

HPLC mit biochemischer Detektion (BCD)

Methode der Wahl zum Screening auf biologisch aktive Substanzen

Die besondere Herausforderung des Wirkstoffscreenings besteht darin, aktive Substanzen in komplexen Extrakten schnell und sicher zu identifizieren. Hierzu wurde eine Vielzahl von High Throughput Screening (HTS)-Verfahren entwickelt. Diese basieren zumeist auf automatisierten Plate Reader-Assays, in denen die inhibitorische Aktivität bzw. Rezeptorbindungsfähigkeit oft fluorimetrisch oder photometrisch bestimmt wird. Um aktive Substanzen aus einem Gemisch zu identifizieren, muss dieses zunächst in einem separaten Arbeitsschritt chromatographisch fraktioniert werden. Das macht diese Methode nicht nur sehr arbeits-, zeit- und kostenintensiv, sondern birgt auch das Risiko, dass aktive Substanzen bei der Fraktionierung chemisch degradiert werden.

Bei der BCD wird die biologische Wirkung der eluierenden Substanzen direkt im Fluss der HPLC analysiert. Der HPLC wird ein continuous flow assay (CFA) nachgeschaltet, in dem das Eluat direkt mit dem Enzym bzw. dem Rezeptor reagieren kann. Das Funktionsprinzip soll am Beispiel einer LC-BCD Methode [1] zum Screening nach Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Inhibitoren näher erläutert werden (Abb. 1): Nach der HPLC-Trennung erfolgt eine Aufspaltung des Eluentenstromes. Ein Teil wird massenspektrometrisch analysiert, der andere Teil wird in den CFA geleitet. Hier wird dem Eluat zunächst das Enzym hinzugefügt. Es folgt eine beheizte Reaktionskapillare, in der die eluierenden Substanzen mit dem Enzym reagieren können. Nun wird ein mit einem Fluorophor markiertes Substrat zugesetzt, dessen Fluoreszenzaktivität nach der Umsetzung zum Produkt drastisch ansteigt. In der folgenden beheizten zweiten Reaktionskapillare wird das Substrat vom Enzym umgesetzt. Dies geschieht mit einer konstanten Umsatzrate (steady state), da die Reaktionszeit durch den kontinuierlichen Fluss und das Volumen der Reaktionskapillare vorgegeben ist. Die Konzentration des gebildeten Produktes wird anschließend über die Fluoreszenz des umgesetzten markierten Substrates bestimmt. Hierbei bildet der steady-state (50–80% Umsatz) der enzymatischen Reaktion die Basislinie des biochemischen Detektors (Abb. 2). Eluiert nun ein Inhibitor, so wird das Enzym gehemmt. Es wird eine geringere Konzentration des fluoreszierenden Produktes gebildet, was in einer Verringerung der Fluoreszenzintensität resultiert. Diese wird als negativer Peak im Chromatogramm des biochemischen Detektors sichtbar.

Die moderne Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermöglicht hoch aufgelöste Trennungen von komplexen Proben. Neben der bekannten Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (reversed phase, RP-LC), die insbesondere für gering und mittelpolare Analyten geeignet ist, hat sich inzwischen die hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) als geeignete Hochleistungstrennmethode auch für sehr stark polare Substanzgemische etabliert. Dank der gekoppelten Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist für beide Trennverfahren eine direkte Charakterisierung der separierten Analyten möglich. Eine Aussage über die biologische Aktivität der getrennten Substanzen kann auf diese Weise jedoch nicht getroffen werden. Viele wichtige Wirkstoffe für Medikamente wurden allerdings in natürlichen Proben, wie Extrakten aus Pflanzen oder Bakterienkulturen und Tiergiften entdeckt oder auf der Basis der gefundenen Leitstrukturen entwickelt. So stellen natürliche Extrakte auch weiterhin eine vielversprechende Quelle für neue Wirkstoffe dar und stehen im Mittelpunkt pharmazeutischer Forschung. Die biochemische Detektion (BCD) ermöglicht es, direkt die Aktivität der mit der HPLC getrennten Substanzen gegenüber einem Enzym(system) oder Rezeptor zu bestimmen.

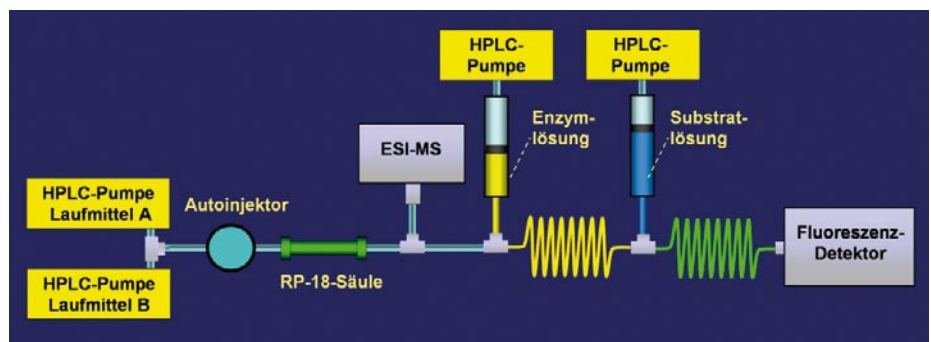


Abb. 1: Schema eines HPLC-BCD-Systems mit Fluoreszenzdetektion zum Screening nach Enzyminhibitoren

Korreliert man nun die im ESI-MS-Chromatogramm erhaltenen Peaks mit denen des BCD, so kann man direkt jene Signale identifizieren, die von eluierenden, inhibitorisch aktiven Substanzen hervorgerufen werden. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, ist es mit dieser Methode [1] möglich, z. B. aus einer komplexen Probe von Peptiden aus Milchproteinhydrolysat direkt in einem chromatographischen Lauf aktive Inhibitoren aufzutrennen und zu identifizieren.

Nach dem gleichen HPLC-BCD-Prinzip wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Screening-Methoden für Inhibitoren verschiedener Enzyme,

wie z. B. dem toxikologisch relevanten Phase-II-Enzym Gluthation-S-Transferase [2], entwickelt. Derzeitige Arbeiten konzentrieren sich auf das Screening nach Inhibitoren der Serinproteasen der Blutgerinnungskaskade.

Nicht für alle Enzyme sind die für die spektroskopische Detektion notwendigen markierten Substrate verfügbar. Dies limitiert das Einsatzgebiet der BCD mit Fluoreszenzdetektion. Ebenso birgt die Verwendung der künstlichen Substrate das Risiko eines unterschiedlichen Ansprechverhaltens des Enzyms im Vergleich zum physiologischen Substrat. Aus diesem Grund wurden LC-

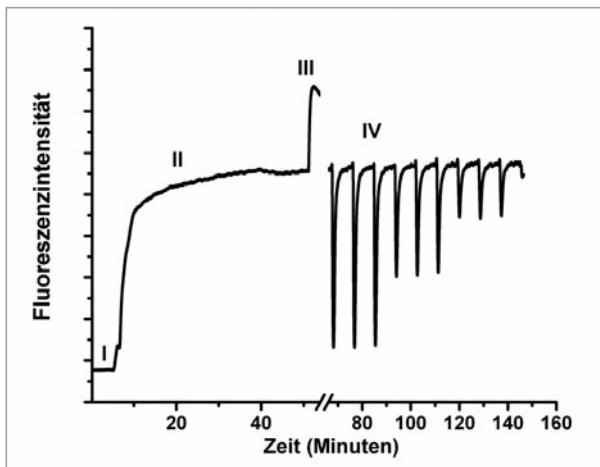


Abb. 2: Fluoreszenzsignal der BCD. I Signal des Substrats allein, II Kontinuierliche Zugabe des Enzymflusses, steady-state-Signal des Produktes, III Signal bei kompletten Umsatz des Substrates bei angehaltenem Fluss, IV Dreifache Injektionen eines Enzyminhibitors ohne Säulentrennung.

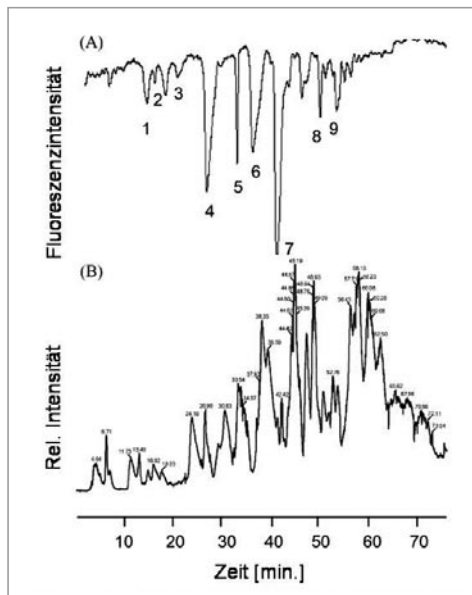


Abb. 3: HPLC-BCD-Analyse eines Hydrolysates von Milchproteinen (entnommen aus [1]) B Der Totalionenstrom (TIC) des ESI-MS-Signals. A Signal des BCD: Jeder negative Peak repräsentiert ein eluierendes, inhibitorisch aktives Peptid. Durch Korrelation mit dem MS-Signal können die aktiven Peptide identifiziert werden. Der schematische Aufbau des Instruments ist in Abbildung 1 dargestellt.

BCD Methoden mit MS-Detektion entwickelt. Hiermit können alle Enzymreaktionen, bei denen Massenänderungen bei der Überführung vom Substrat in das Produkt auftreten, anhand der massenspektrometrischen Detektion ihrer natürlichen Substrate und Produkte verfolgt werden.

In den letzten Jahren wurden HPLC-BCD-Screeningsysteme mit MS-Detektion z. B. für Acetylcholinesterase-Inhibitoren [3], die potentielle Wirkstoffe gegen Alzheimer darstellen, oder Cathepsin B [4] entwickelt. Hierbei werden parallel sowohl das natürliche Substrat des Enzyms und alle Produkte als auch die eluierenden Substanzen mittels ESI-MS detektiert. Eine Aufspaltung des Eluates erfolgt nicht (Abb. 4). Dieses erleichtert die Zuordnung der Peaks der Inhibitoren zu ihrem Signal in der BCD. Neben diesen Vorteilen hat die massenspektrometrische Detektion der BCD allerdings den Nachteil, dass nur flüchtige Puffersalze verwendet werden können. Einige Enzyme, wie beispielsweise das bereits erwähnte ACE, sind aber nur in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen aktiv.

Neben der Inhibition von Enzymen ist die Bindung an endogene Rezeptoren das zweite wichtige Wirkprinzip von Pharmazeutika und Giftstoffen. Insbesondere die Hormonwirkung von Fremdstoffen wird in der toxikologischen Forschung kontrovers diskutiert. Die Wirkung dieser Substanzen erfolgt hier z.B. durch Bindung an Östrogenrezeptoren. Auch hierfür konnte erfolgreich eine dem Enzyminhibitorenscreening ähnliche HPLC-BCD-Methode entwickelt werden, die die Bindungsfähigkeit und -stärke von Substanzen an den Östrogenrezeptor detektiert [5]. Hierbei wird dem Eluat statt eines Substrates Coumestrol als Rezeptorligand und Östrogenrezeptor

statt eines Enzyms zugesetzt. Der Coumestrol-Rezeptor-Komplex kann mit einem Fluoreszenz-Detektor bestimmt werden, da dieser eine deutlich höhere Fluoreszenz als freies Coumestrol zeigt. Eluiert nun eine aktive Substanz, wird Coumestrol vom Rezeptor verdrängt. Dies resultiert in einem negativem Peak im Signal des BCD. Dank der vorgeschalteten HPLC-Trennung kann die hormonelle Wirkung einzelner Substanzen auch hier direkt aus komplexen Gemischen bestimmt werden.

Dies unterstreicht erneut die Leistungsfähigkeit der HPLC-BCD-Methodik. Im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Techniken ist es nicht erforderlich, dass die zu analysierende Substanz rein vorliegt. Nach in vitro-Metabolisierung kann die Aktivität der Metabolite einer Substanz so direkt auf ihre biologische Wirksamkeit getestet und mit der Ausgangssubstanz verglichen werden. Damit konnten beispielsweise in einem HPLC-Lauf fünf aktive Metabolite des selektiven Östrogenrezeptormodulators Tamoxifen detektiert werden [5].

Die Detektion von Substanzen über ihre Wirkung eröffnet der HPLC-BCD auch eine Anwendung in der Rückstandsanalytik und Ökotoxikologie. So werden beispielsweise Wasserproben auf Rückstände von Acetylcholinesterase-Inhibitoren aus Pflanzenschutzmitteln mittels HPLC-BCD untersucht [6]. Hiermit können auch Verbindungen unbekannter Struktur, z. B. Abbauprodukte von chemischen Substanzen, empfindlich detektiert werden. Die Anwendung der HPLC-BCD verspricht nicht nur niedrige Nachweisgrenzen, sondern liefert unmittelbar Hinweise über die toxikologische Relevanz der Rückstände. Zur direkten Bestimmung ökotoxikologischer Parame-

ter werden in einem neuen Ansatz dem Eluat der HPLC sogar lebende einzellige Leuchtakterien zugesetzt, wobei deren Biolumineszenz das Signal der BCD bildet [7].

Nicht nur Inhibitoren und Rezeptorliganden können im Mittelpunkt des Interesses von Screenings stehen, sondern auch die Enzyme selbst: So ist bekannt, dass die toxische Wirkung von Schlangengift zum Teil auf enthaltene Enzyme zurückzuführen ist. Auch hier kann die BCD eingesetzt werden, um nach unbekanntem Enzymen zu suchen. Hierzu wird dem Eluat nach der Trennung das entsprechende Enzymsubstrat zugesetzt und dessen Umsetzung detektiert (Abb. 5). Mit der einzigen bisher publizierten Methode, die diesen Ansatz verfolgt, können nach Verdau von Cytochrom C die resultierenden Microperoxidasen detektiert und quantifiziert werden [8]. In aktuellen Arbeiten wird Schlangengift auf unbekannte proteolytische Aktivität gescreent. Als Trennmethode finden hierbei in Kombination mit der BCD auch Gelpermentationschromatographie und Ionenaustauschchromatographie Anwendung.

Ogleich es schon viele, routinetaugliche HPLC-BCD Methoden zum Screenen auf Inhibitoren und Rezeptorliganden gibt, kann die Entwicklung keineswegs als abgeschlossen betrachtet werden. Vor allem drei fundamentale Probleme gilt es zu lösen:

Denaturierende Wirkung von organischen Lösemitteln

Für die Trennung mittels RP-HPLC bzw. HILIC sind neben Wasser organische Lösungsmittel (LM) als Eluenten erforderlich. Acetonitril und Methanol

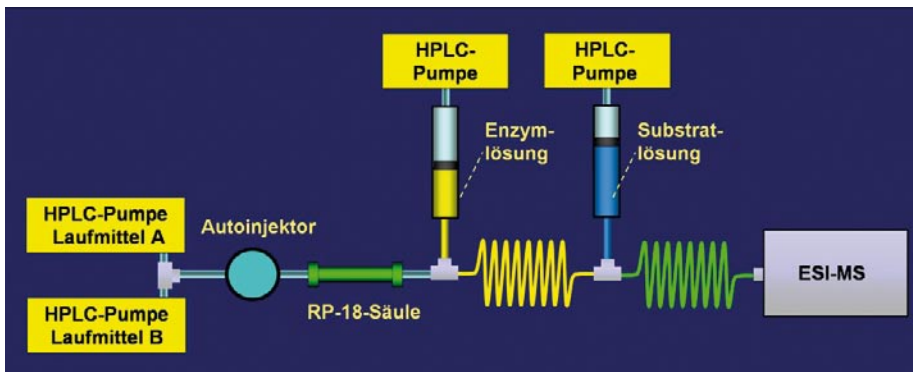


Abb. 4: Schema eines HPLC-BCD-Systems mit MS-Detektion zum Screening auf Enzyminhibitoren.

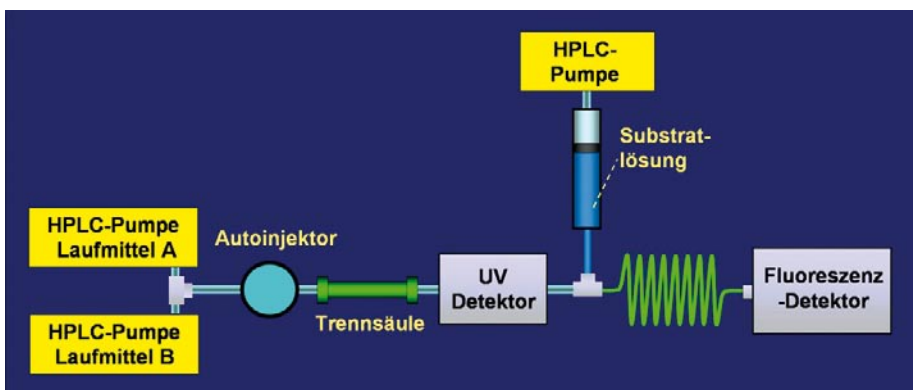


Abb. 5: Prinzipieller Aufbau eines HPLC-BCD-Systems mit Fluoreszenzdetektion zum Screening auf Enzymaktivitäten. Nach der Trennung mittels RP-LC, IEC oder GPC und UV-Detektion wird das Enzymsubstrat zugesetzt. Eluiert ein Enzym von der Säule, wird das Substrat zum fluoreszierenden Produkt umgesetzt. Es resultiert ein positiver Peak im Fluoreszenzdetektor.

wirken aber denaturierend auf die in der BCD eingesetzten Enzyme bzw. Rezeptoren. Besonders problematisch ist der für komplexe Proben unumgängliche Einsatz von Gradienten. Durch die variierenden Anteile von LM wird die Umsatz-/Bindungsrate der Enzyme und Rezeptoren kontinuierlich verändert. Ein Make-up Fluss mit einem Gegengradienten wurde deshalb bei vielen

Methoden [2] verwendet, um den Anteil des LM im BCD konstant auf geringem Niveau zu halten.

Von besonderer Bedeutung für die BCD sind daher „neue“ hochauflösende Trennmethode, die wenig oder kein LM benötigen. So wurde bereits die Hochtemperatur-Flüssigchromatographie (HTC) erfolgreich für die BCD zum Screening für Cathepsininhibitoren eingesetzt [9]. Vielverspre-

chend ist auch die Weiterentwicklung von Temperatur-responsiven Polymeren als stationäre Phasen, mit denen völlig auf den Einsatz organischer Lösungsmittel verzichtet werden kann.

Enzyme/Rezeptoren mit niedrigen Reaktionsgeschwindigkeiten

Viele Enzym-Rezeptorreaktionen verlaufen relativ langsam. Diese erfordern daher eine lange Reaktionszeit in der BCD und somit ein großes Volumen der Reaktionskapillare. Dieses kann aber nicht beliebig vergrößert werden, da ein großes Volumen nach der Säule aufgrund von Diffusion unweigerlich zur Peakverbreiterung führt. Eine Möglichkeit, dennoch lange Reaktionszeiten in der BCD bei geringer Peakverbreiterung zu erzielen, wurde erstmals von Fabel et al. [6] beschrieben. Hier wird der Fluss durch Luftblasen nach der Säulentrennung segmentiert. Ähnliche Verfahren sind seit vielen Jahren in kommerziell erhältlichen Continuous Flow-Analysatoren zur Wasseranalytik bewährt.

Hoher Enzym/Rezeptor- und Substratverbrauch

Da ein konstanter Fluss von Enzym/Rezeptor- und Substrat/Rezeptor-Lösungen erforderlich ist, resultiert daraus ein hoher Verbrauch an diesen Substanzen bei der BCD. Für teure Enzyme und Substrate können so hohe Betriebskosten bei der BCD entstehen. Die Verringerung der Flussrate des gesamten HPLC-BCD-Systems ist die nahe liegende und vielversprechendste Strategie, den Lösungsverbrauch und die Betriebskosten zu senken. Durch Kombination von Kapillar-HPLC und einem Reaktionschip konnte so beispielsweise die BCD von Cathepsininhibitoren erfolgreich minia-

turisiert werden [10]. Einen weiteren vielversprechenden Lösungsansatz stellt die Immobilisierung der Enzyme/Rezeptoren in einem Reaktor dar.

Fazit

Die HPLC-BCD ist eine leistungsfähige Methode für das Screening auf biologisch aktive Substanzen. Im Gegensatz zu allen anderen Methoden ermöglicht sie die Bestimmung der Aktivität, auch wenn die Substanzen nicht rein vorliegen. Die HPLC-BCD überwindet so das Problem falsch positiver Ergebnisse bei herkömmlichen HTS-Techniken, die zumeist auf Matrixbestandteile zurückzuführen sind.

Nicht nur beim Screening von natürlichen Proben, wie Extrakten, kann ihr Einsatz sinnvoll sein. Auch nach der Synthese von Wirkstoffen können aktive Verunreinigungen und Nebenbestandteile schnell aufgespürt werden.

Eine besondere Stärke der HPLC-BCD Methode besteht darin, dass keine zusätzlichen Instrumente außer einer HPLC-Anlage benötigt werden. Deshalb sollte ihr Einsatz immer dann erwogen werden, wenn die Reinheit der auf biologische Aktivität zu testenden Substanzen nicht gewährleistet werden kann.

Literatur

- [1] van Elswijk, D. A.; Diefenbach, O.; van der Berg, S.; Irth, H.; Tjaden, U. R., und van der Greef, J.: Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1020, 45–58 (2003)
- [2] Kool, J.; Eggink, M.; van Rossum, H.; van Liempd, S. M.; van Elswijk, D. A.; Irth, H.; Commandeur, J. N.; Meerman, J. H. und Vermeulen, N. P.: Online biochemical detection of glutathione-S-transferase P1-specific inhibitors in complex mixtures. *J Biomol Screen* 12, 396–405 (2007)
- [3] de Jong, C. F.; Derks, R. J.; Bruyneel, B.; Niessen, W. M. A. und Irth, H.: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J Chromatogr A* 1112, 303–310 (2006)
- [4] De Boer, A. R.; Letzel, T.; Van Elswijk, D. A.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; und Irth, H.: On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous-Flow Enzyme Assay Based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* 76, 3155–3161 (2004)
- [5] Kool, J.; Ramautar, R.; van Liempd, S. M.; Beckman, J.; de Kanter, F. J.; Meerman, J. H.; Schenk, T.; Irth, H.; Commandeur, J. N. und Vermeulen, N. P.: Rapid on-line profiling of estrogen receptor binding metabolites of tamoxifen. *J Med Chem* 49, 3287–3292 (2006)
- [6] Fabel, S.; Niessner, R. und Weller, M. G.: Effect-directed analysis by high-performance liquid chromatography with gas-segmented enzyme inhibition. *J Chromatogr A* 1099, 103–110 (2005)
- [7] Stolper, P.; Fabel, S.; Weller, M. G.; Knopp, D.; Niessner, R.: Whole-cell luminescence-based flow-through biodetector for toxicity testing. *Anal Bioanal Chem*, 390, 1181–1187 (2008)
- [8] Haselberg, R.; Hempen, C.; van Leeuwen, S. M.; Vogel, M. und Karst, U.: Analysis of microperoxidases using liquid chromatography, post-column substrate conversion and fluorescence detection. *J Chromatogr B* 830, 47–53 (2006)
- [9] de Boer, A. R.; Alcaide-Hidalgo, J. M.; Krabbe, J. G.; Kolkman, J.; van Emde Boas, C. N.; Niessen, W. M. A.; Lingeman, H. und Irth, H.: High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal Chem* 77, 7894–7900 (2005)
- [10] de Boer, A. R.; Bruyneel, B.; Krabbe, J. G.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A. und Irth, H.: A microfluidic-based enzymatic assay for bioactivity screening combined with capillary liquid chromatography and mass spectrometry. *Lab Chip* 5, 1286–1292 (2005)

► KONTAKT

Nils Helge Schebb

Dr. Martin Vogel

Prof. Dr. Uwe Karst

Institut für Anorganische und Analytische Chemie

Universität Münster

Tel.: 0251/83-33141

uk@uni-muenster.de

Dr. Jeroen Kool

Prof. Dr. Hubertus Irth

Faculty of Sciences, Department of Chemistry and

Pharmaceutical Sciences

Vrije Universiteit Amsterdam

Amsterdam, The Netherlands