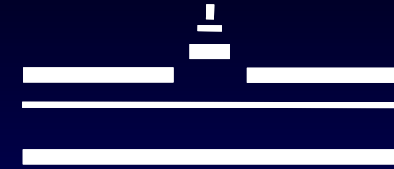
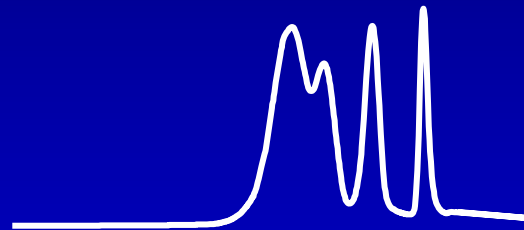


UCDAVIS



Flüssigkeitschromatographie (LC) mit biochemischer Detektion (BCD)



Nils Helge Schebb¹, Hubertus Irth² und Uwe Karst³

¹ University of California, Davis, Department of Entomology, One Shields Ave, Davis 95616, California

² Vrije Universiteit Amsterdam, Analytical Chemistry, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam

³ Universität Münster, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Corrensstr. 30, 48149 Münster

Inhalt

- LC-BCD bisher wenig bekannt
- Großes Potential für die Anwendung in der Lebensmittelchemie

→ **Ziel des Vortags:** Vorstellung der LC-BCD anhand von 3 Beispielen:

1. Screeningmethode für Proteasen in komplexen Gemischen,
2. Screeningmethode für Proteaseinhibitoren
3. Untersuchung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Inhibition durch Mykotoxinmetabolite

Einleitung

Häufiges Ziel in der lebensmittelchemischen Forschung:

→ Auffinden und Charakterisierung biologisch aktiver Komponenten

Biologische Aktivität

- Wirkung von Substanzen auf (regulatorische) biologische Systeme
 - z.B. Angiotensin converting enzyme (ACE) Hemmung durch Peptide aus hydrolysierten Milchprotein
 - z.B. hormonähnliche Wirkung von Isoflavonen

Wirkung basierend auf Interaktion mit

→ Enzymsystemen

→ endogenen Rezeptoren

Einleitung

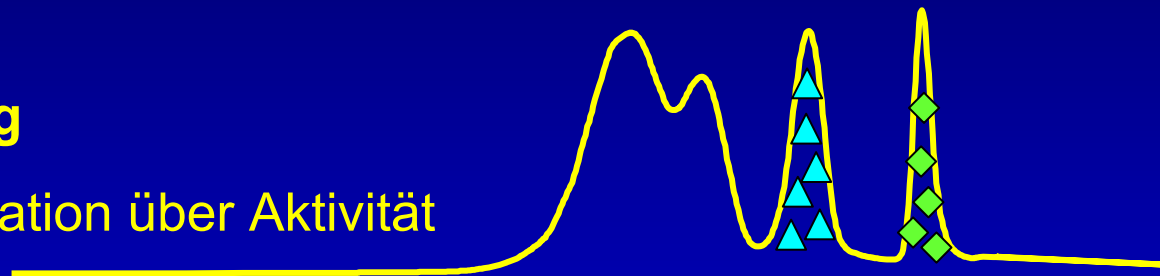
Häufiges Ziel in der lebensmittelchemischen Forschung:

→ Auffinden und Charakterisierung biologisch aktiver Komponenten

Lebensmittel sind komplexe Mischungen

LC-Trennung notwendig

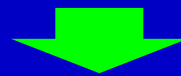
→ aber: keine Information über Aktivität



⇒ **Fraktionssammlung**

Aktivitätsmessung mit konventionellem Plattenreader

2 Schritte ! → *arbeitsintensiv !*



LC mit biochemischer Detektion (BCD)

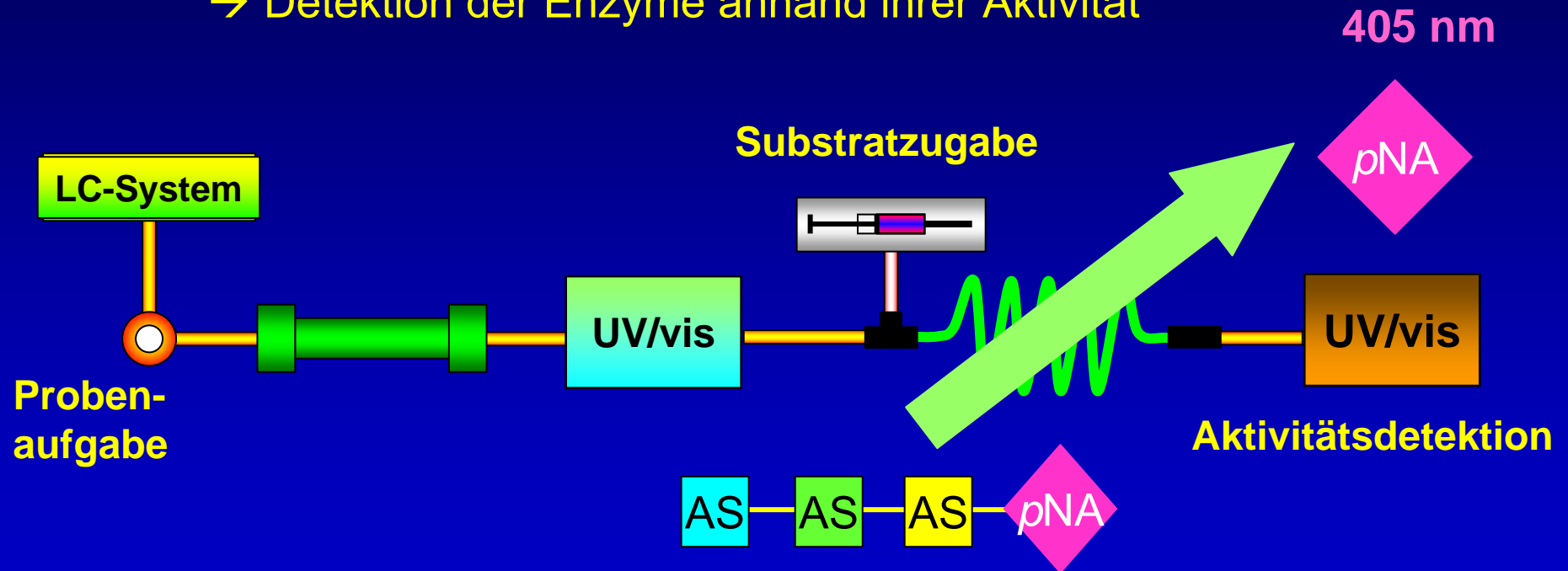
Proteasen

- Katalyse der Spaltung von Peptidbindungen in
 - Peptiden
 - Proteinen
- Ubiquitäres Vorkommen in allen Lebewesen
- 500 menschliche Gene (2% des Genoms)
 - Nur wenige davon charakterisiert
- Schlüsselfunktion in der Regulation von:
 - Blutgerinnung
 - Apoptose
- Anwendung von Proteasen in Lebensmitteltechnologie

LC mit biochemischer Detektion (BCD)

LC-Trennung der Enzyme

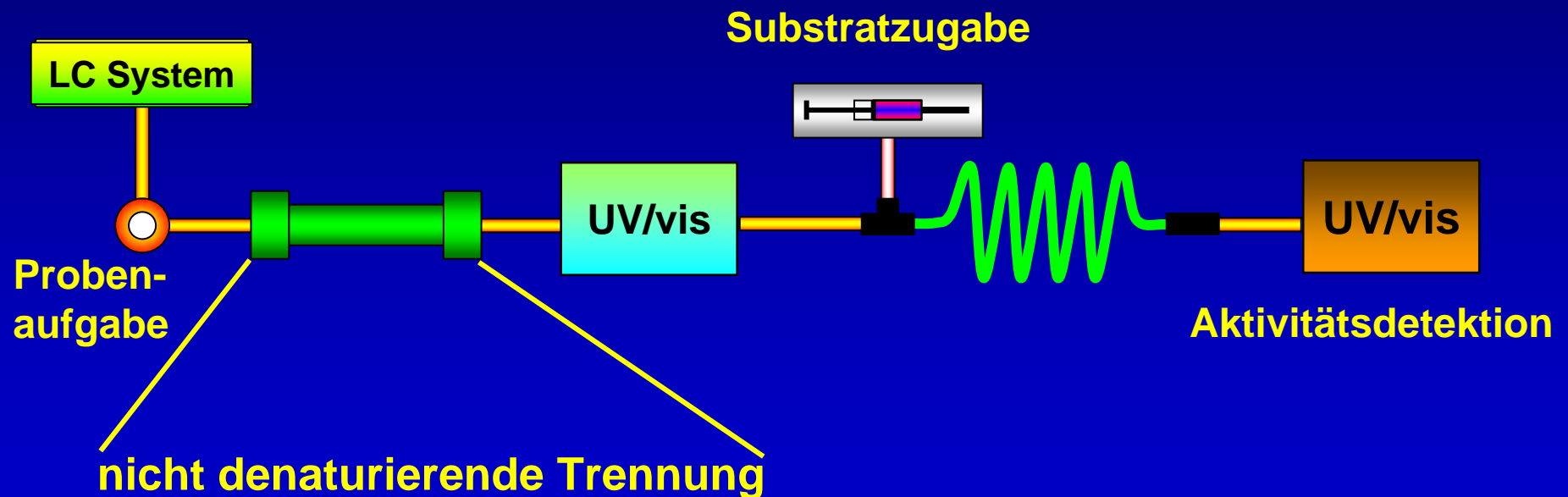
- Nachsäulenseitige Zugabe von pNA-markiertem Substrat
→ Detektion der Enzyme anhand ihrer Aktivität



LC mit biochemischer Detektion (BCD)

LC-Trennung der Enzyme

- Nachsäulenseitige Zugabe von *p*NA-markiertem Substrat
→ Detektion der Enzyme anhand ihrer Aktivität



Native Enzymtrennung

Klassisch:

PAGE

Isoelektrische Fokussierung (IF)

→ kein Online-
Kopplung möglich

LC-Techniken

RP- Chromatographie

Polarität

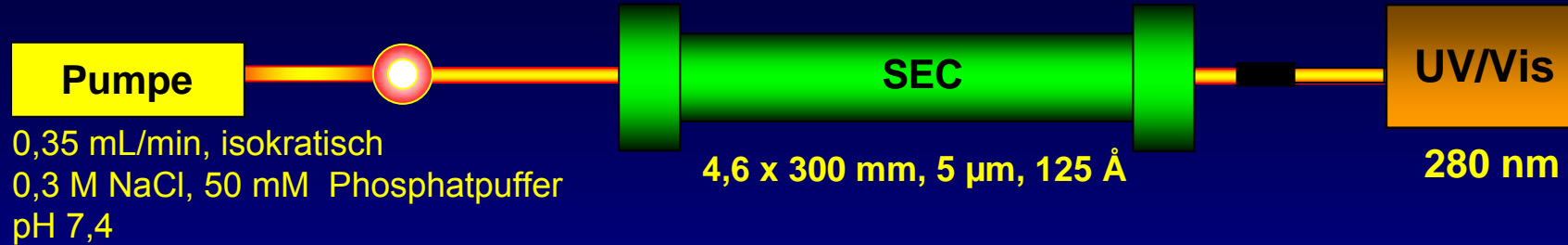
Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Ladung

Größenausschlusschromatographie (SEC)

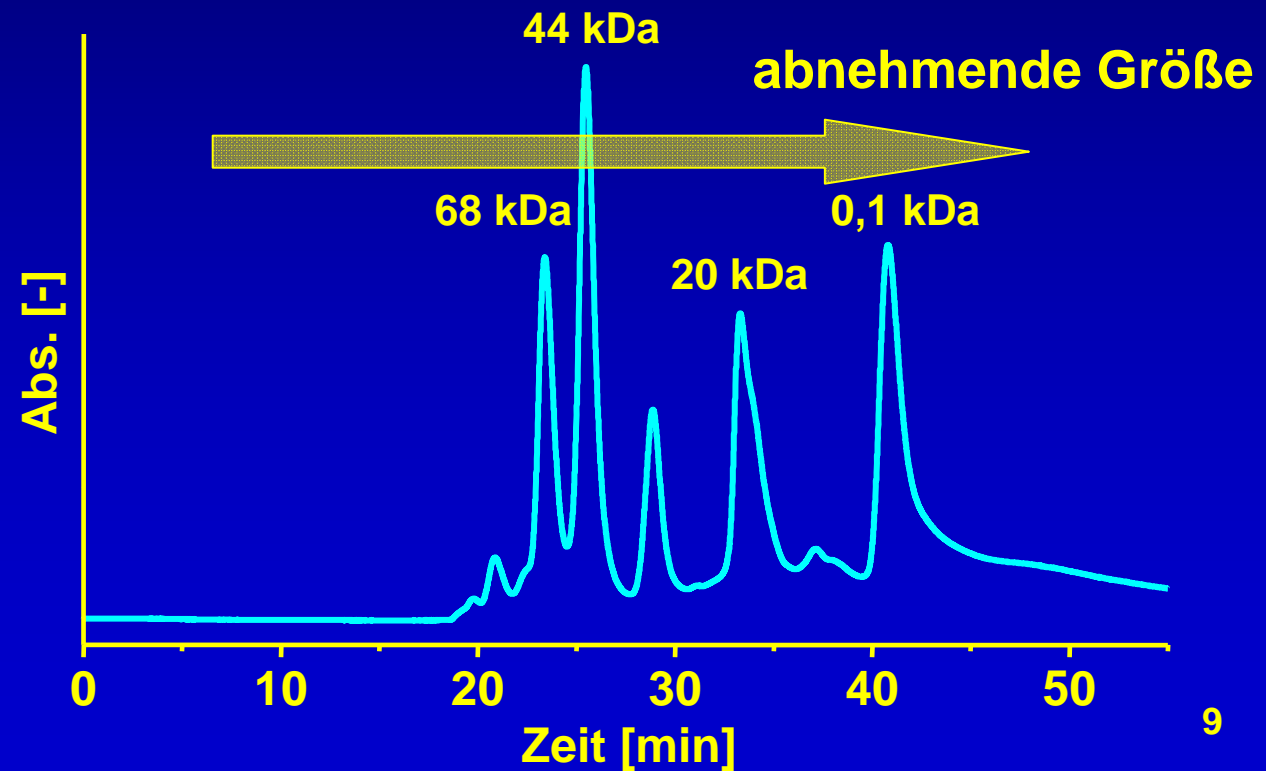
Größe

SEC nativer Enzyme

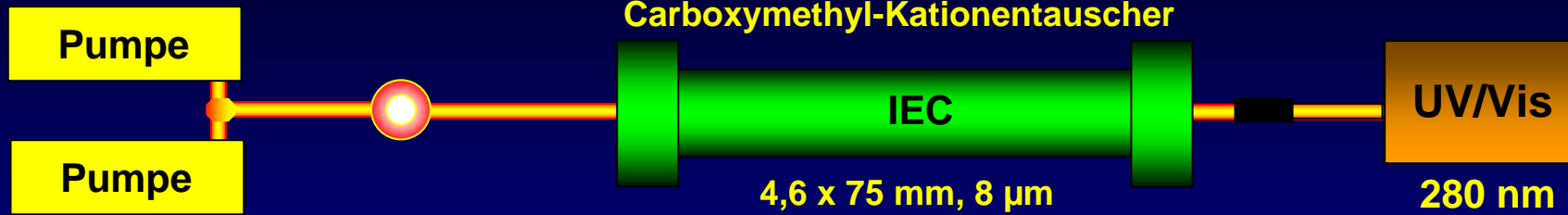


Proteinstandard

- BSA (68 kDa)
- Ovalbumin (44 kDa)
- Trypsininhibitor (Soja) (20 kDa)
- 4-Aminobenzoesäure



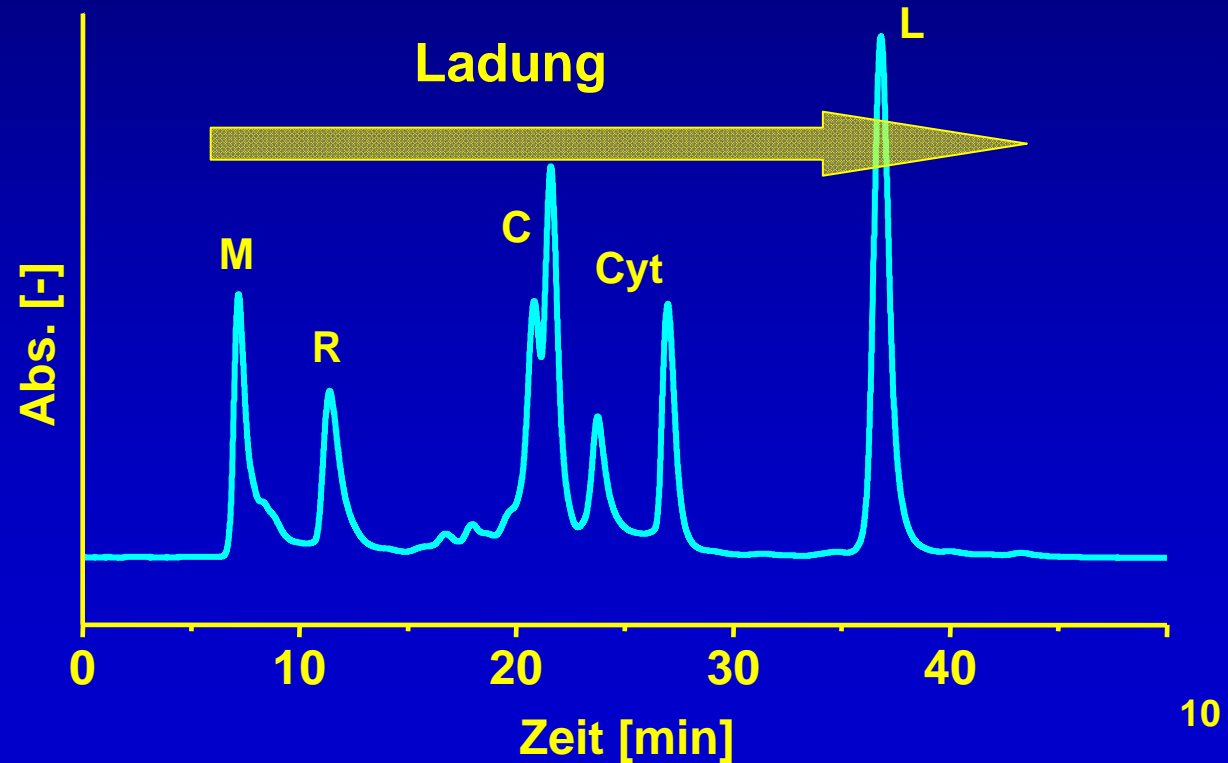
IEC nativer Enzyme



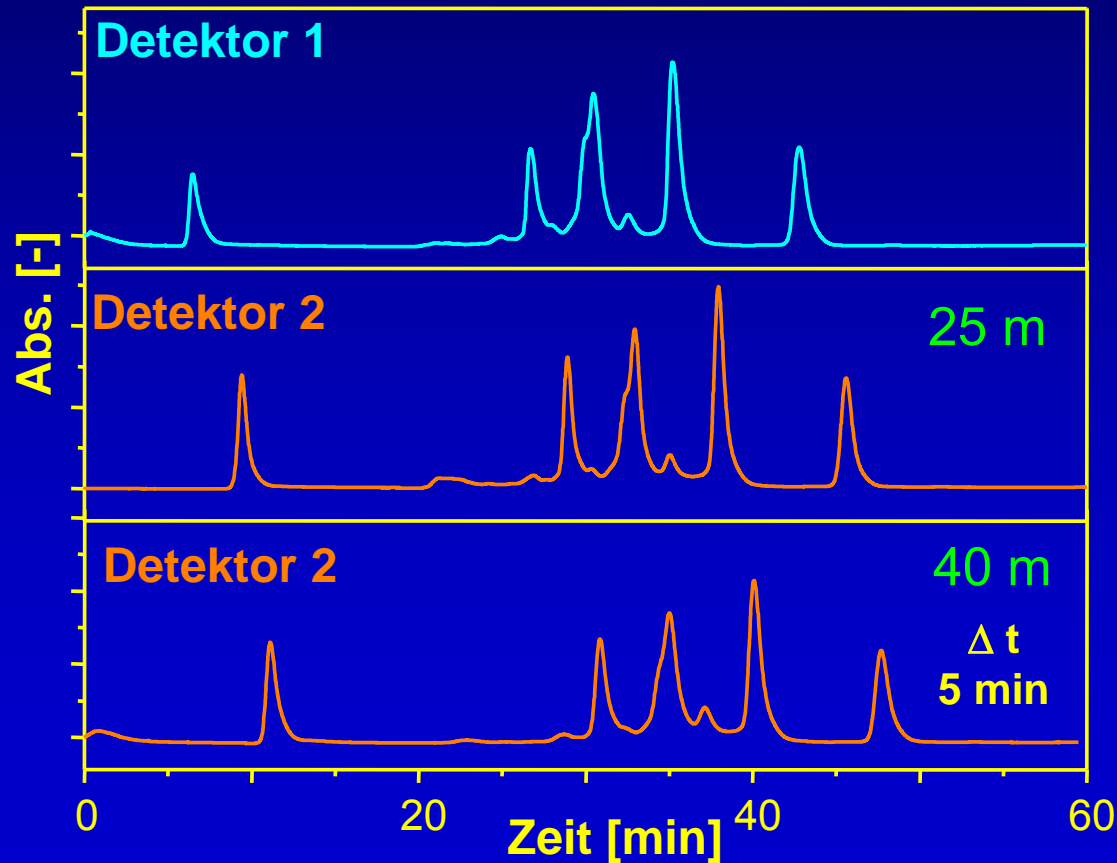
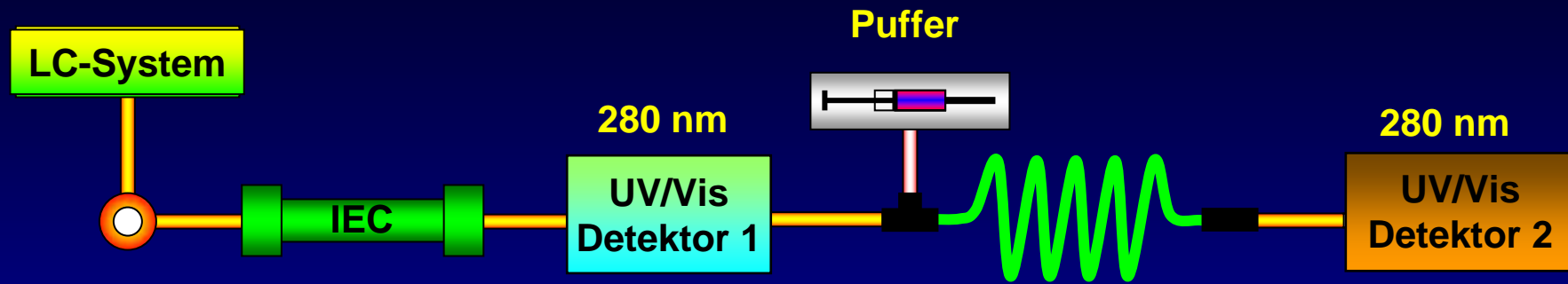
Gradient: 0 - 0,5 M NaCl

Proteinstandard

- M yoglobin
- R ibonuklease
- C hymotrypsinogen
- C ytochrom c
- L ysozym

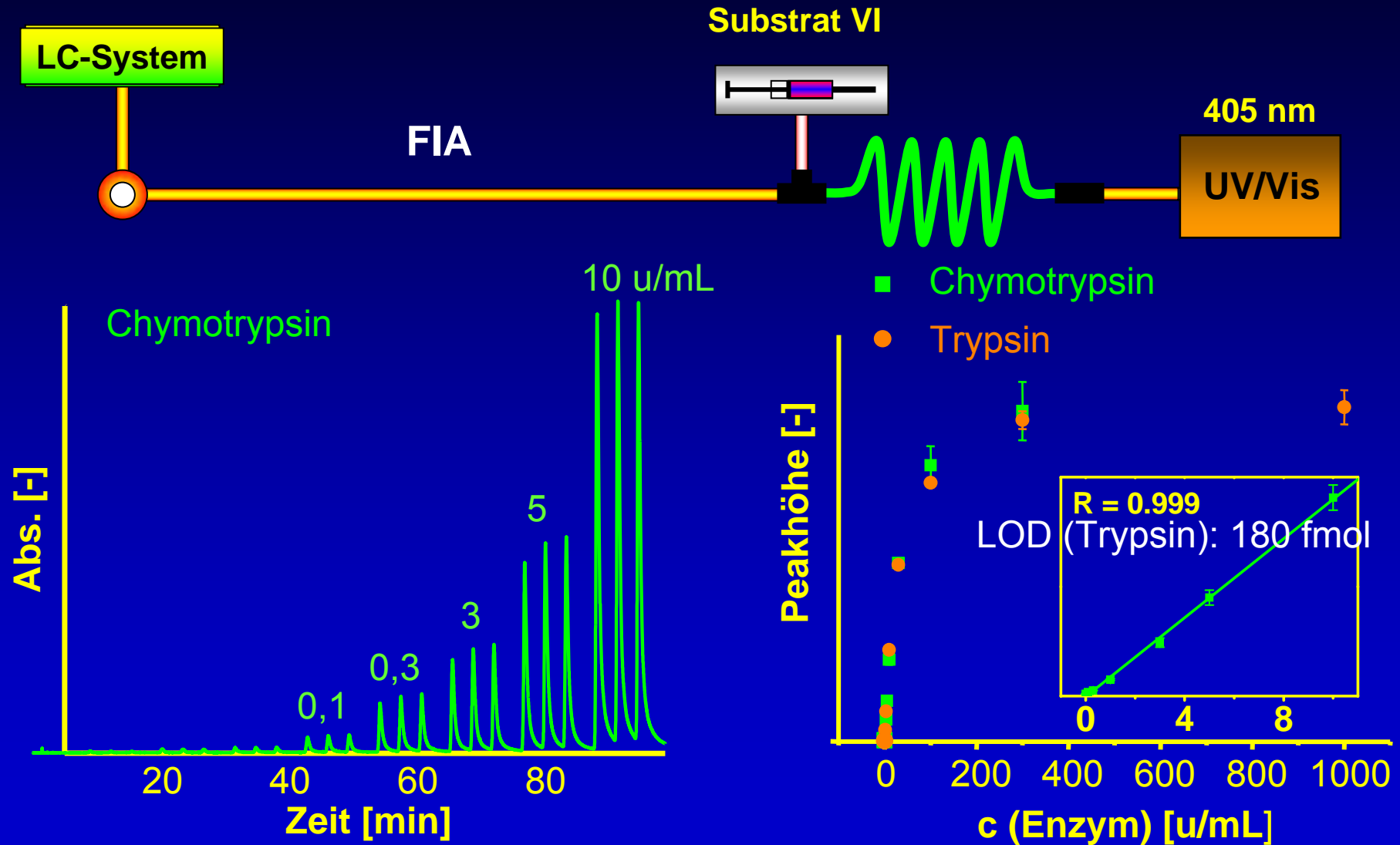


BCD von Proteasen (IEC)

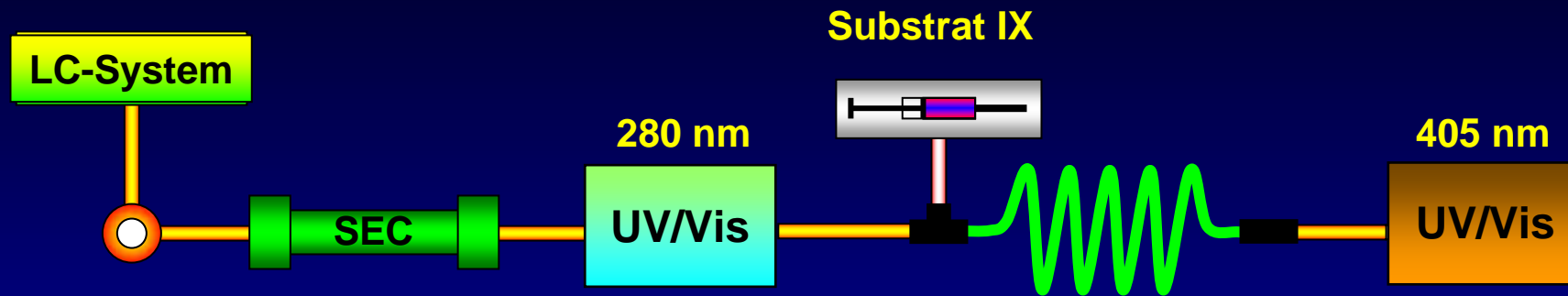


Fluss: 0,4 mL/min
Kapillare
ID 0,25 mm

BCD von Proteasen (FIA)



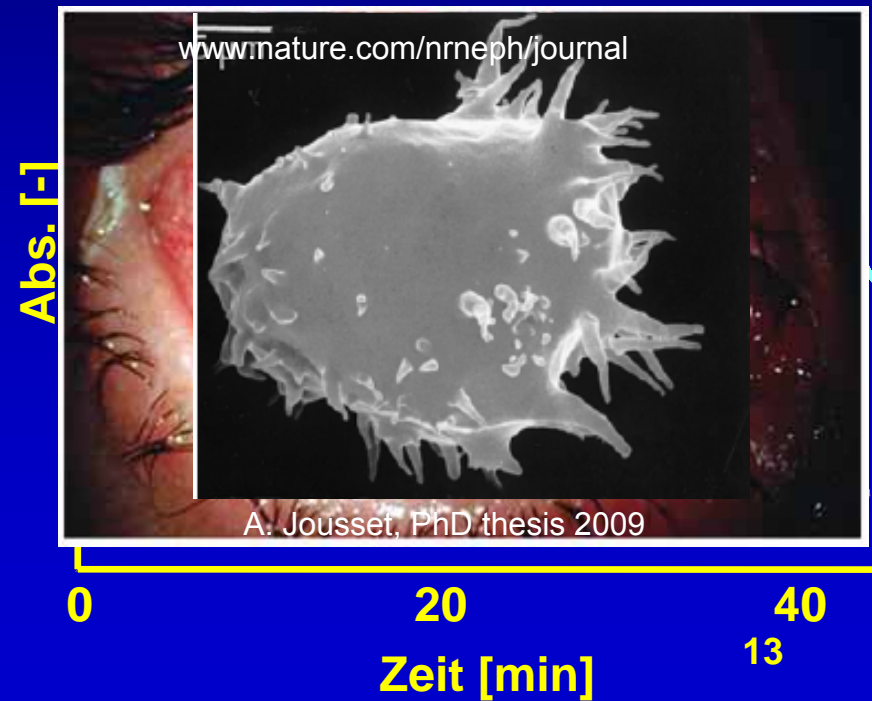
SEC-BCD von Proteasen: Realproben



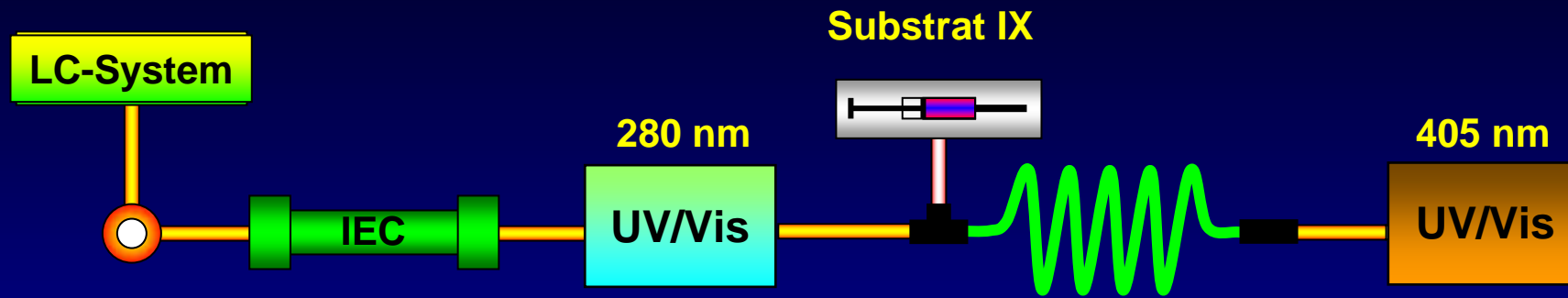
Gift von Bothrops moojeni



Acanthamoeba castellanii

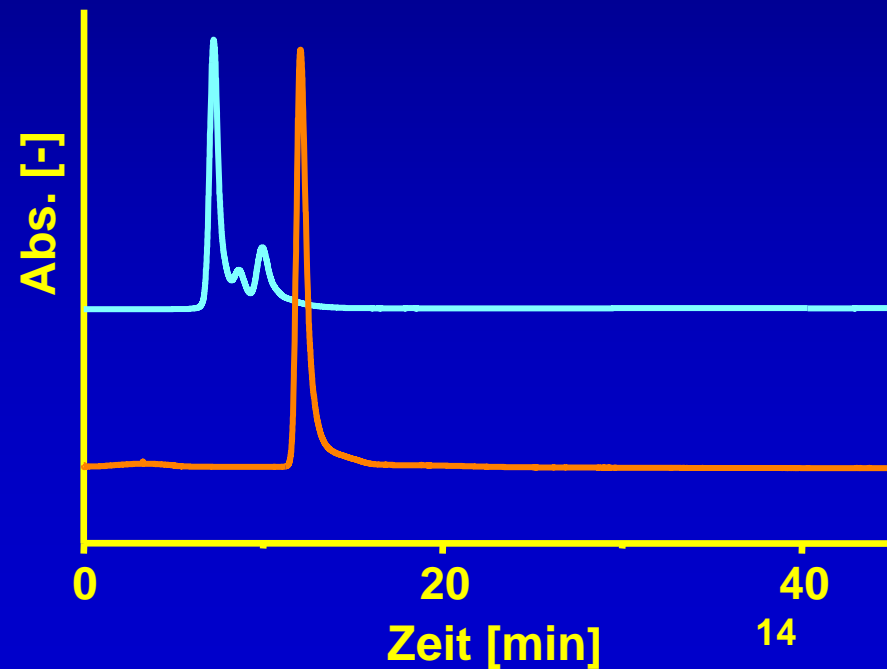
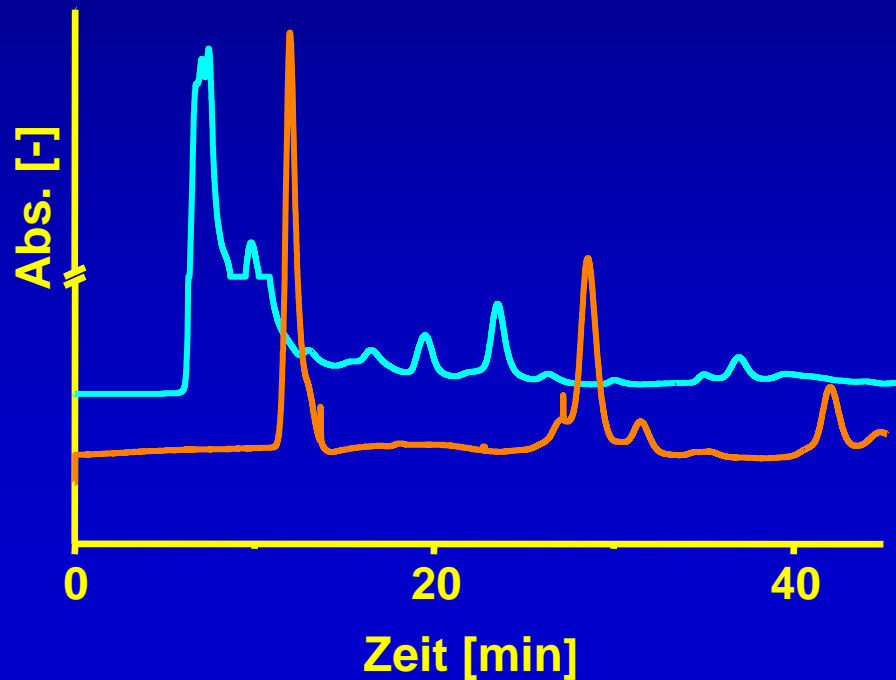


IEC-BCD von Proteasen: Realproben



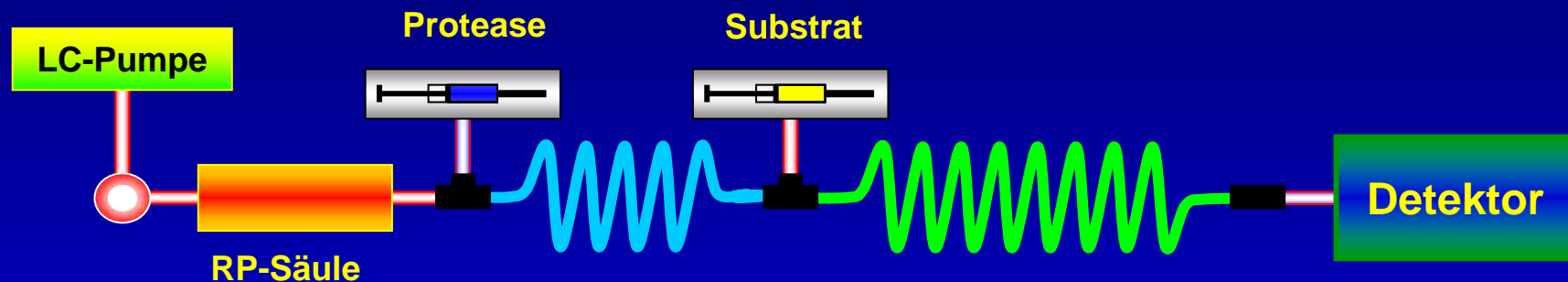
Gift von Bothrops moojeni

Acanthamoeba castellanii



Inhibitorscreening mit LC-BCD

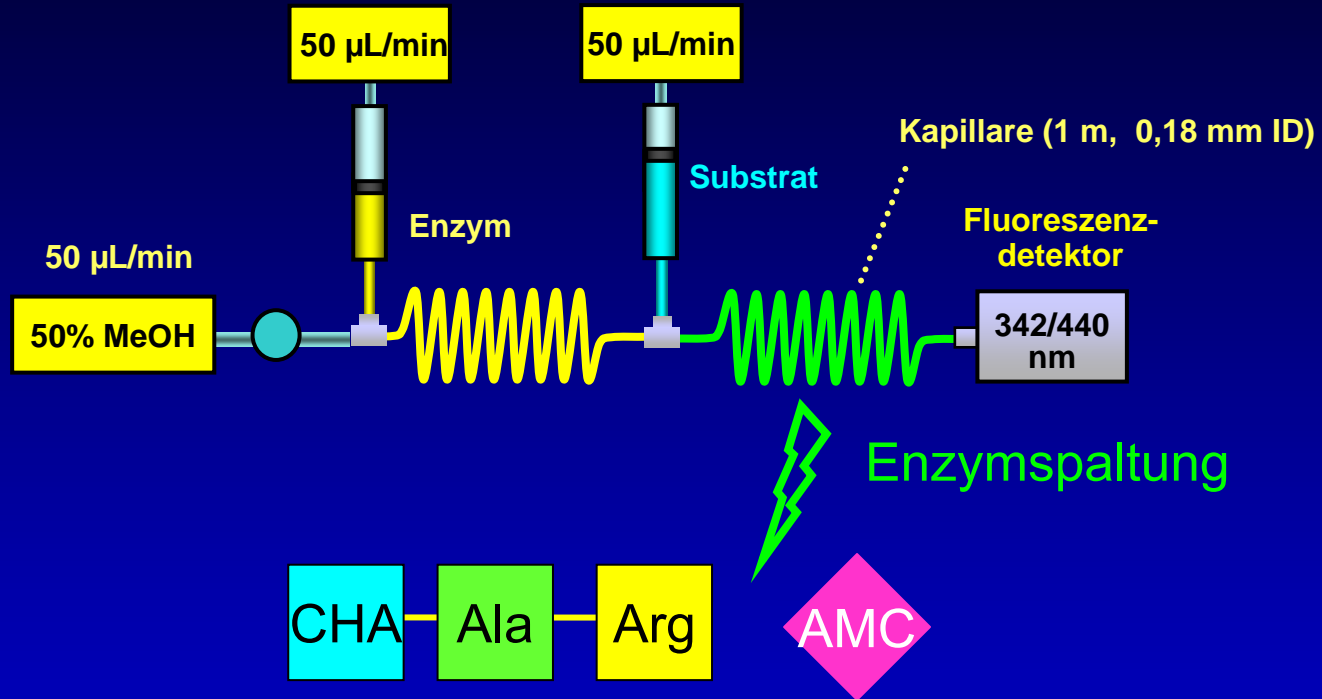
- Enzyminhibitoren sind aktive Inhaltsstoffe in Lebensmitteln
- komplexe Gemische
- chromatographische Trennung vor Aktivitätsmessung



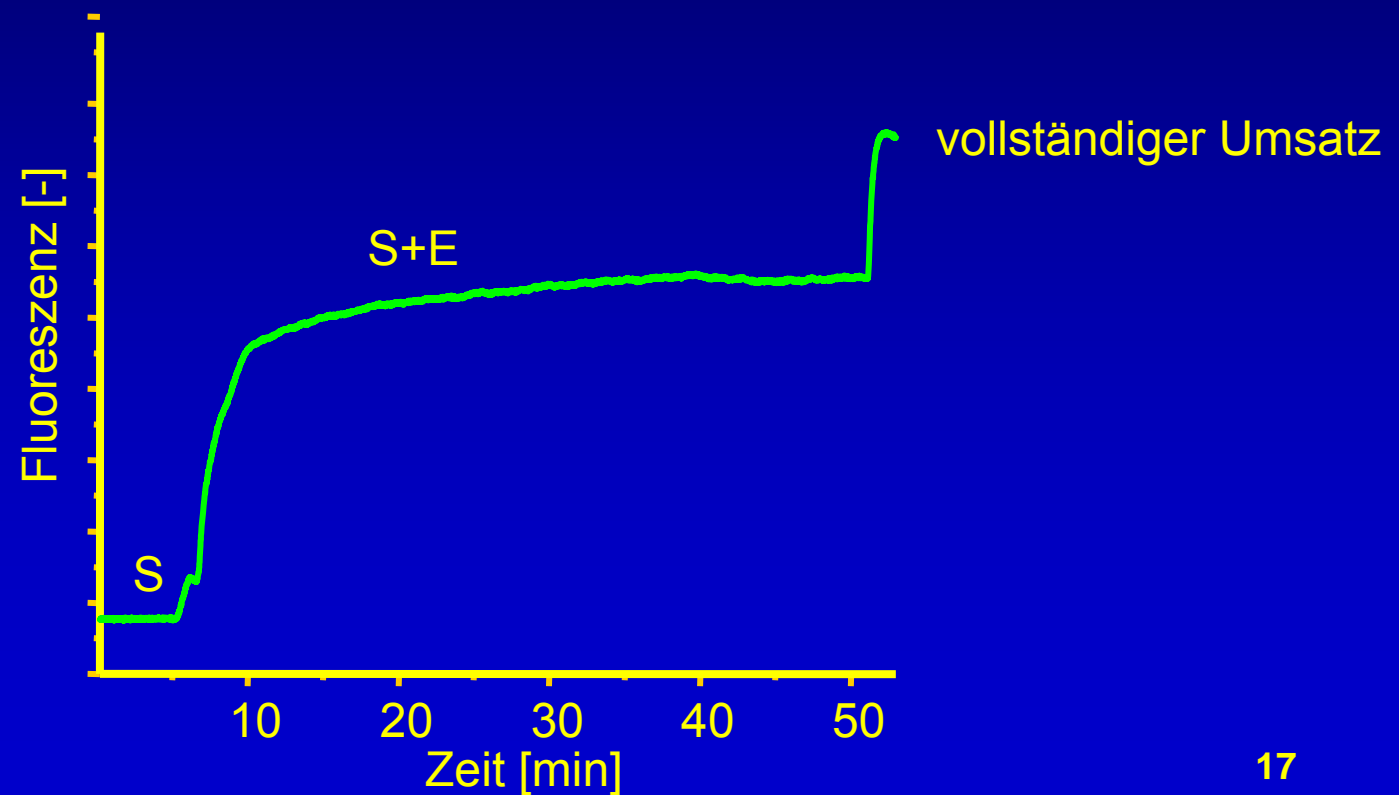
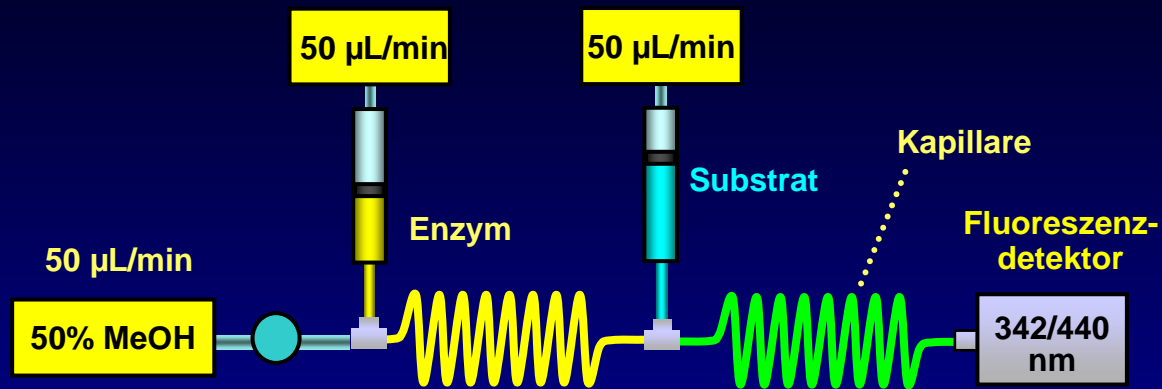
- Trennung der potentiellen Inhibitoren
 - Reaktion der eluierenden Inhibitoren mit dem Enzym
 - Produktbildung durch freies Enzym (steady state)
 - kontinuierliche Messung des Produktes

Signalentwicklung des BCD

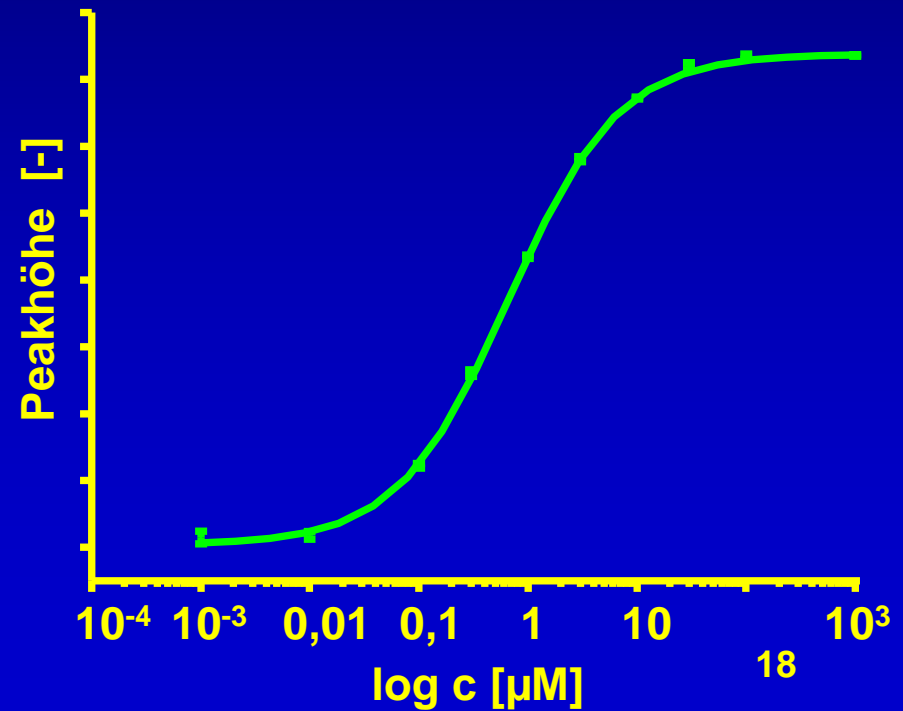
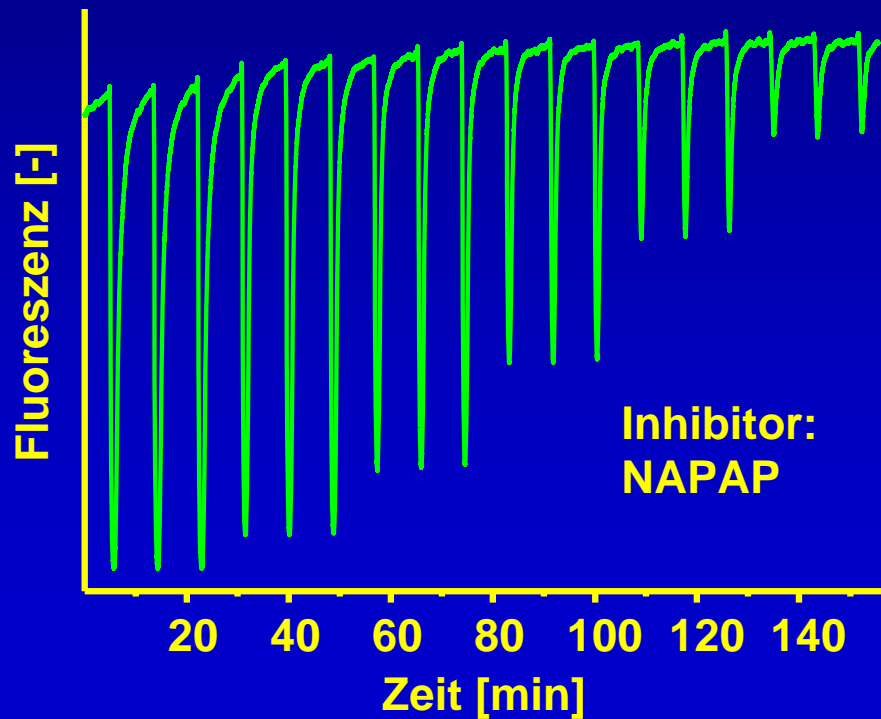
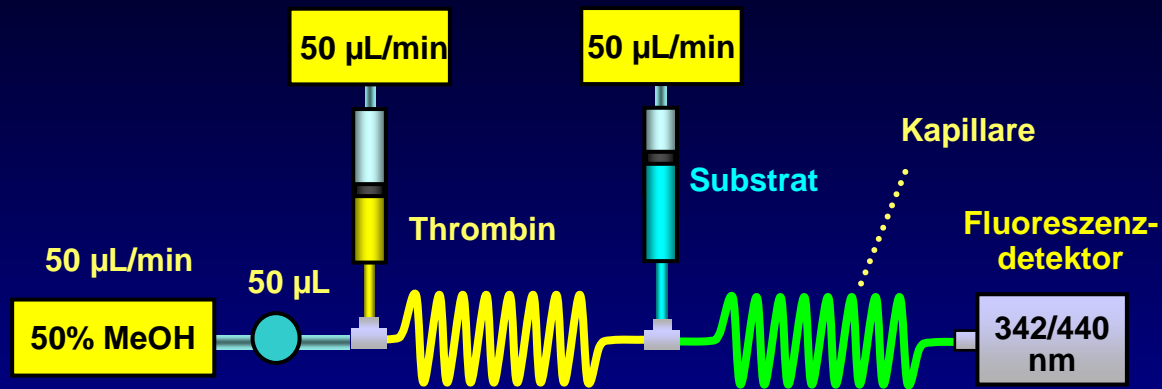
Beispiel: Screening nach Proteaseinhibitoren



Signalentwicklung des BCD



FIA-Analyse von Thrombininhibitoren



IC₅₀ Werte

- Gute Übereinstimmung mit klassischem Plattenreader-Verfahren:

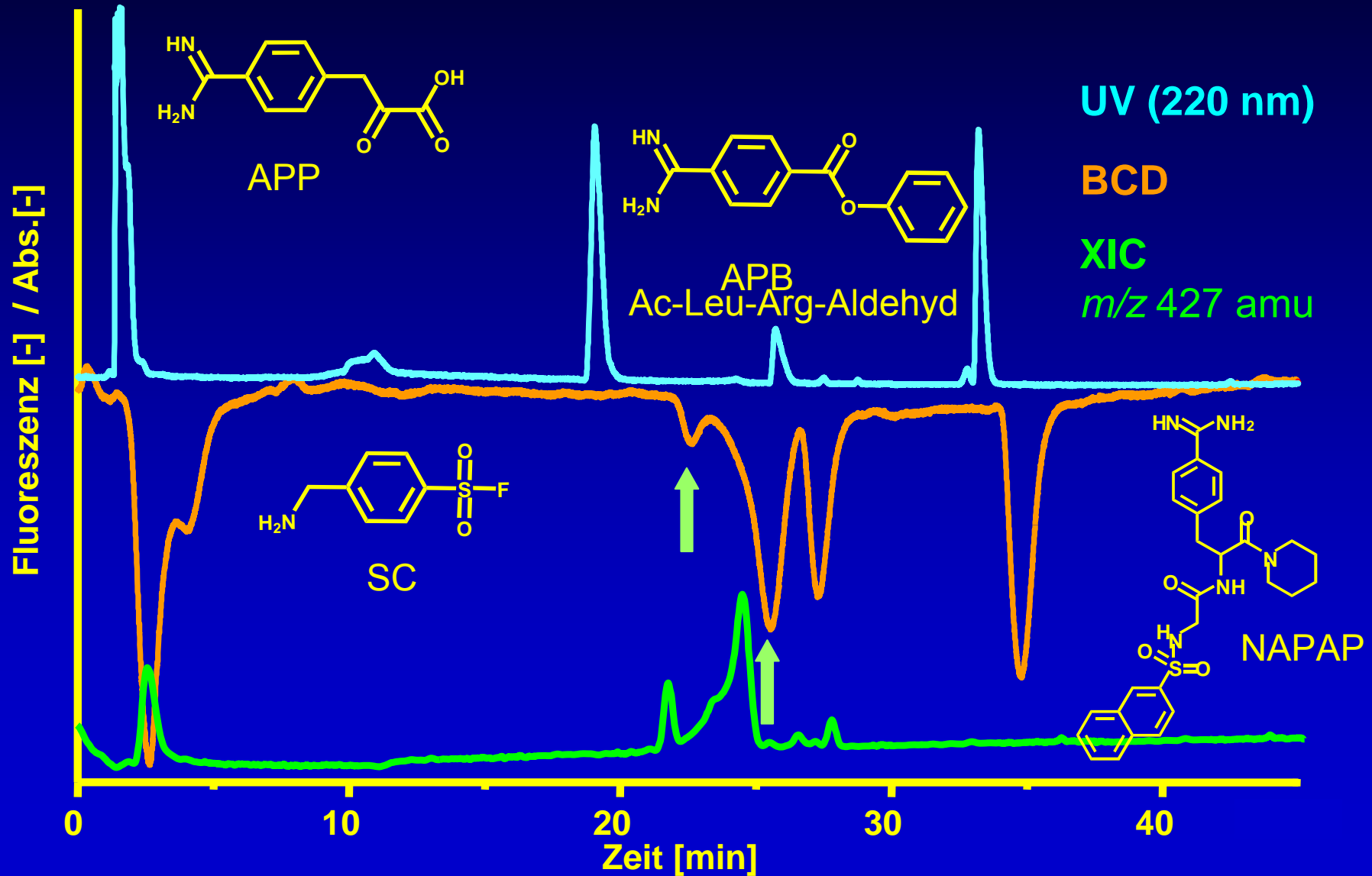
Inhibitor	Trypsin		Thrombin	
	IC ₅₀ BCD	IC ₅₀ Platte	IC ₅₀ BCD	IC ₅₀ Platte
APP	1,3 µM	1,4 µM	3,2 µM	3,6 µM
APB	1,5 µM	1,7 µM	1,1 µM	1,9 µM
NAPAP	2,0 µM	1,2 µM	0,03 µM	0,03 µM

BCD koppelbar mit der LC

- Analyse von komplexen Mischungen auf Inhibitoren
- Simultane Bestimmung verschiedener Inhibitoren möglich

RP-LC-Trennung

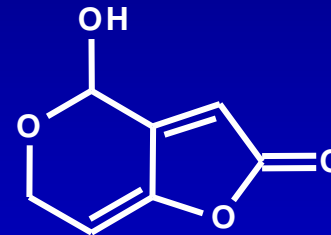
Analyse von 6 Inhibitoren (2 nmol) auf Trypsininhibition



Untersuchung von Patulin mittels LC-BCD

Patulin (PAT)

- Lebensmittelkontaminante (oftmals in Äpfeln)
- akute Toxizität (LD₅₀ in Mäusen: 29 mg/kg Körpergewicht)
 - Verletzung und Entzündung des Gastrointestinaltraktes
- chronisch toxischer Wirkmechanismus unklar
- wahrscheinlich
 - clastogen (DNA brechend)
 - mutagen
 - karzinogen
- sehr reaktiv gegenüber Nukleophilen



→ vermutliche Ursache der toxischen Wirkung

Reaktion von Patulin mit Glutathion (GSH)

- Patulinexposition führt zu GSH-Depletion
 - Ein Molekül Patulin bindet bis zu drei Moleküle GSH
 - >20 PAT-GSH-Konjugate beschrieben
 - Konjugate auch in Blut nachgewiesen (Rychlik 2005)

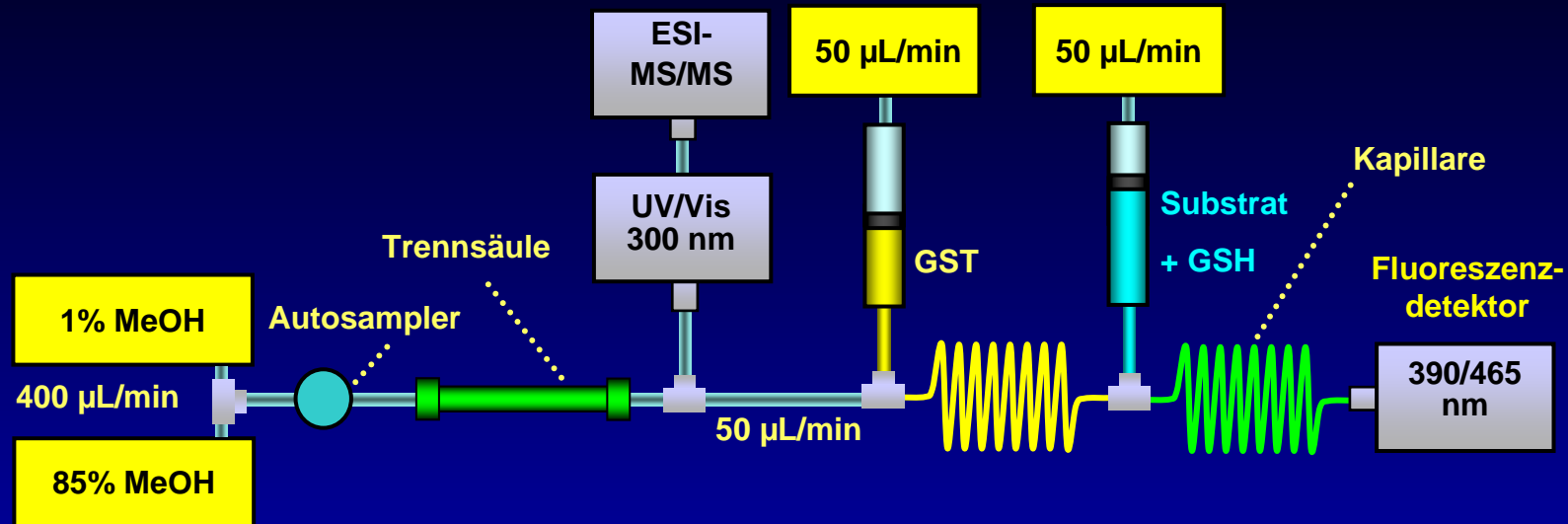
→ PAT-GSH-Konjugation wird als Entgiftung angesehen

→ *Biologische Aktivität der Addukte nie untersucht !*

S-alkylierte GSH-Derivate bekannt als GST-Inhibitoren

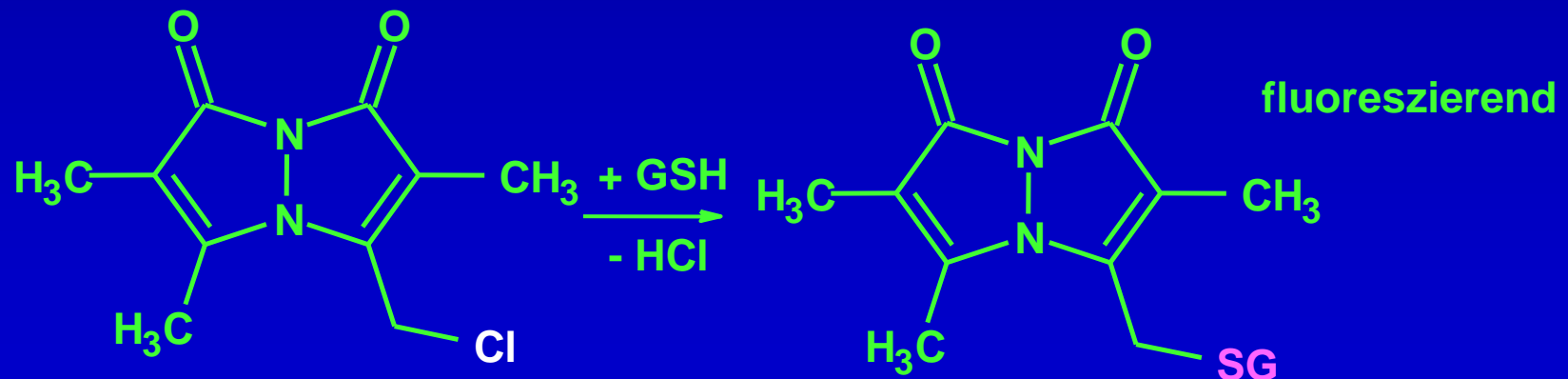
→ LC-BCD-Analyse von Patulin-GSH-Addukten auf GST-Inhibition

Untersuchung von Patulin mittels LC-BCD



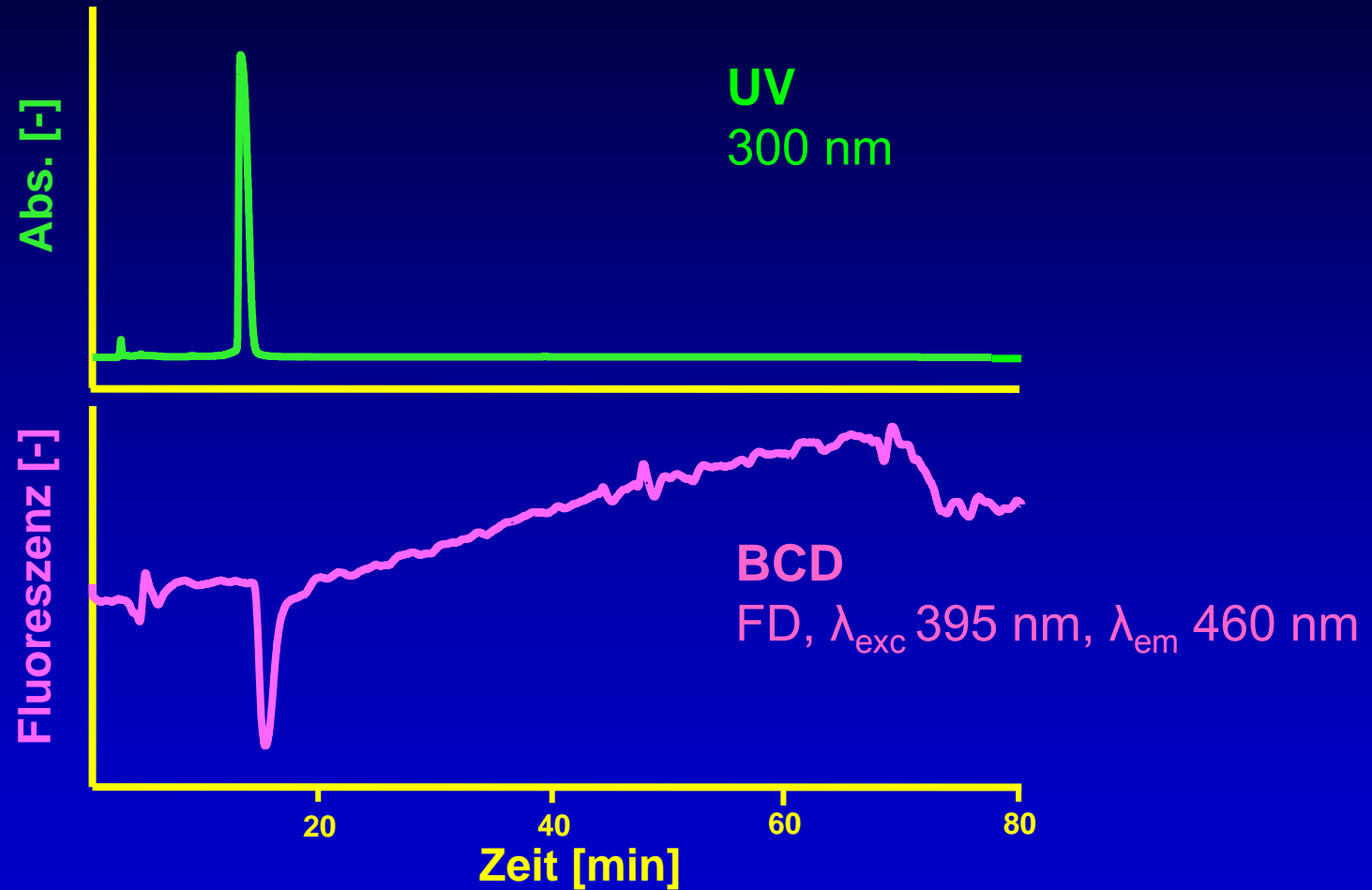
GST-Quelle: Lebercytosol

Substrat: Monochlorobiman (MCB), **Cosubstrat:** GSH



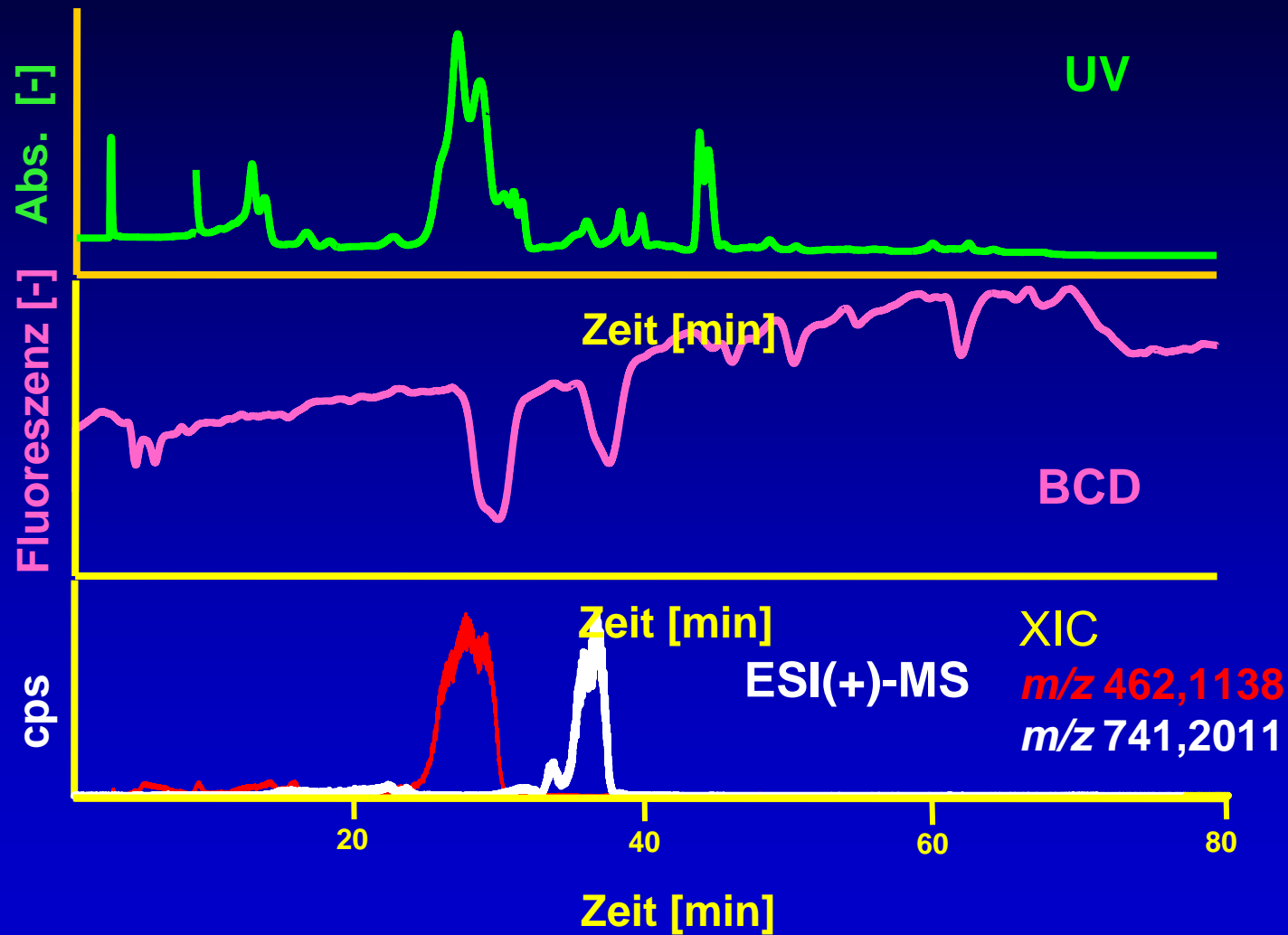
GST-Inhibitionsanalyse mittels LC-BCD

Patulin (0,25 μmol)



GST-Inhibitionsanalyse mittels LC-BCD

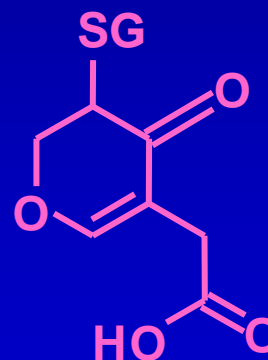
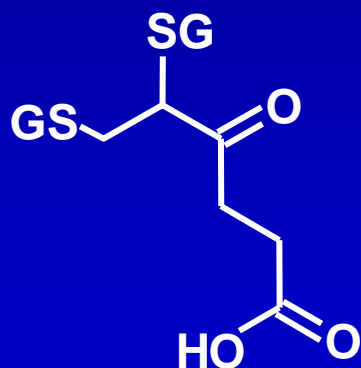
Patulin-GSH-Addukte



TOF-MS Analyse der Patulin-GSH-Addukte

m/z	Summenformel	berechnete m/z	Abweichung [ppm]
741,2011	$C_{26}H_{40}N_6O_{15}S_2$	741,2066	7,4
462,1138	$C_{17}H_{23}N_3O_{10}S$	462,1177	3,5

- Vergleich mit von Fliege und Metzler (1999) beschriebenen Patulin-GSH-Addukten ermöglicht Identifikation:



→ Strukturvorschlag durch MS/MS-Analyse unterstützt

Zusammenfassung

LC-BCD ermöglicht....

- **Screening nach aktiven Enzymen**

- SEC/IEC-BCD-Methode zur Isolierung proteolytisch aktiver Fraktionen

- **Screening nach Enzyminhibitoren**

- LC-BCD/ESI-MS-Methode zur Detektion von Serinprotease-Inhibitoren
- Untersuchung der GST-Inhibition durch Patulin (Phase II)-Metabolite
- Weitere Methoden z.B. für Inhibitoren von:
 - ACE (van Elswijk et al. 2003)
 - Acetylcholinesterase (de Jong et al. 2006)
 - Phosphodiesterase (Schenk et al. 2003)
 - Cytochrom P450 (Kool et al. 2007)

Zusammenfassung

LC-BCD ermöglicht weiterhin...

- **Screening nach Rezeptorliganden**

- Detektion von Estrogen-Rezeptor (α und β) Liganden
 - bspw. Detektion aktiver Metabolite (Kool et al. 2007)

- **Screening nach (bio)chemischen Parametern**

- Detektion von Radikalquenchern (Antioxidantien)
 - bspw. in Pflanzenextrakten (Nuengchamnong et al. 2005)

**Kopplung von LC und BCD ist die Methode der Wahl
zum Aktivitätsscreening in komplexen Mischungen**

Dank

Betreuer:

Prof. Uwe Karst

Prof. Hubertus Irth

Prof. Manfred Metzler

Prof. Sabine Kulling

Prof. Bruce Hammock

Dr. Jeroen Kool

Dr. Martin Vogel

Dr. Heiko Hayen

Kollegen:

Helene Faber

David Falck

Dr. Alexandre Jousset

Ferri Heus

Torsten Vielhaber

Dr. André Liesener

Dr. Ronald Maul

Mathijs Siemerink

Finanzielle Unterstützung:



**Vielen Dank für die
Aufmerksamkeit !**

**Nils Helge Schebb
nhschebb@ucdavis.edu**