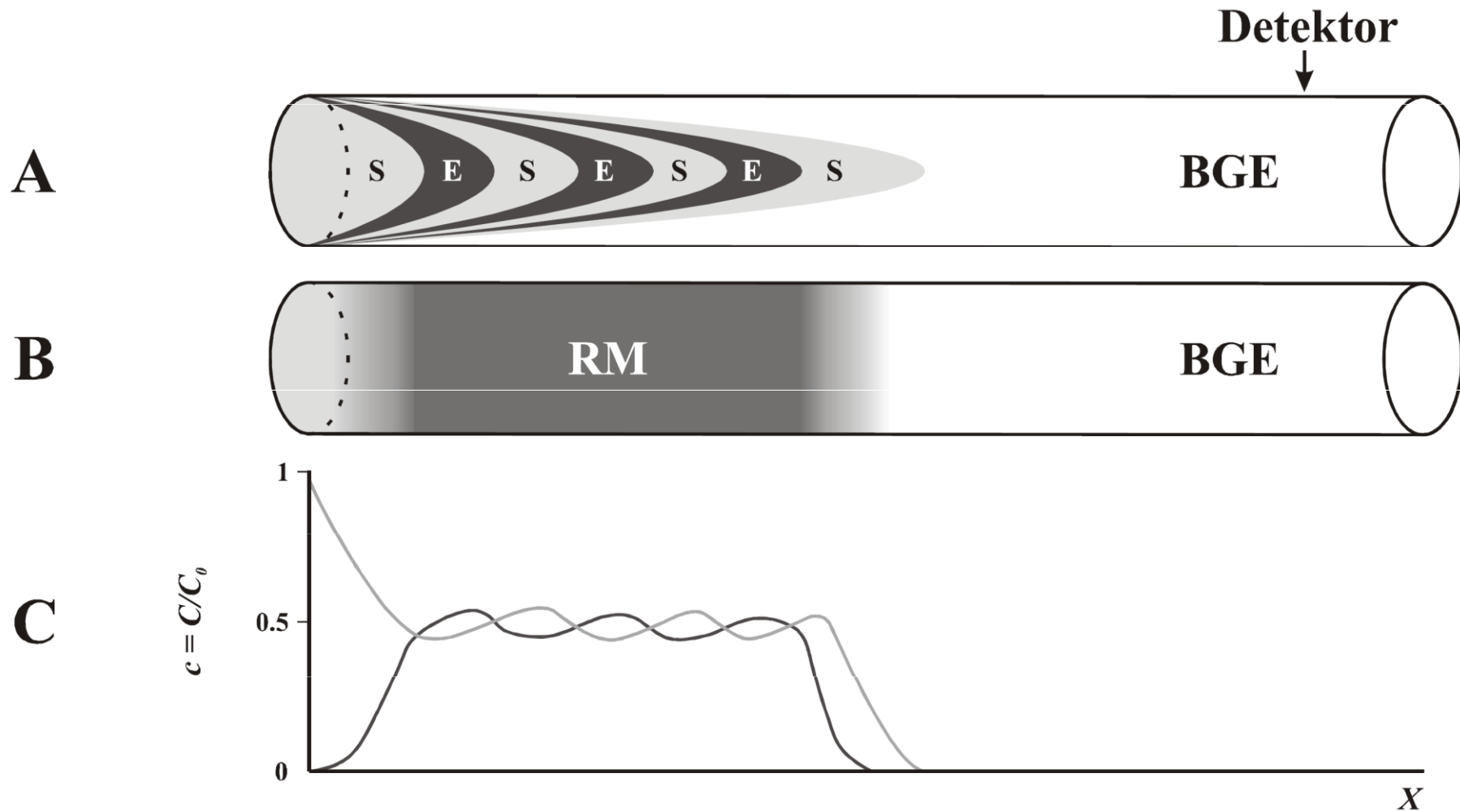
2a. At-Inlet metody



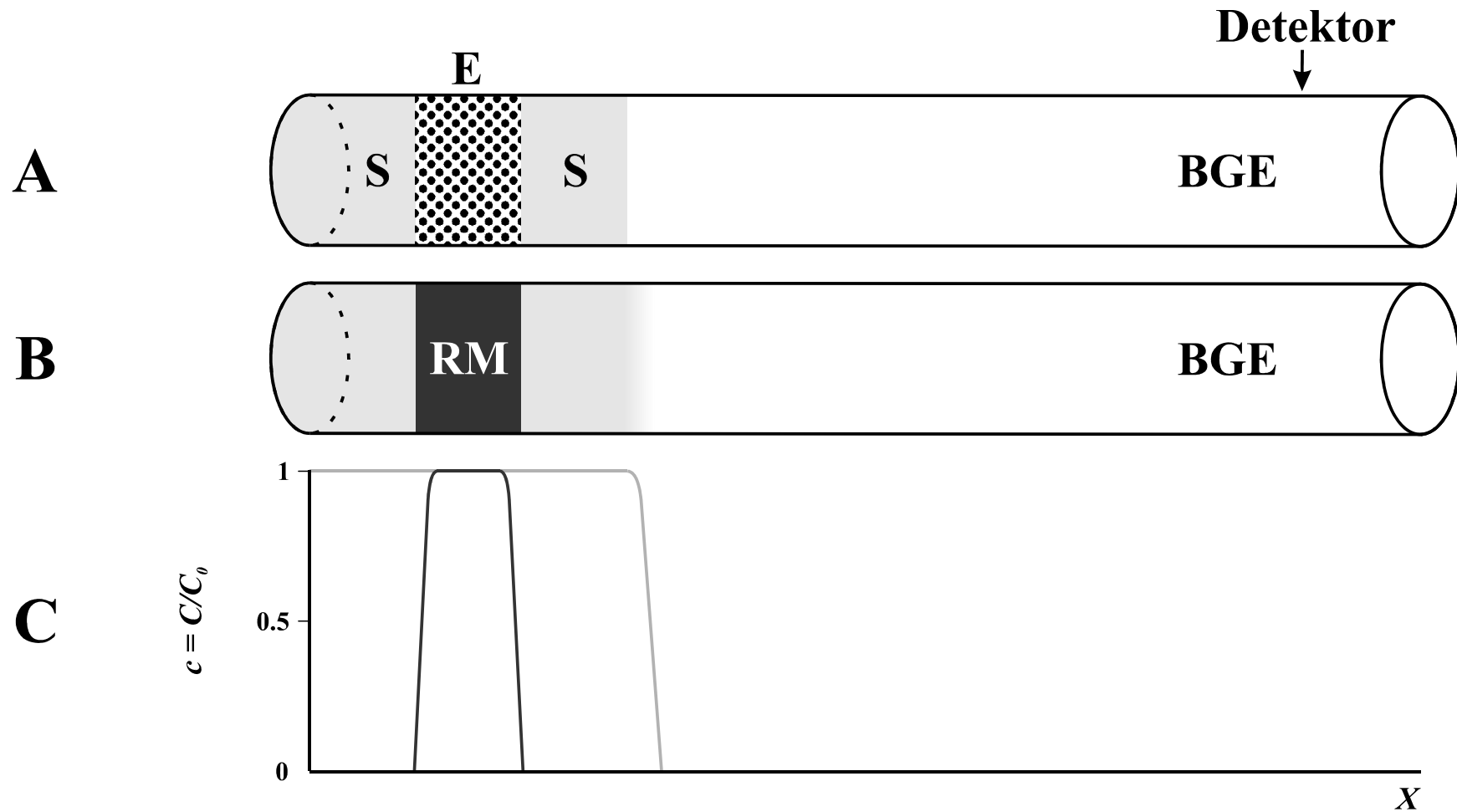
2b. TDLFP



2b. TDLFP



3. IMER



Příklad studie v uspořádání EMMA

- Dextrometorfan - antitusikum
 - aktivní látka ve volně prodejných přípravcích

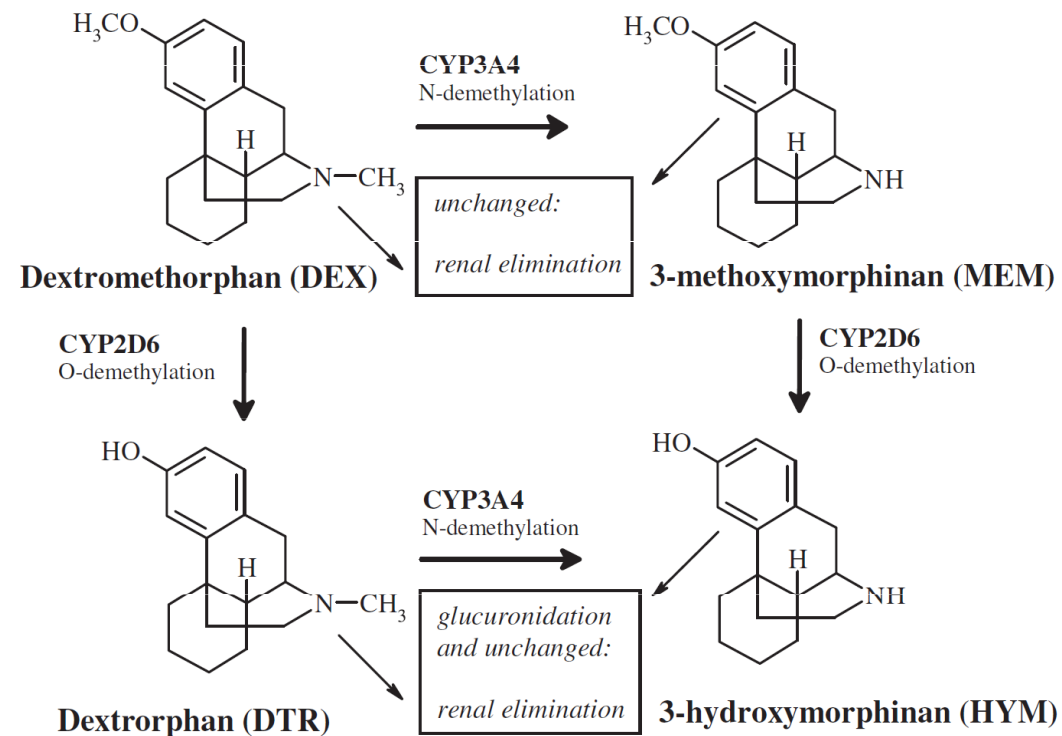
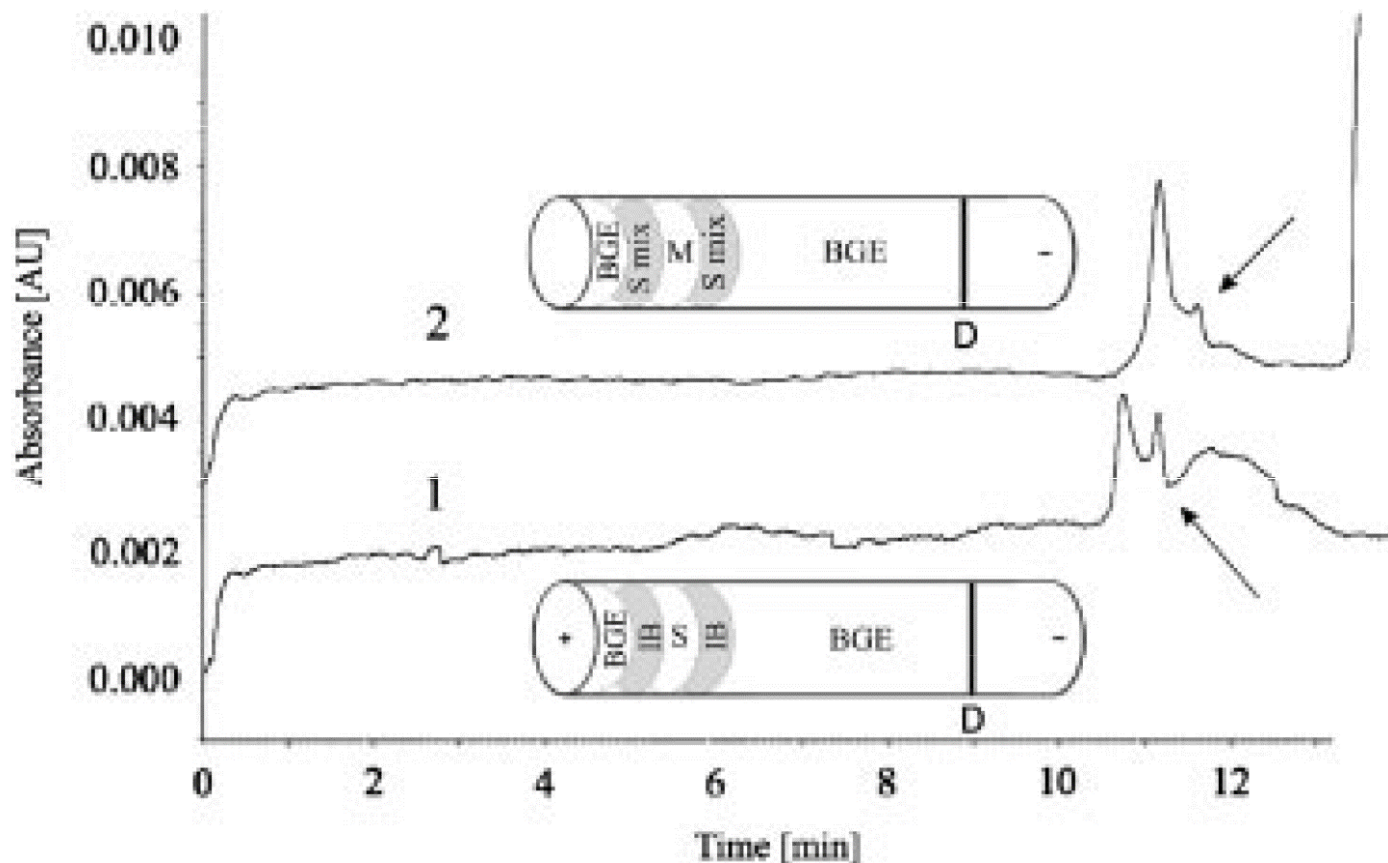


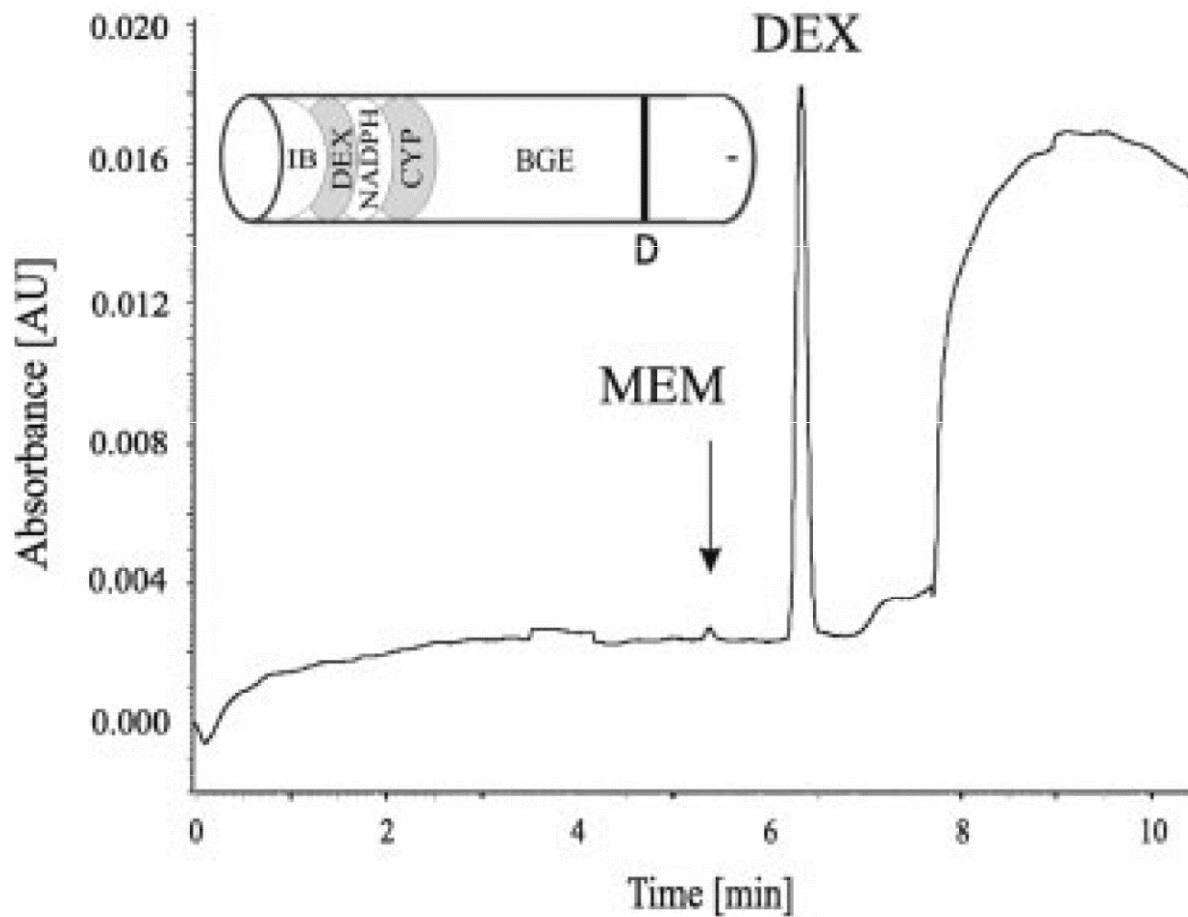
Figure 1. Dextromethorphan metabolism pathway.

Příklad studie v uspořádání EMMA



1 - EMMA, 2 - At-inlet, produkt reakce: Dextrorfan

Příklad studie v uspořádání EMMA



Příklad studie v uspořádání TDLFP

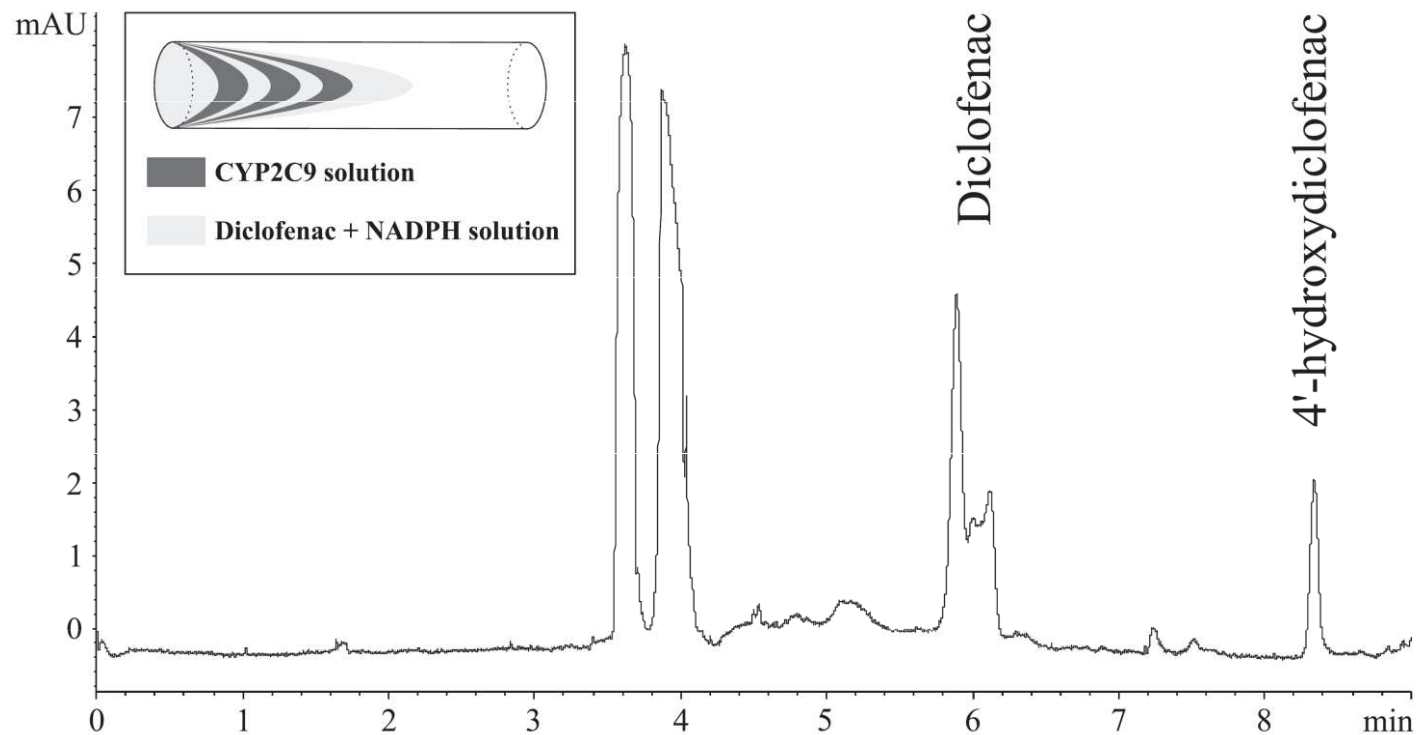


Figure 2. Typical electropherogram obtained after in-capillary reaction. Enzymatic reaction conditions: 33.3 nM CYP2C9, 12.5 μ M diclofenac, 3 mM NADPH; 15 min incubation in capillary thermostated to 37°C. Separation conditions: 75 μ m fused silica capillary (64.5 cm total length, 56.0 cm effective length); temperature of capillary 37°C; 20 mM phosphate, 20 mM tetraborate buffer (pH 8.6) as BGE; separation voltage 23 kV (positive polarity); detection at 200 nm with bandwidth 4 nm, response time 0.12 s, and sampling rate 40 Hz; inserted picture schematically illustrates the plugs of reactants introduced into capillary within developed injection procedure. The diffusion was omitted in order to show the parabolic interfaces between the consecutive plugs.

Příklad studie v uspořádání TDLFP

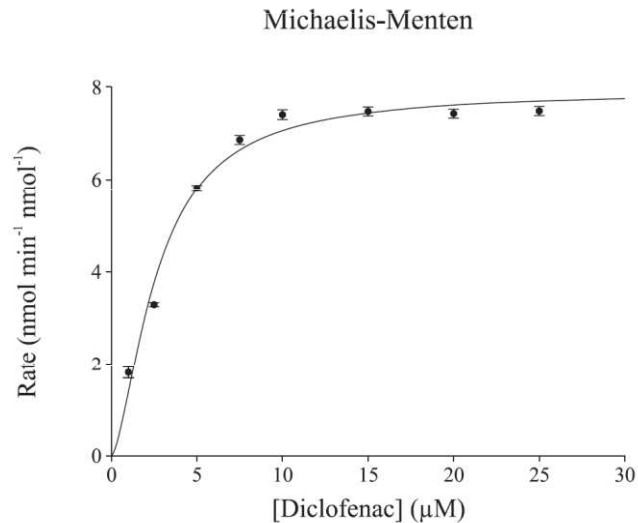


Figure 3. Michaelis–Menten plot of reaction of CYP2C9 with diclofenac.

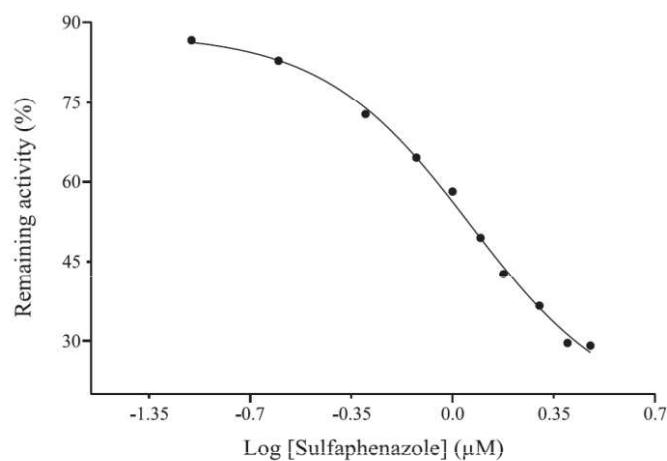


Figure 4. Plot of remaining CYP2C9 activity versus sulfaphenazole concentration.

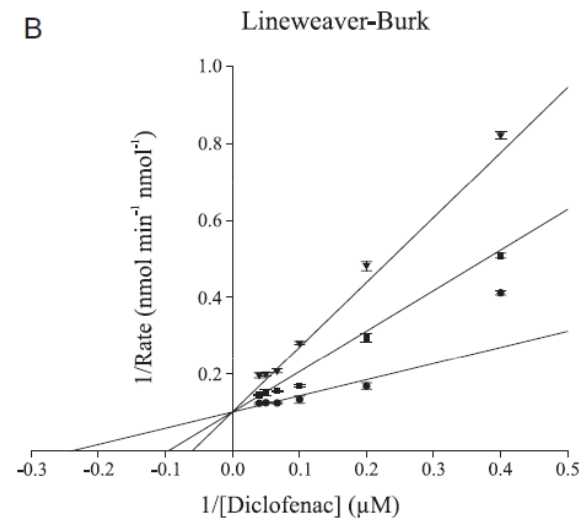
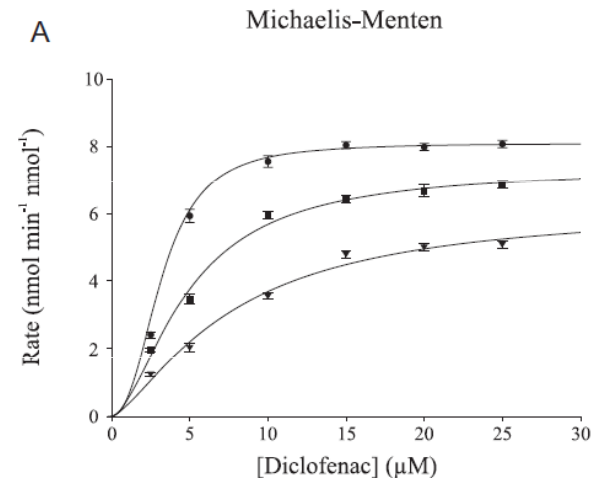


Figure 5. Michaelis–Menten (A) and corresponding Lineweaver–Burk (B) plots for CYP2C9 reaction inhibited by: (●) 0 μM; (■) 0.6 μM; (▼) 1.2 μM sulfaphenazole.

Příklad studie v uspořádání TDLFP

$$K'_m = 2,66 \pm 0,18 \mu\text{M}$$

$$V'_{\text{max}} = 7,91 \pm 0,22 \text{ nmol min}^{-1} \text{ nmol}^{-1}$$

$$n = 1,59 \pm 0,16$$

$$\text{IC}_{50} = 0,94 \pm 0,04 \mu\text{M}$$

$$K'_i = 0,39 \pm 0,07 \mu\text{M}$$

Table 1. Validation parameters of developed on-line method

	4'-Hydroxydiclofenac
Migration time repeatability (RSD, $n = 6$)	0.91%
Peak area repeatability (RSD, $n = 6$)	1.39%
Linearity	0.75–100 μM
Correlation coefficient	0.999
Recovery ($n = 6$)	95.83–100.70%
LOD (S/N > 3)	0.25 μM
LOQ (S/N > 10)	0.75 μM

Enantioselektivní separace

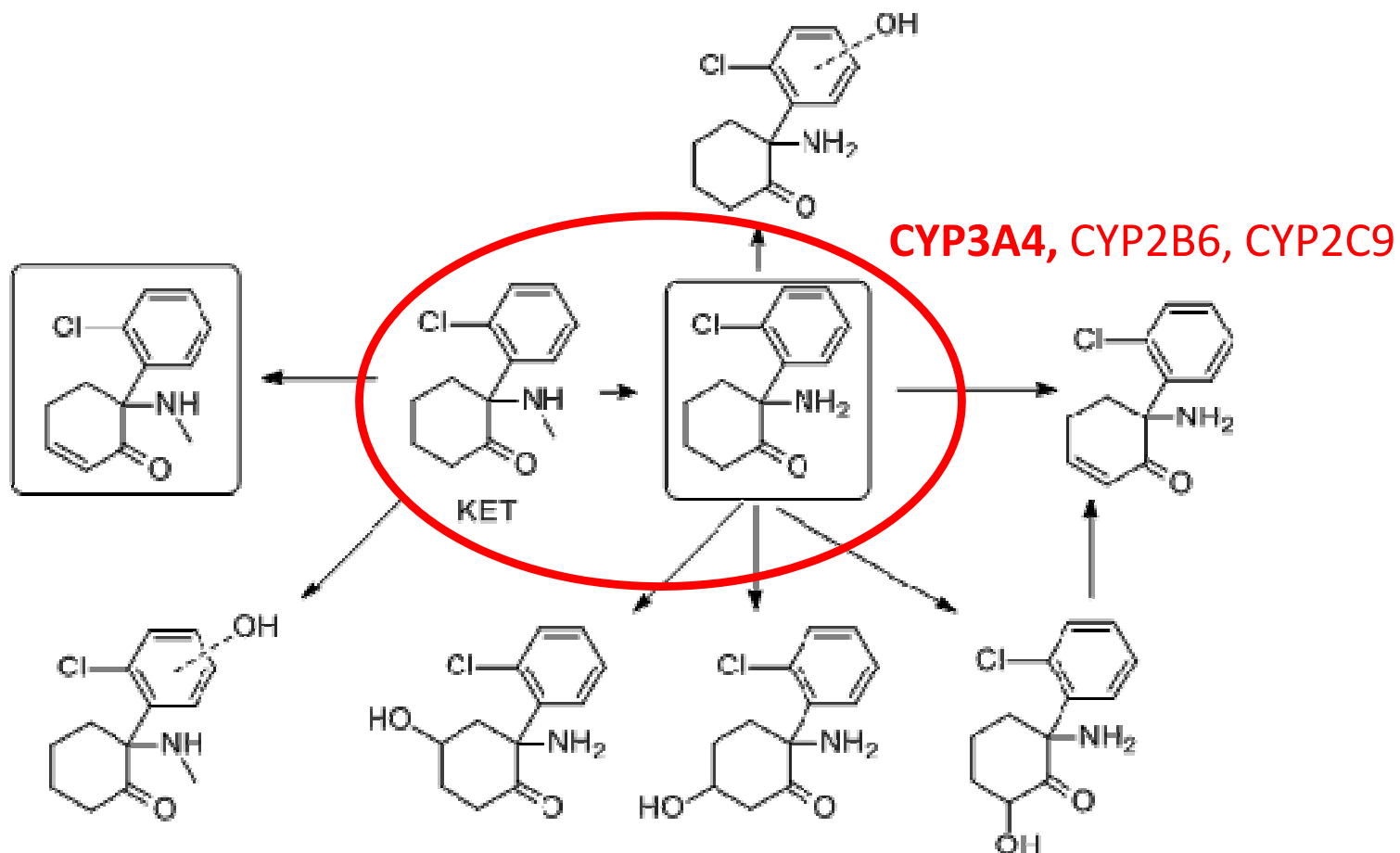
~ 60 % léčiv na trhu jsou chirální sloučeniny

! Jednotlivé enantiomery aktivní látky mohou mít značně rozdílné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, jako např. *S* a *R* thalidomid.

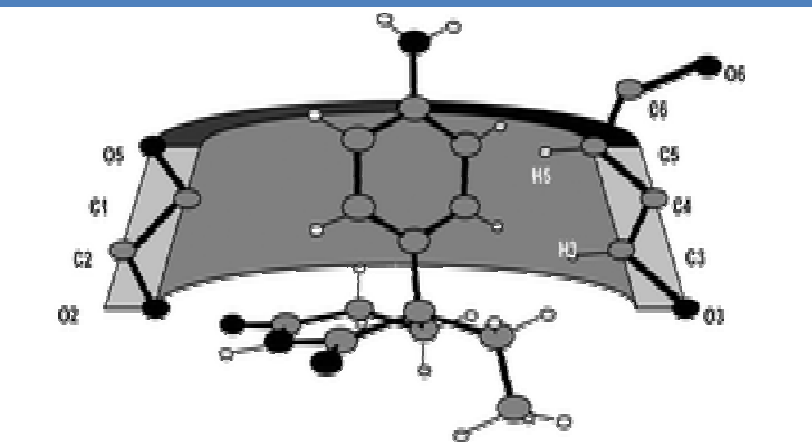
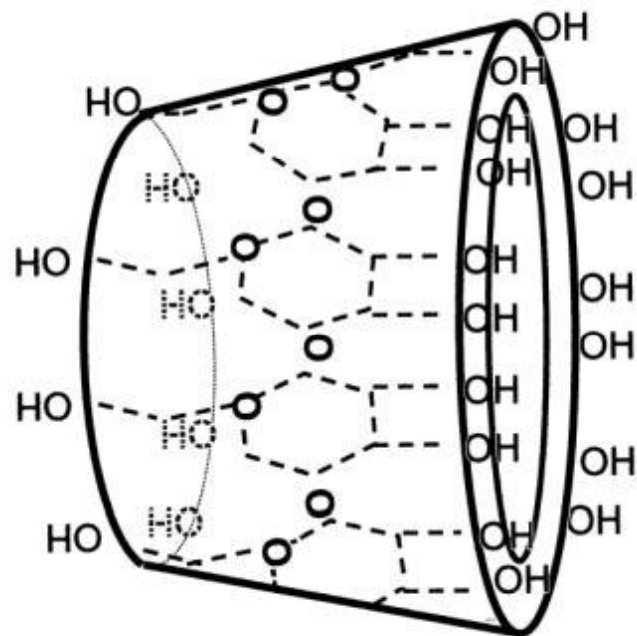


Enantioselektivní separace

- Ketamin - léčivo s anestetickým a analgetickým účinkem používané v zdravotnické a veterinární praxi

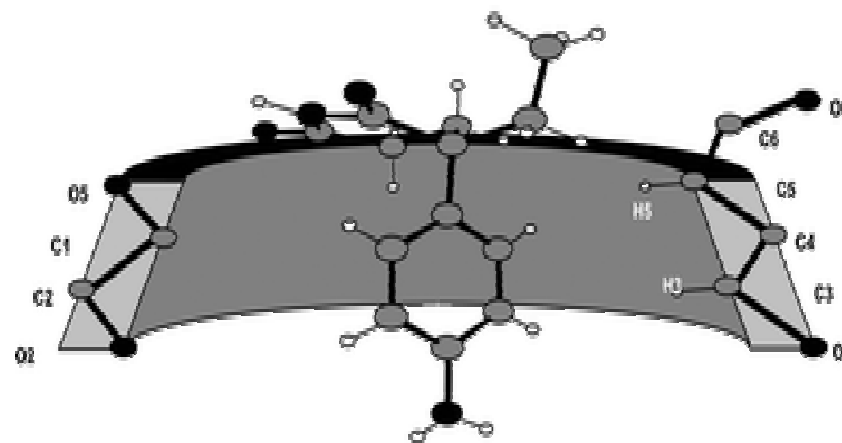


Enantioselectivní separace



a)

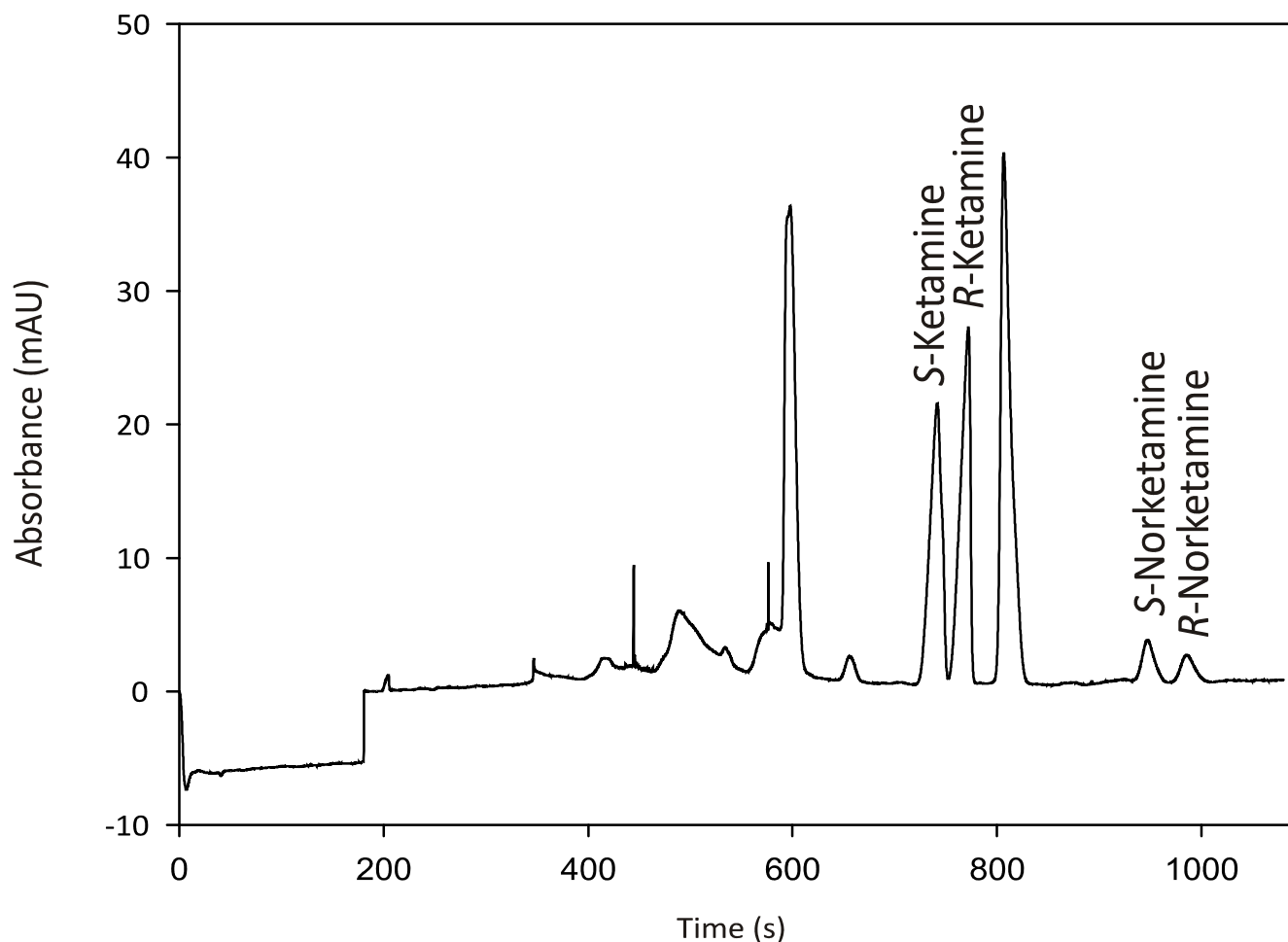
β -Cyclodextrin



b)

γ -Cyclodextrin

Enantioselectivní separace

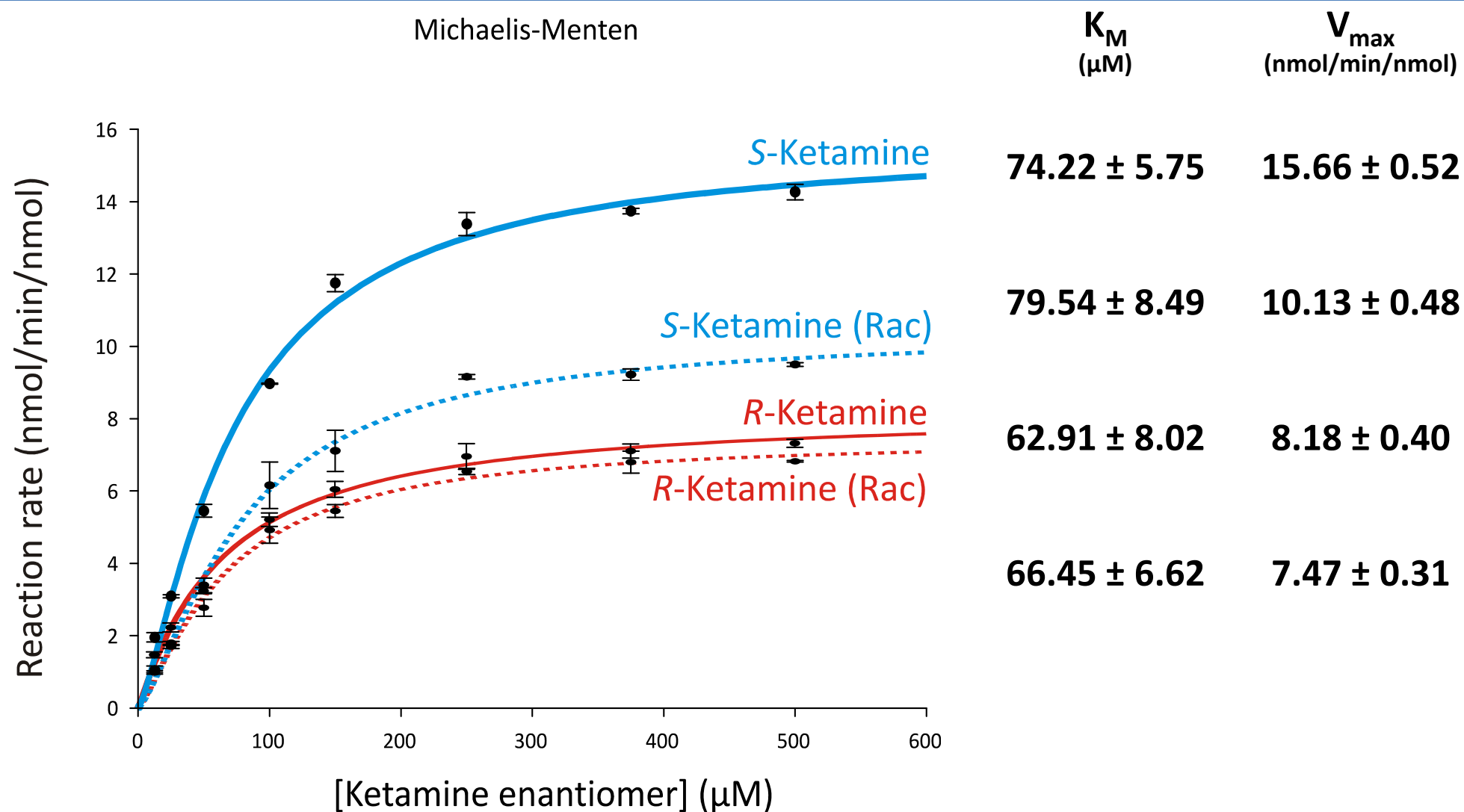


Podmínky inkubace: 200 nM CYP3A4, 400 μ M ketamin (rac), 2 mM NADPH; 10 min
v kapiláře termostatované na 37 °C

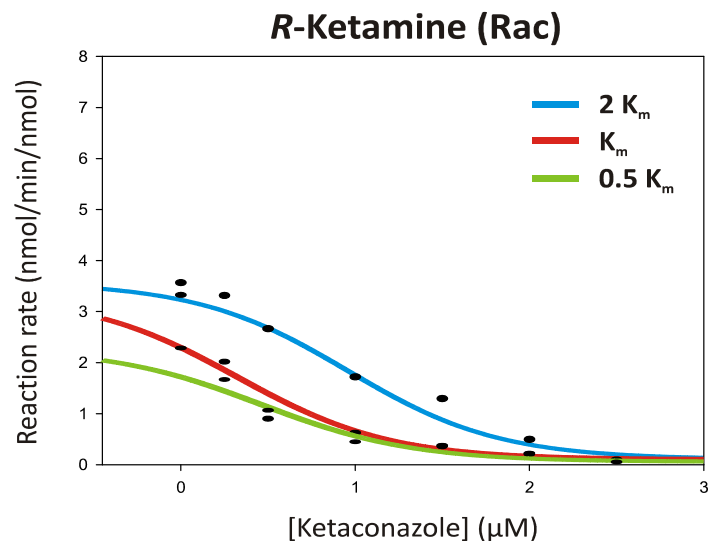
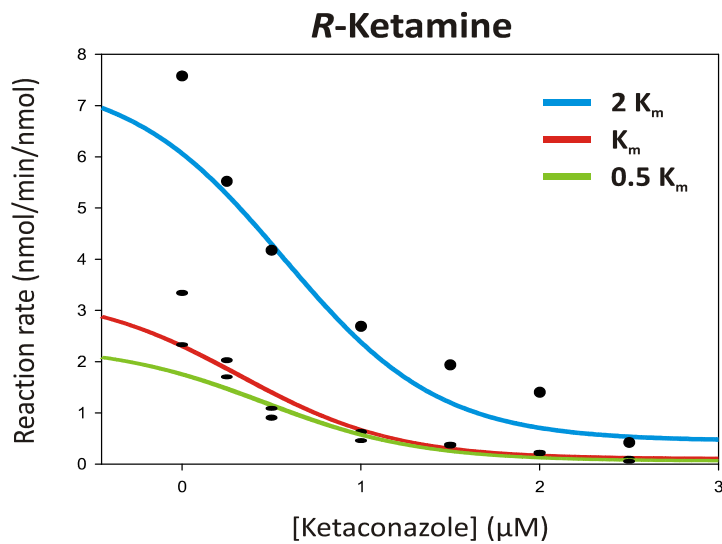
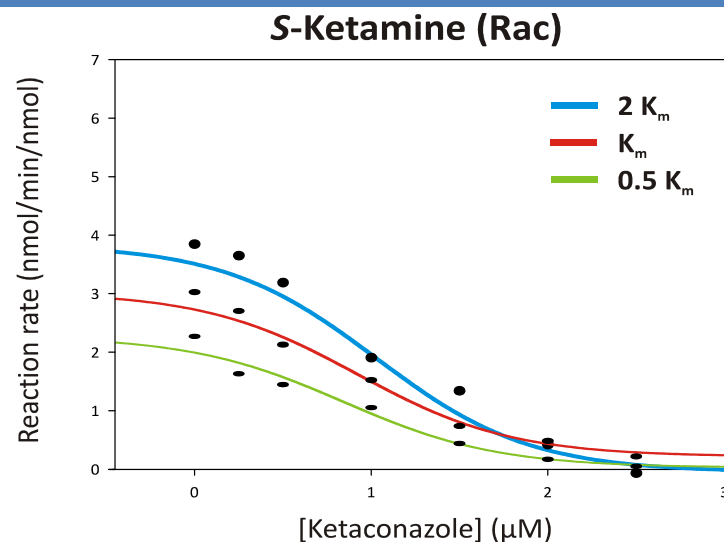
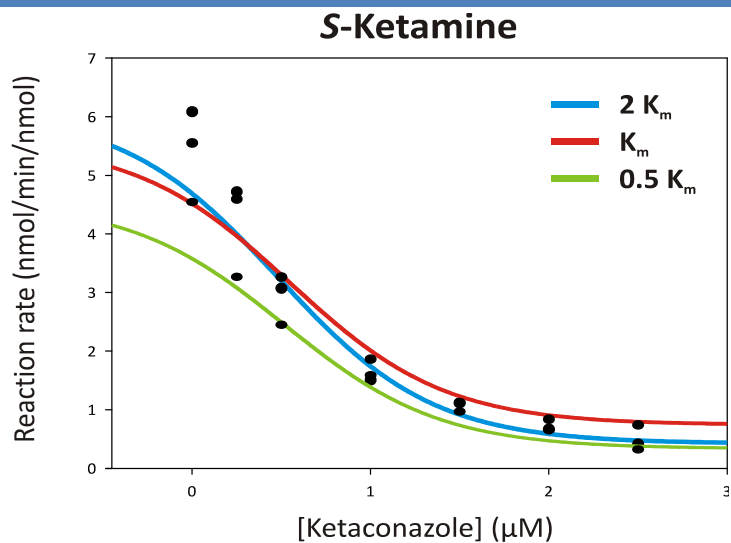
Enantioselektivní separace

	S-Norketamine	R-Norketamine
RSD of t_M intraday (n = 6), 40 μ M Ket	1,21 %	1,31 %
intraday (n = 6), 400 μ M Ket	1,15 %	1,22 %
interday (n = 6 x 6), 40 μ M Ket	3,36 %	3,20 %
interday (n = 6 x 6), 400 μ M Ket	4,61 %	4,83 %
RSD of A_r intraday (n = 6), 40 μ M Ket	3,68 %	4,57 %
intraday (n = 6), 400 μ M Ket	2,96 %	2,03 %
interday (n = 6 x 6), 40 μ M Ket	6,76 %	8,09 %
interday (n = 6 x 6), 400 μ M Ket	7,47 %	6,37 %
Linearity	2.5 – 200 μM	
Mean of calibration curves R^2 (n = 6)	0.995	0.995
RSD of calibration curves slopes (n = 6)	2.03 %	2.03 %
LOD (N/S = 3)	0.8 μM	
LOQ (N/S = 10)	2.5 μM	
Control sample, mean / RSD (n = 6 x 6, 15 μ M)	15.45 μM / 5.06 %	15.89 μM / 5.45 %
(n = 6 x 6, 100 μ M)	96.33 μM / 6.14 %	98.46 μM / 6.01 %
Recovery	96.05 – 102.60 %	93.22 – 102.83 %

Enantioselectivní separace



Enantioselectivní separace

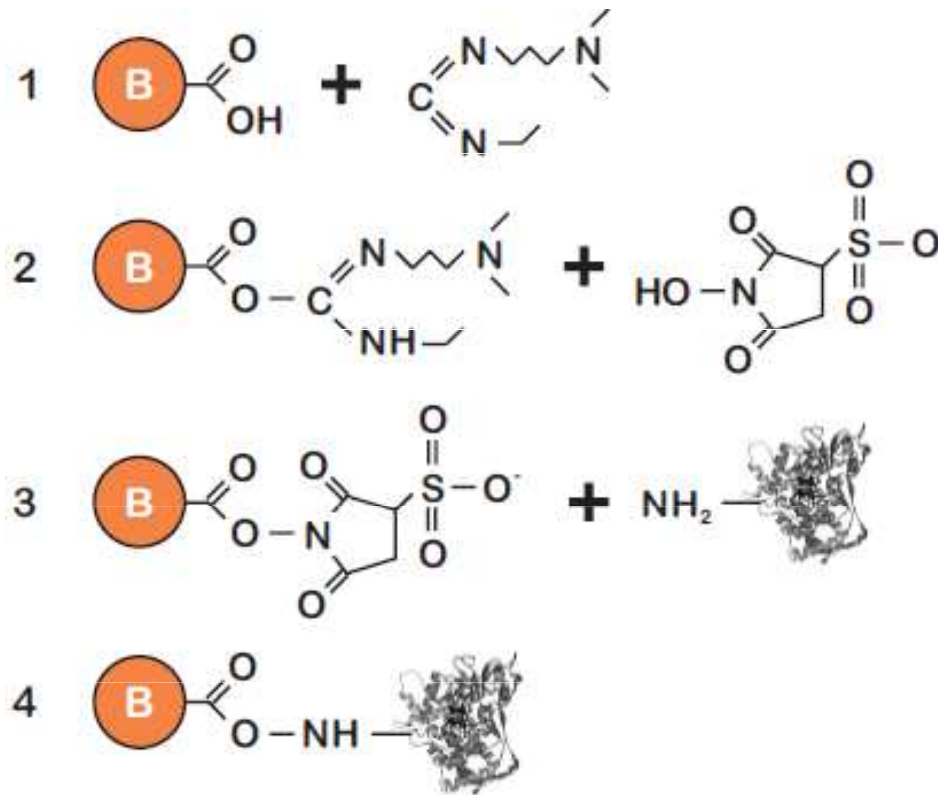


Enantioselectivní separace

Substrate	Ketoconazole	
	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
<i>S</i> -Ketamine (Rac)	0.93 ± 0.10	0.45 ± 0.11
<i>R</i> -Ketamine (Rac)	0.93 ± 0.11	0.46 ± 0.09
<i>S</i> -Ketamine	0.52 ± 0.15	0.26 ± 0.14
<i>R</i> -Ketamine	0.45 ± 0.17	0.22 ± 0.18

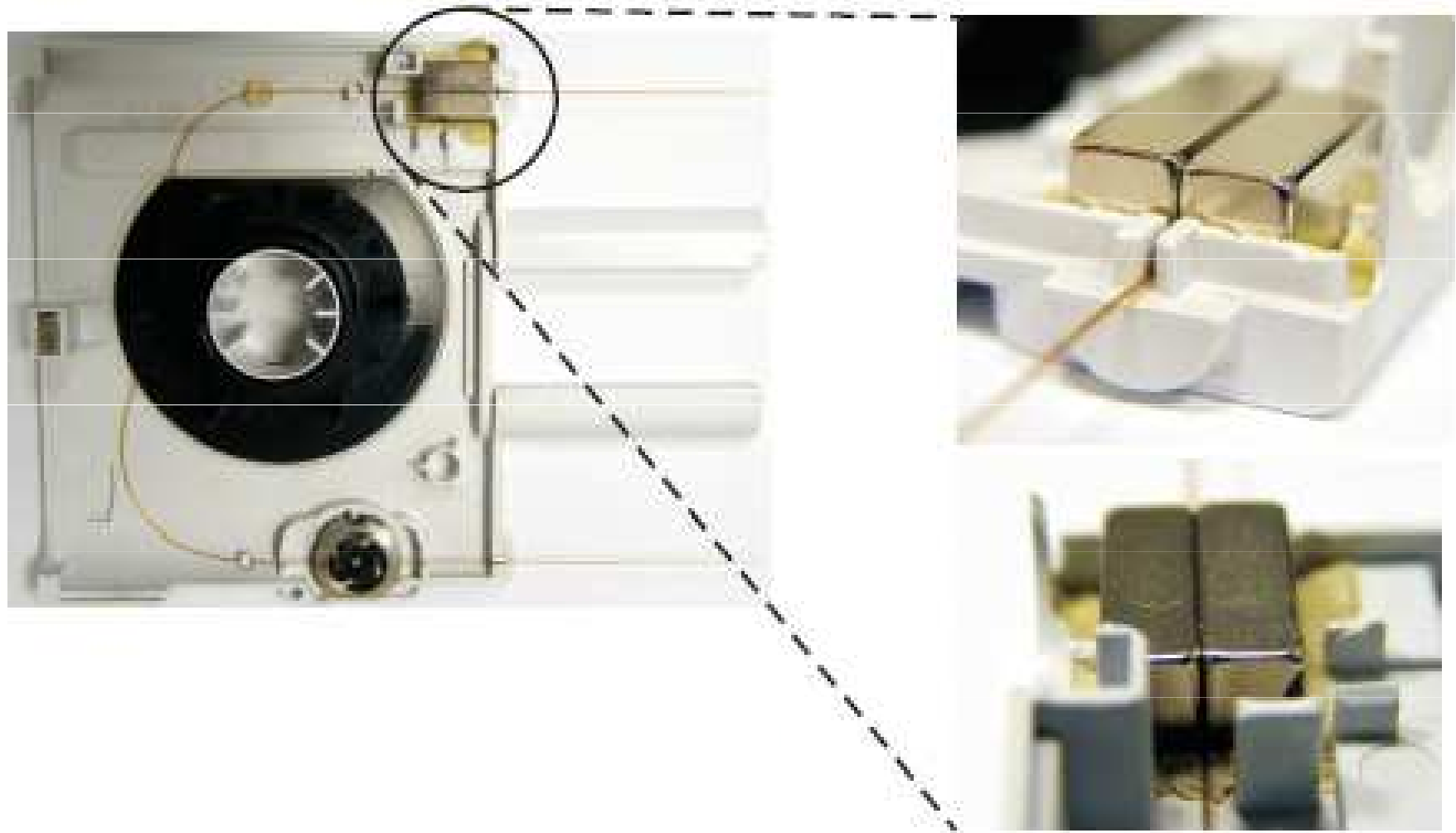
Příklad studie v uspořádání IMER

- reaktor s vázaným CYP2C9

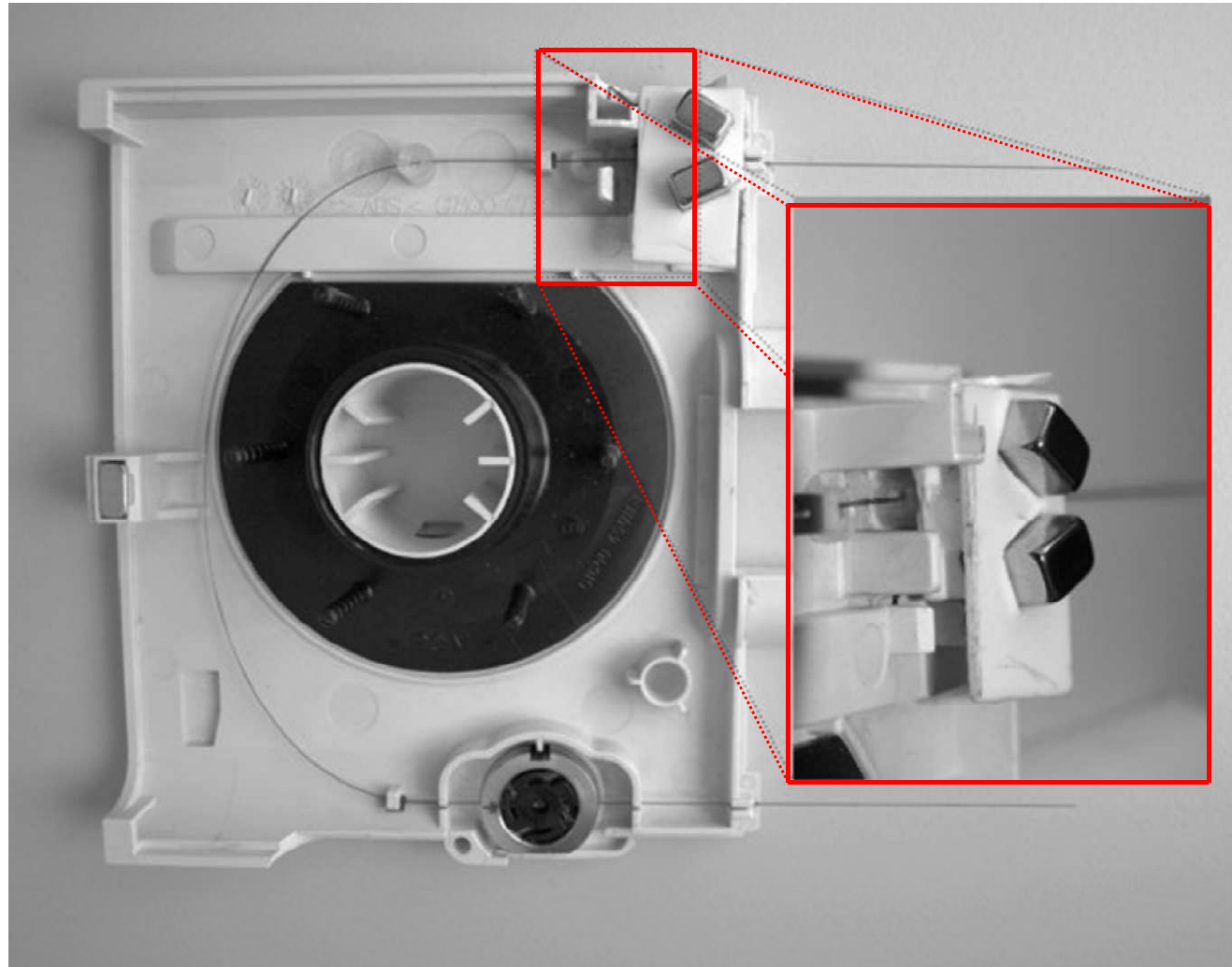


B mikročástice SiMAG-karboxyl ($\emptyset = 1 \mu\text{m}$), činidla: 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimid (EDAC), N-hydroxysukcinimid (NHS)

Příklad studie v uspořádání IMER



Příklad studie v uspořádání IMER



Příklad studie v uspořádání IMER

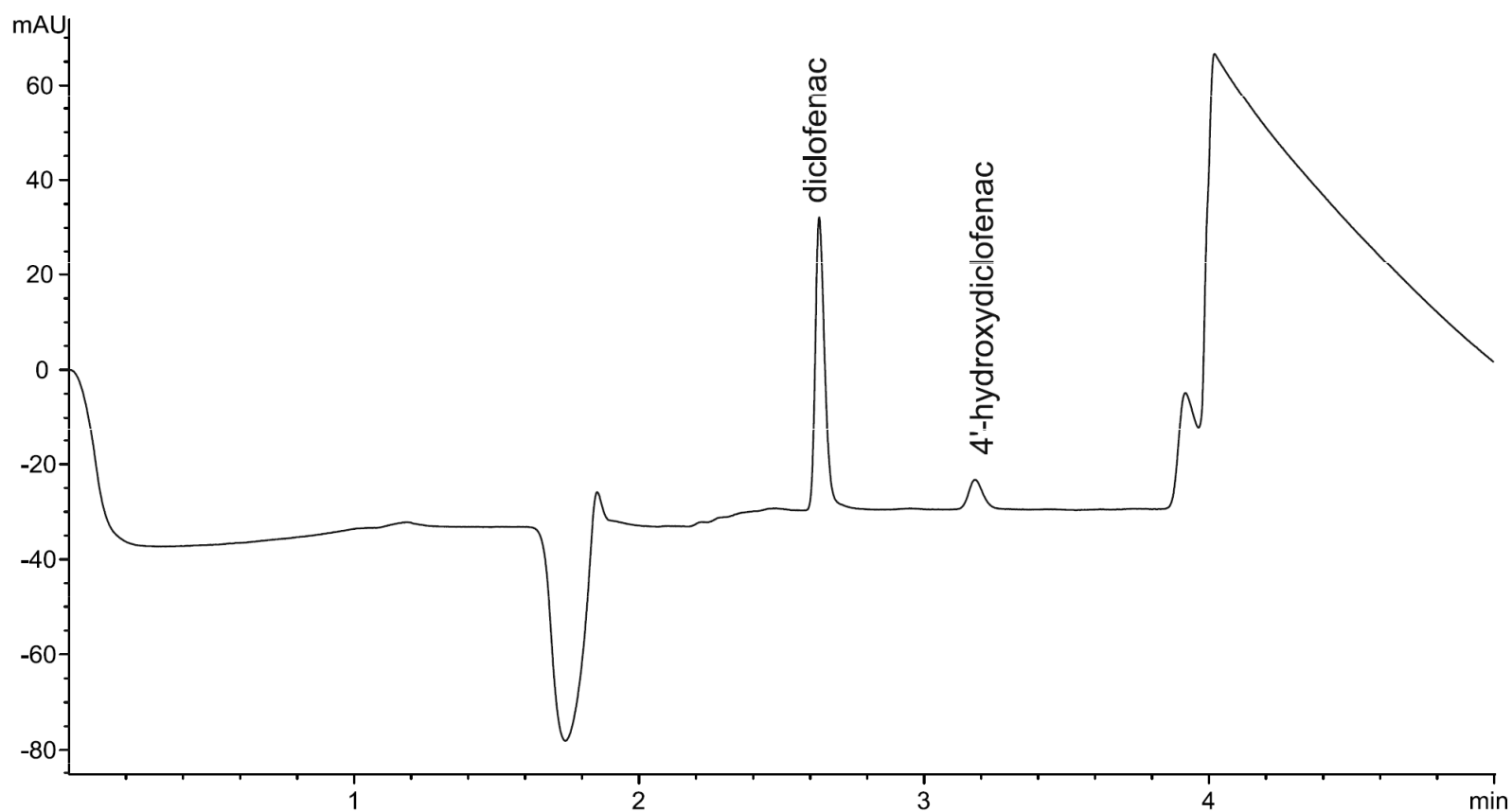


Fig. 3. Typical electropherogram obtained after in-capillary reaction. Enzymatic reaction conditions: 36.8 μM diclofenac, 613 μM NADPH – effective concentrations in IMER (60 μM diclofenac and 1 mM NADPH injected); 15 min incubation in capillary thermostated to 30 °C. Separation conditions: 75 μm fused silica capillary (33.5 cm total length, 25 cm effective length); 50 mM TRIS, 80 mM boric acid buffer as BGE; separation voltage 15 kV (positive polarity) with a linear voltage gradient from 0 kV to 15 kV during the first minute; detection at 200 nm with bandwidth 4 nm, response time 0.12 s, and sampling rate 40 Hz.

Příklad studie v uspořádání IMER

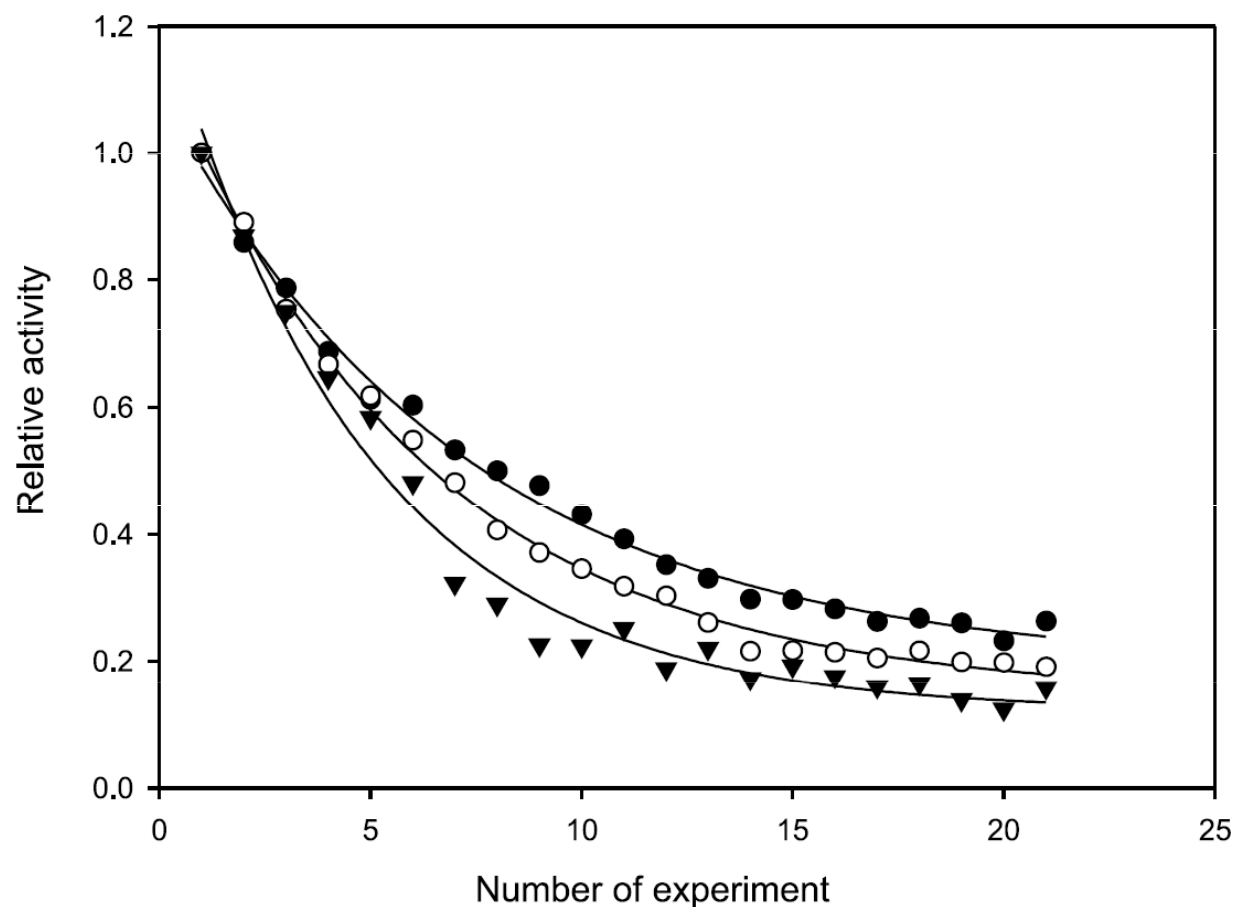


Fig. 4. Observed loss of enzyme activity for three individual IMERs created using magnets in repulsive arrangement fitted with exponential decay models ($R^2 > 0.98$ for each model). Each symbol denotes a single analysis.

Příklad studie v uspořádání IMER

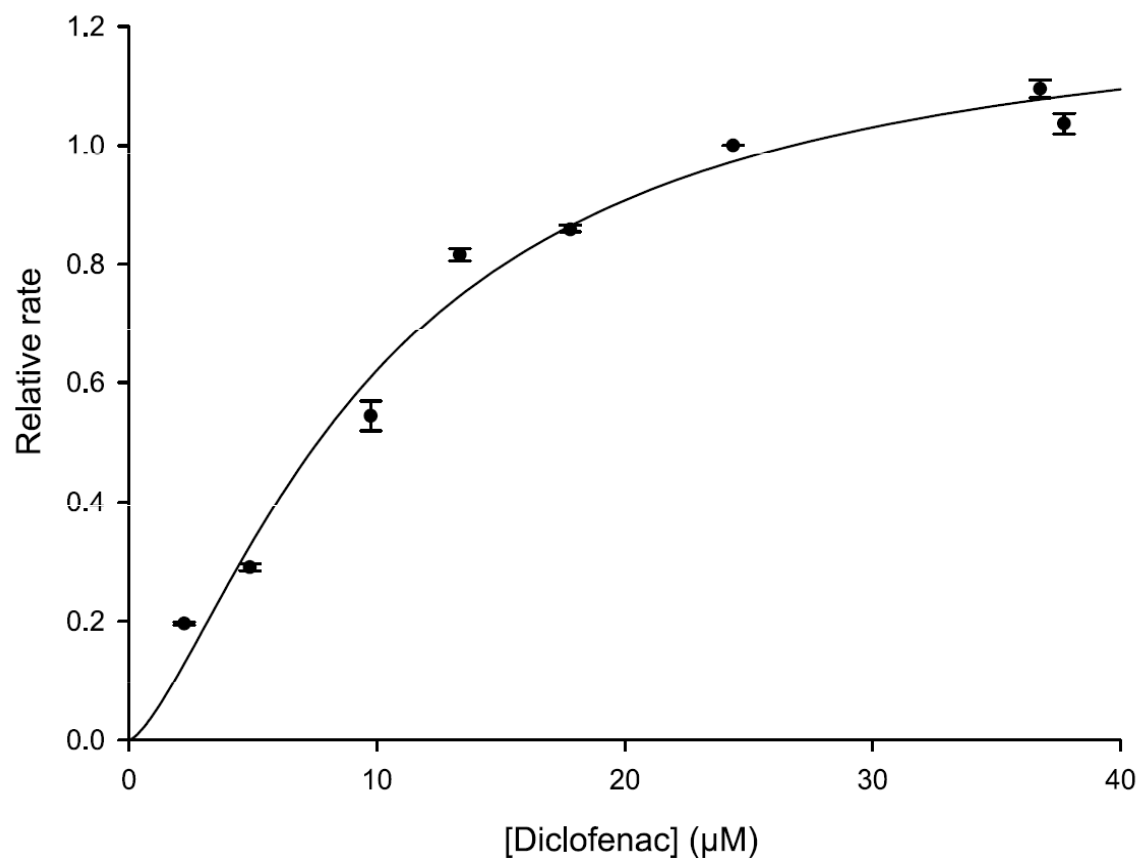


Fig. 5. Michaelis–Menten plot of reaction of CYP2C9 with diclofenac. Symbols denote means of triplicates. Line graphs are predicted based on nonlinear regression analysis using the Hill equation. The normalized initial relative reaction rates are plotted against calculated effective concentrations of the substrate inside the IMER.

Příklad studie v uspořádání IMER

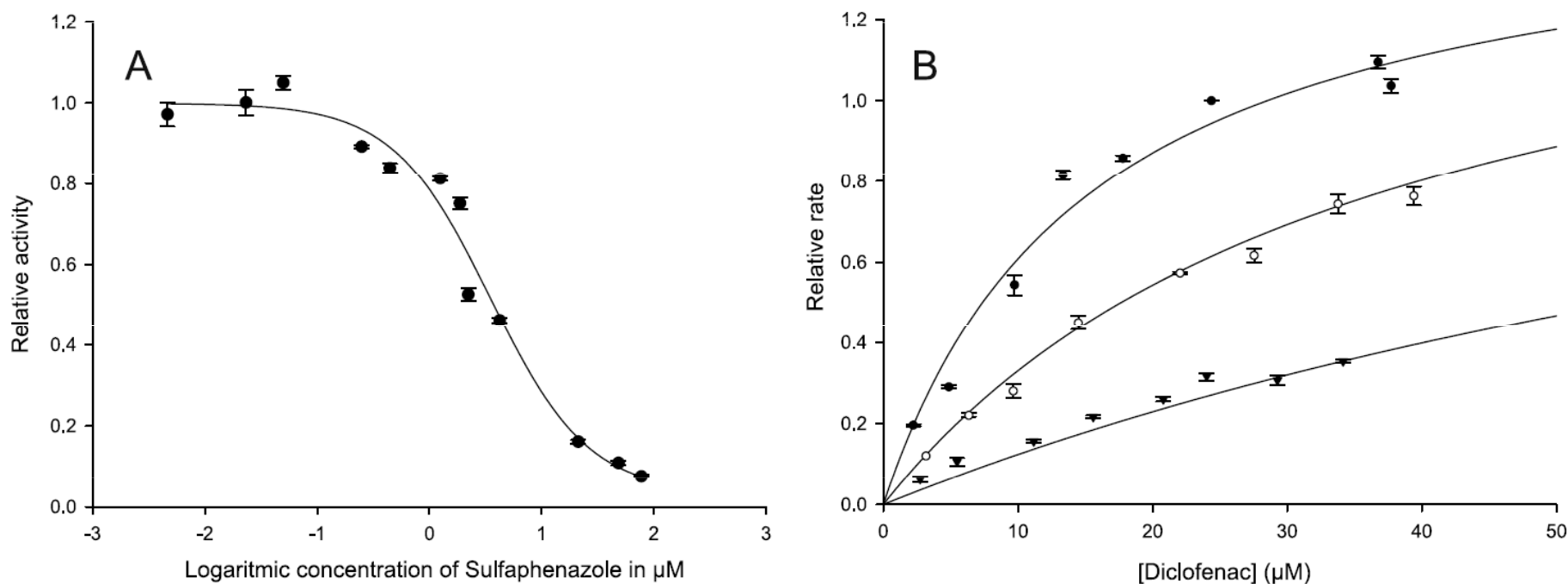


Fig. 6. (A) Normalized initial reaction rates plotted against logarithm of calculated effective sulfaphenazole concentrations with one-site competition model fit for IC_{50} determination. Symbols denote means of triplicates. (B) Michaelis–Menten plots resulting from global fit of normalized initial rates obtained for CYP2C9 inhibited by 0 μM (\bullet), 1.67 μM (\circ) and 7.78 μM (\blacktriangledown) sulfaphenazole at the calculated effective concentrations of the substrate inside the IMER for K_i' determination.

Online CE

1. Elektroforetický zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA, Electrophoretically Mediated MicroAnalysis)

a. ~~Kontinuální mód~~

b. Zonální mód

+ homogenní reakční směs

+ prolnutí zón E a S => žádné ředění

- pracná optimalizace míchání

2. Míchání difuzí

a. ~~Podélnou (At-Inlet)~~

b. Příčnou (TDLFP, Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles)

+ univerzální

- nehomogenní reakční směs

3. Imobilizovaný Enzymový reaktor (IMER, IMmobilized Enzyme Reactor)

+ homogenní reakční směs bez ředění

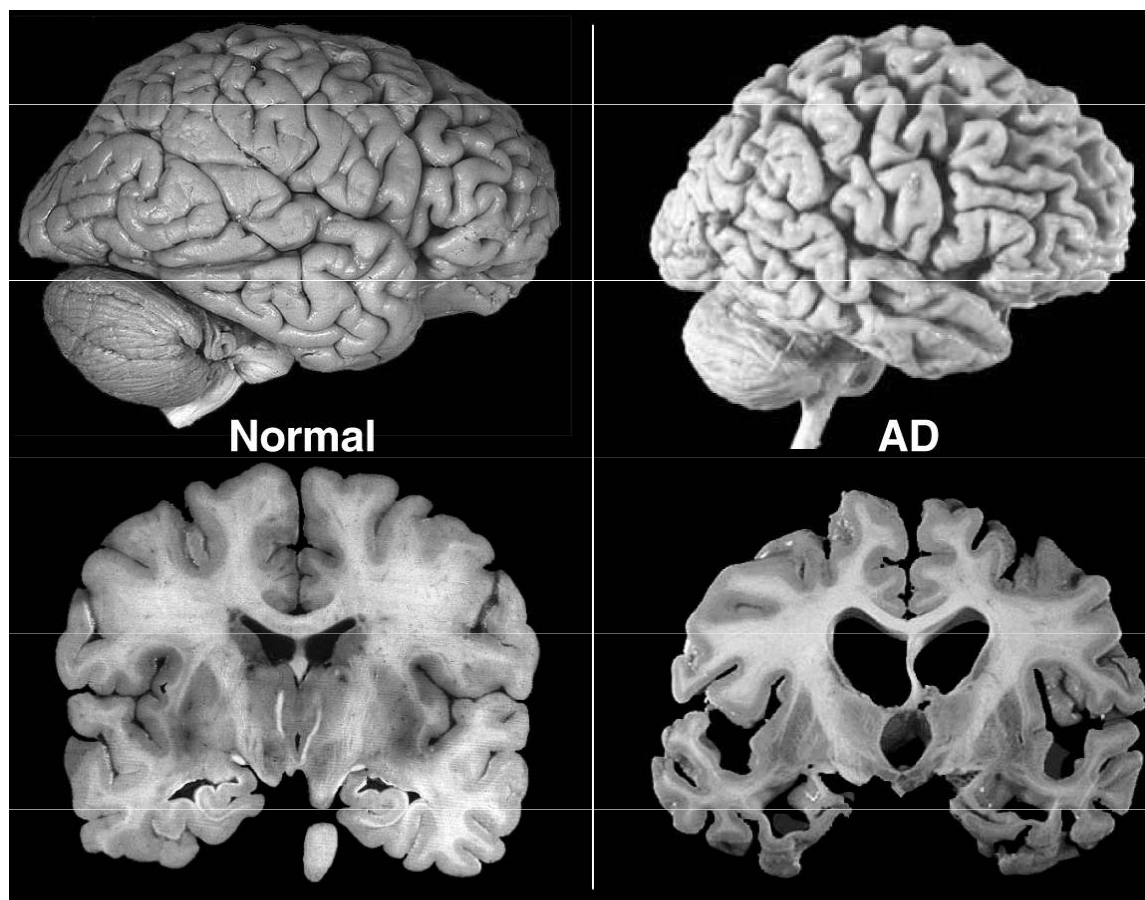
+ univerzální

- stabilita a aktivita enzymu

Alzheimerova choroba

= progresivní, nevratné, neurodegenerativní onemocnění

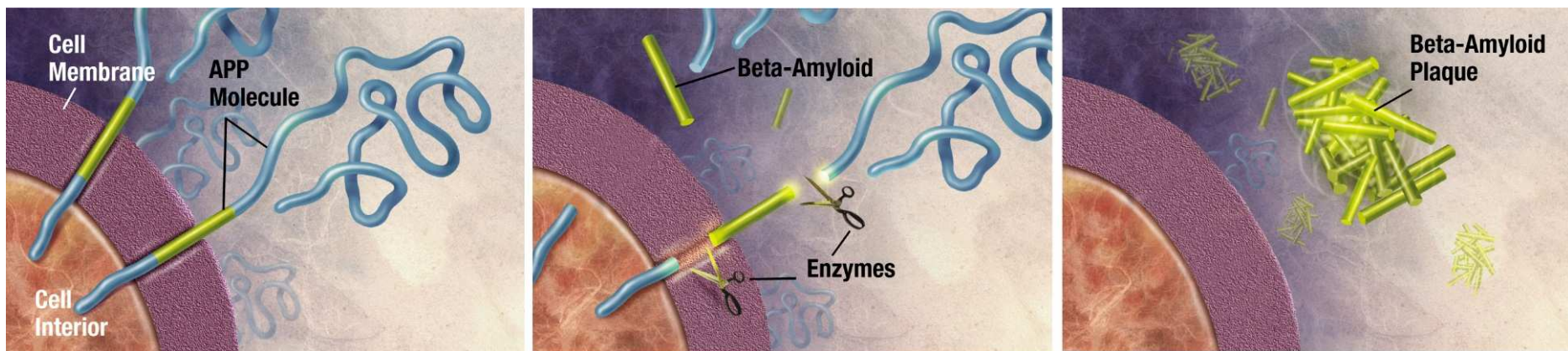
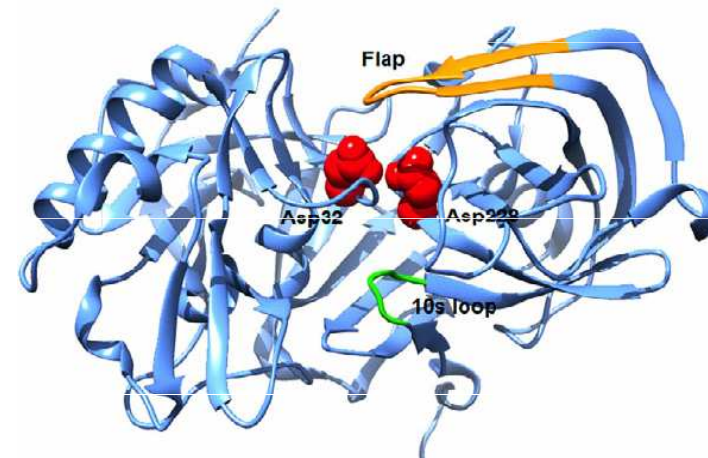
≈ 34 milionů pacientů (2015)



Beta-sekretáza

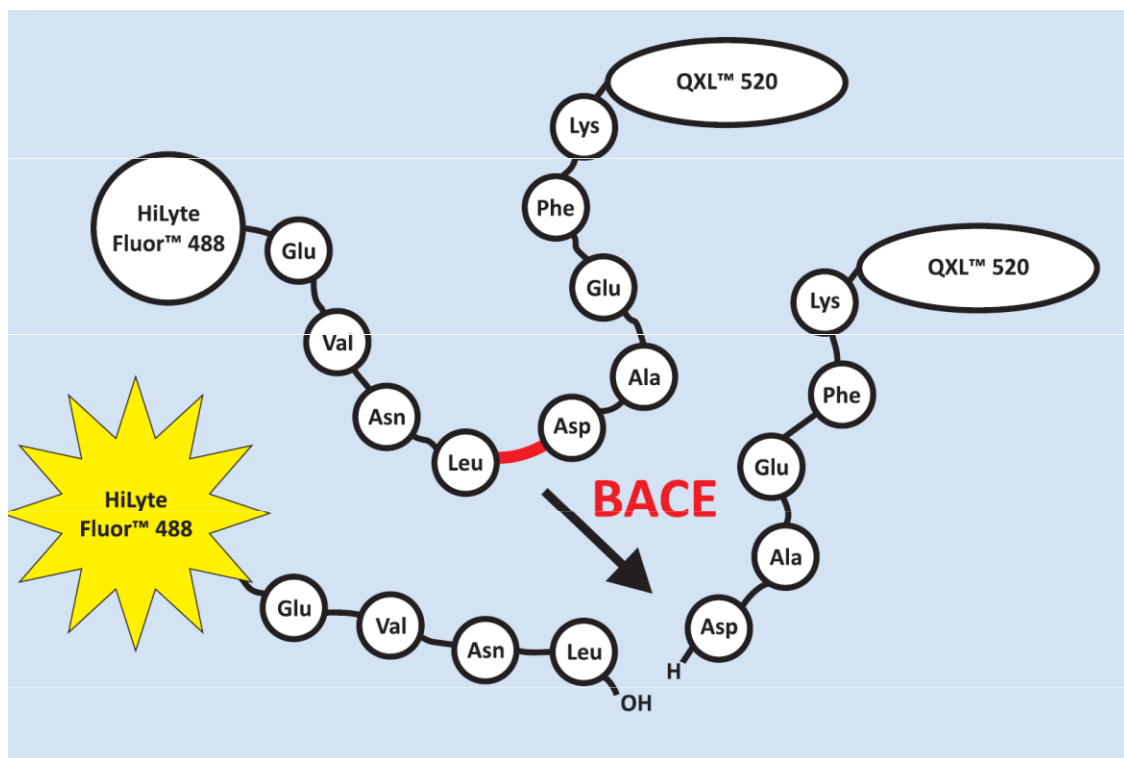
= BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving protein enzyme 1)

= aspartátová proteáza



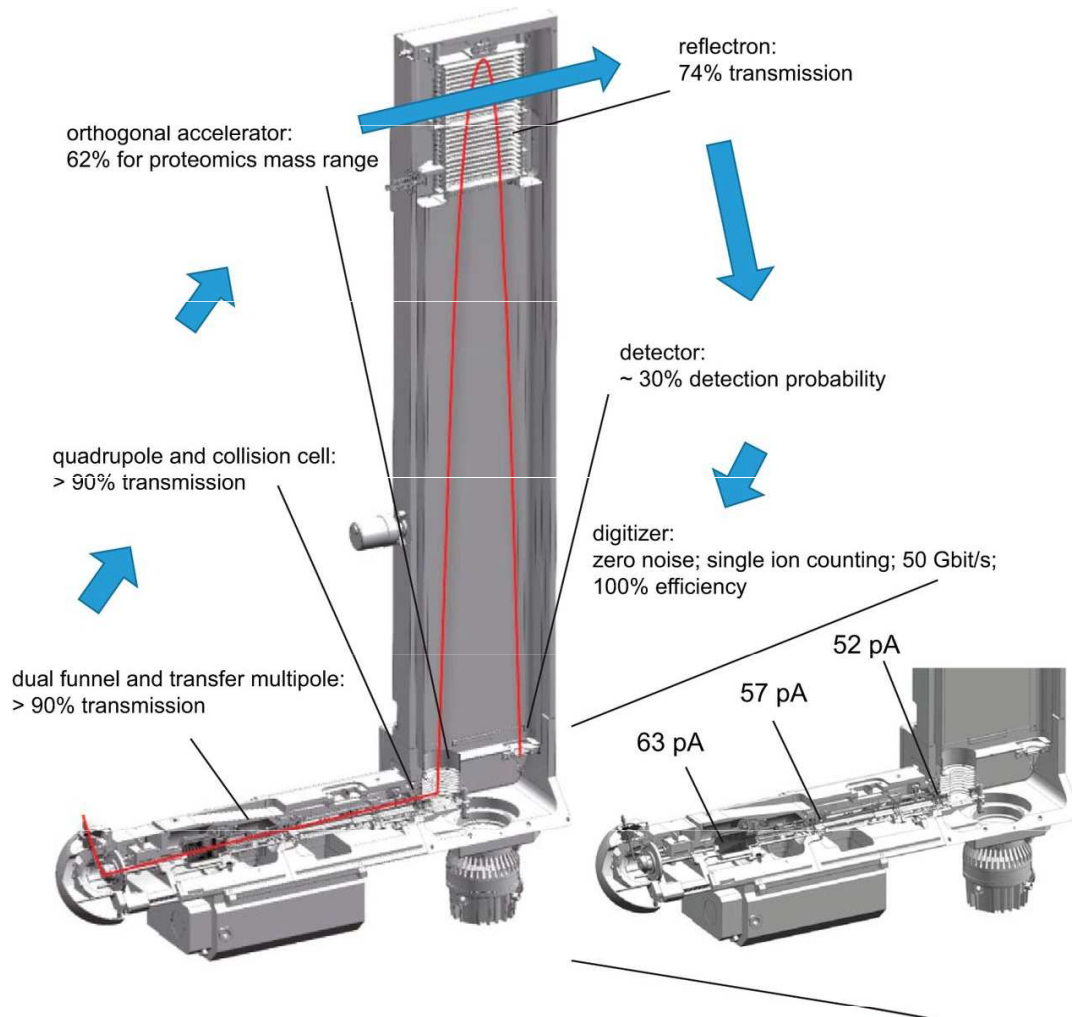
Beta-sekretáza

- pro studie aktivity BACE1 jsou využívány analytické systémy založené na FRET (Förster Resonance Energy Transfer) technologii



- nízká rozpustnost fluorescenčně značených substrátů
- riziko falešně pozitivních/negativních výsledků

Off-line uspořádání s CE-ESI-QTOF



Off-line uspořádání s CE-ESI-QTOF

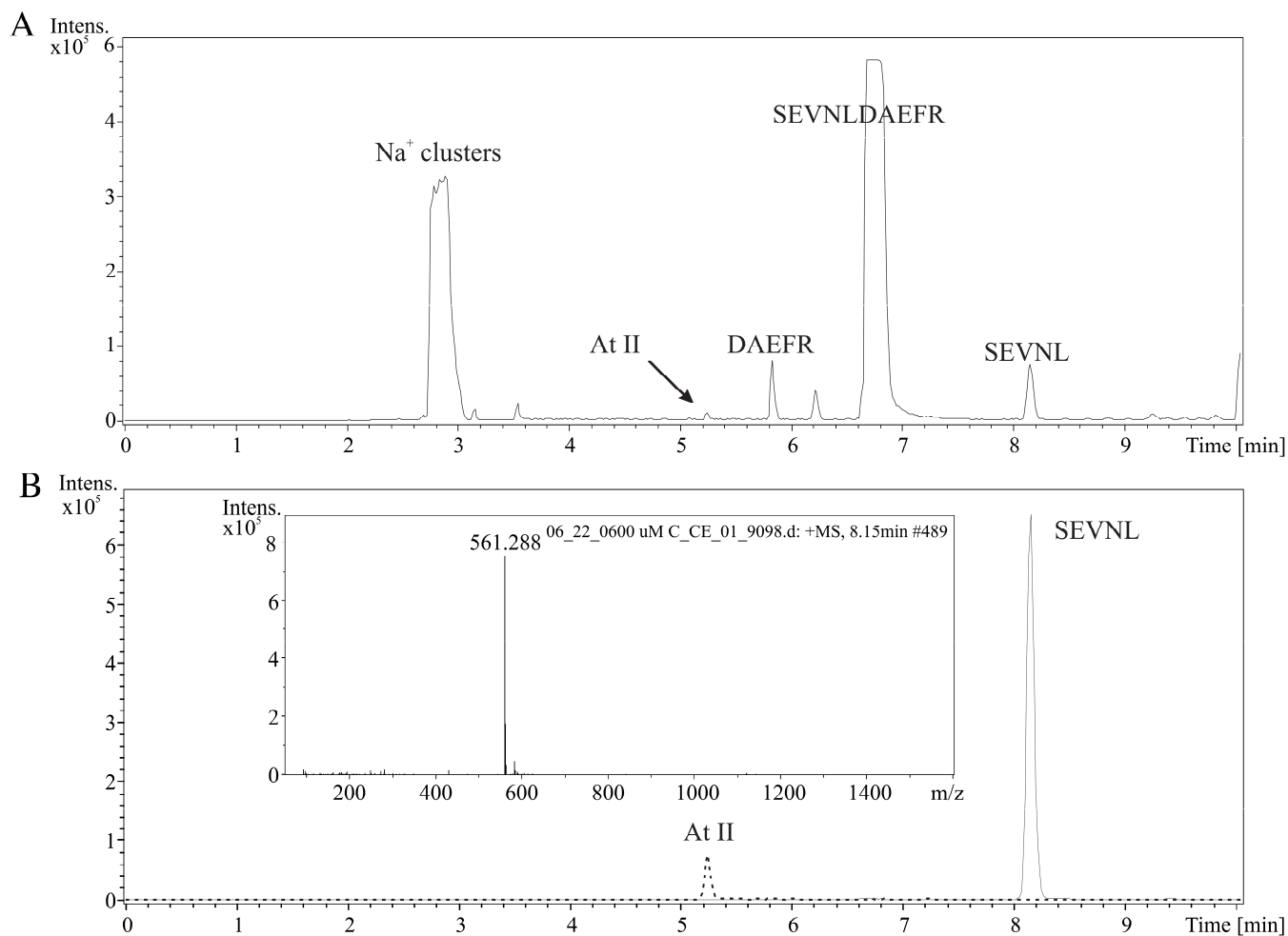


Fig. 1. Base peak electropherogram of CE-MS analysis of sample acquired during kinetics assay using 600 μ M substrate (A) and extracted ion electropherograms of internal standard At II (—) and quantified product SEVNL (---) together with MS spectrum of SEVNL peak illustrating efficient separation (insert) (B).

Off-line uspořádání s CE-ESI-QTOF

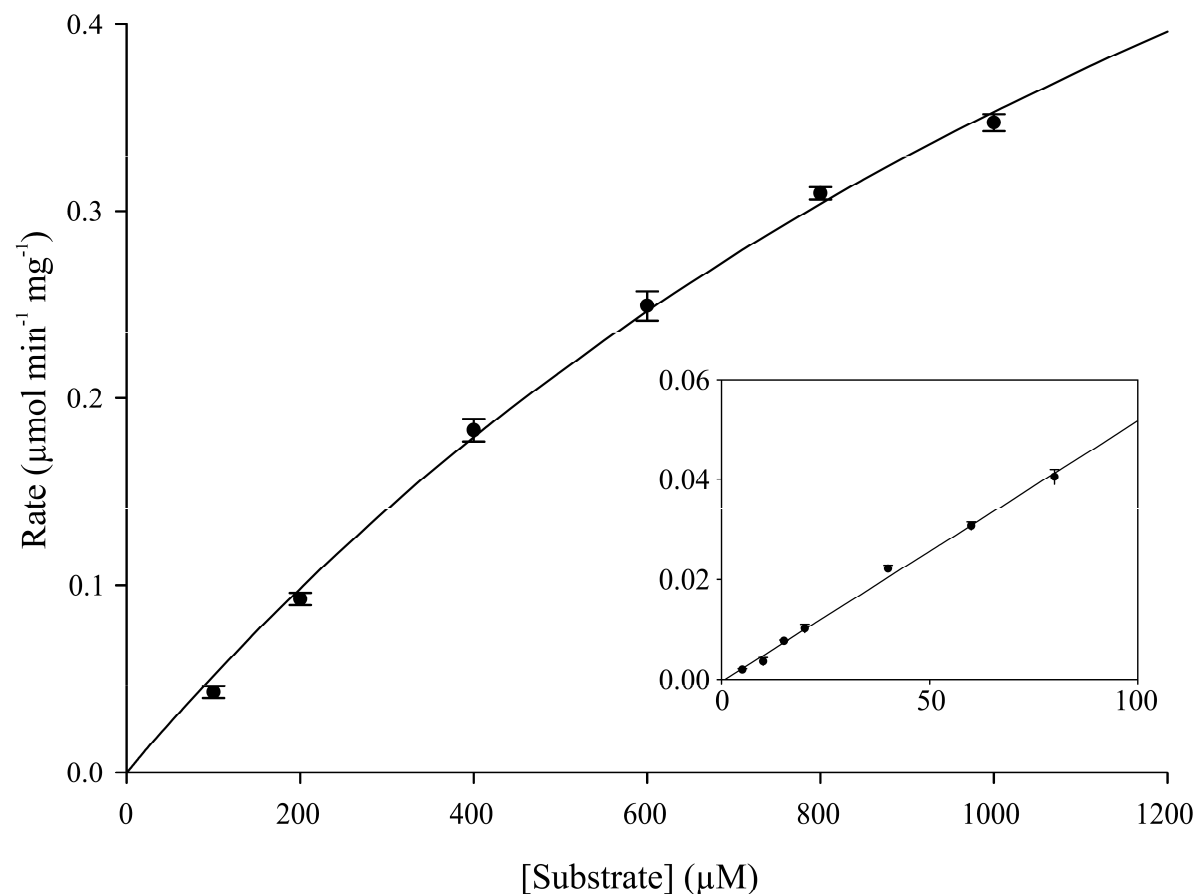


Fig. 3. Michaelis-Menten kinetics plot for BACE1 with SEVNLDAEFR decapeptide as the substrate. Symbols denote means of triplicates. The insert illustrates kinetic behaviour at lower substrate concentrations.

Off-line uspořádání s CE-ESI-QTOF

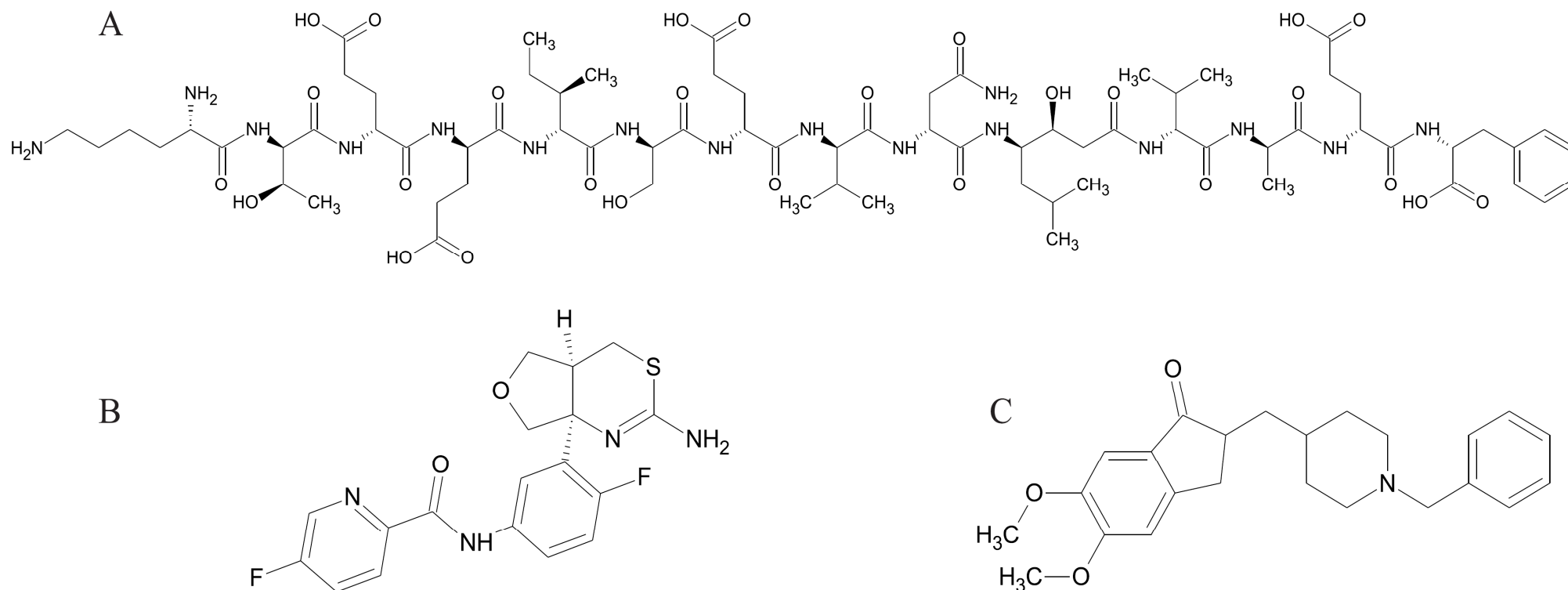


Fig. 4. Structural depiction of inhibitors used: statine inhibitor (A), synthetic inhibitor LY2886721 (B) and donepezil (C).

Off-line uspořádání s CE-ESI-QTOF

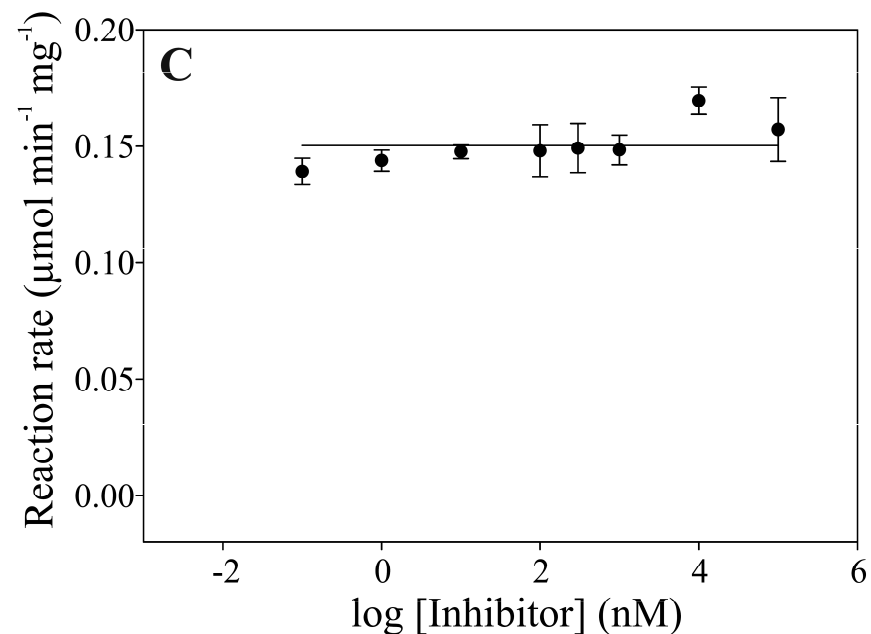
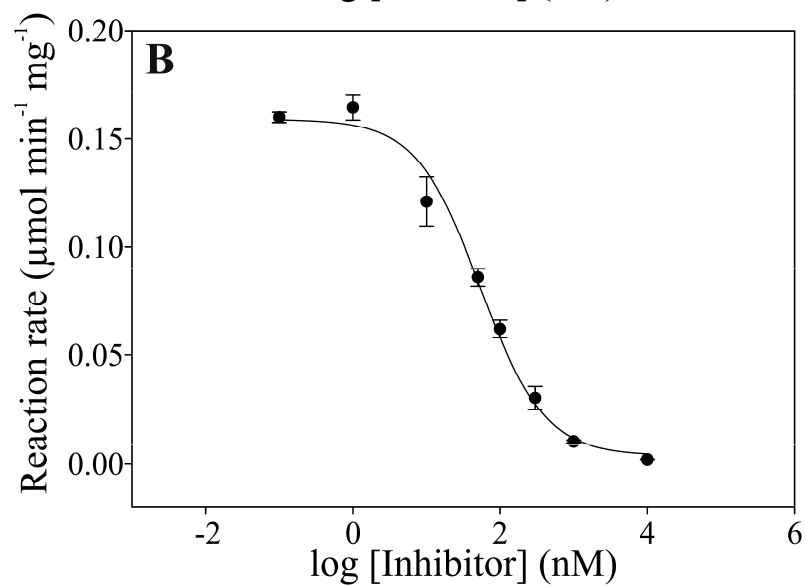
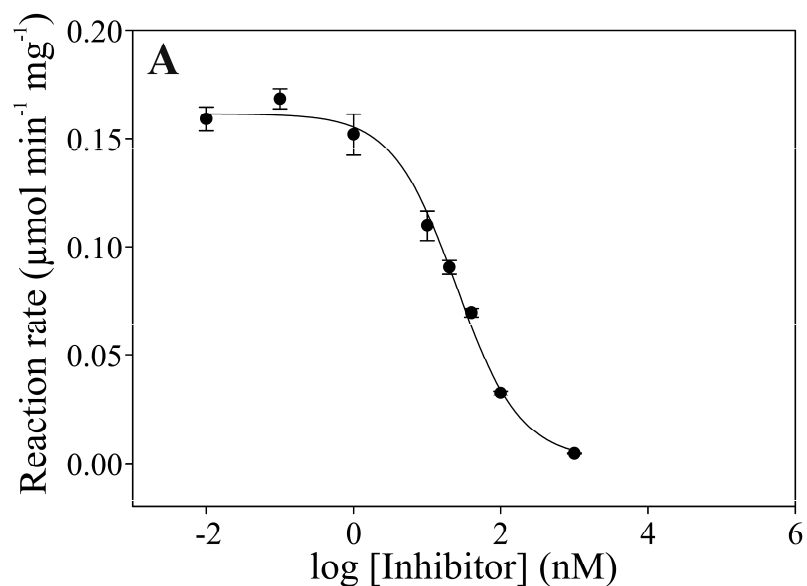
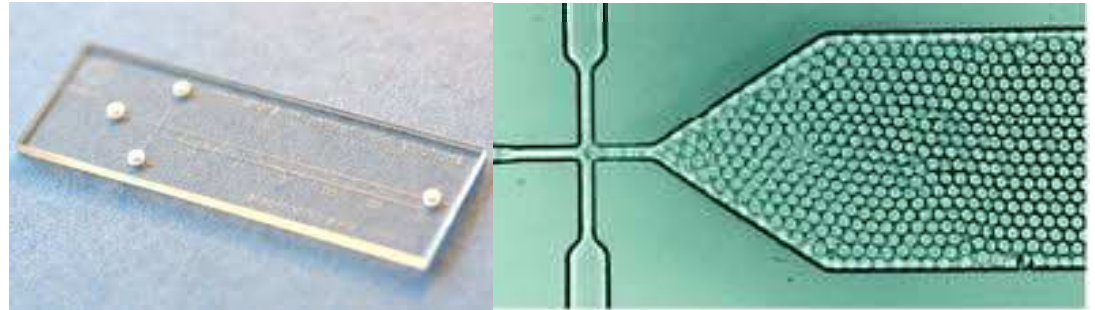


Fig. 5. Sigmoidal dose response curves of BACE1 activity versus logarithmic concentration of LY2886721 (A), statine inhibitor (B) and donepezil (C) clearly demonstrate high potency of first two inhibitors and zero inhibitory potency of donepezil towards BACE1.

Současné trendy v bioanalýze

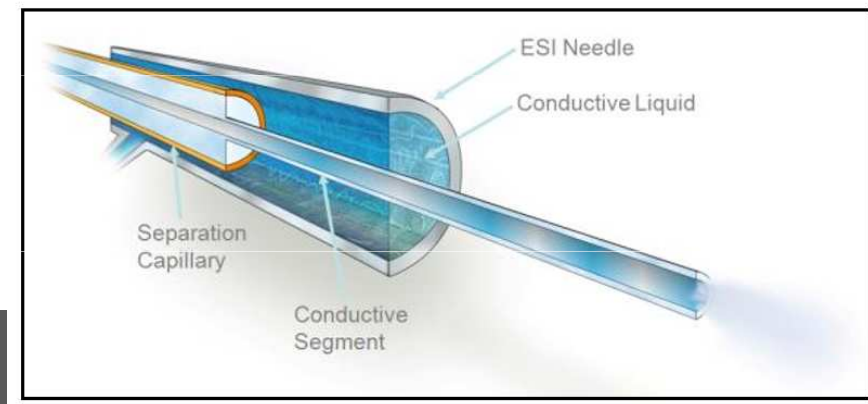
- Minituarizace
- Zvyšování propustnosti systémů
- Zvyšování citlivosti

→ CE na čipu



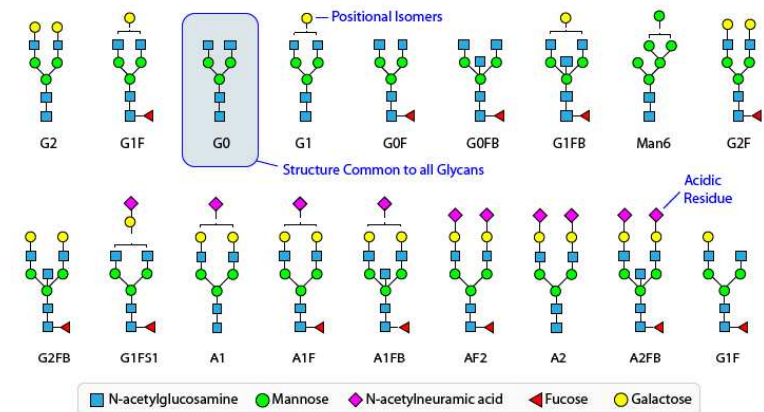
→ spojení mikrofluidiky a CE na principu Lab-on-Chip

→ CE-MS standardem
(Sheetless CE-MS?)



Současná a budoucí témata CE?

- aplikace
- proteomika (native CE)
- studium glykosylací proteinů
- mikrofluidika a CE
- multidimenzionální analýzy
- analýzy jednotlivých buněk
- hledání extraterestriálního života



Mise NASA

- Mars Science Laboratory (2012–současnost)
 - Europa Clipper (2022?)
 - Enceladus Life Finder
- hledání aminokyselin a malých organických kyselin pomocí CE-C⁴D a CE-MS

