

VU Research Portal

Miniaturized bioactivity screening of complex samples

Heus, F.A.H.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Heus, F. A. H. (2015). *Miniaturized bioactivity screening of complex samples*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse Samenvatting

Natuurlijke extracten spelen een steeds grotere rol als bron voor nieuwe medicijnen. Daarom heeft ook de farmaceutische industrie een grotere behoefte aan geavanceerde analytisch-chemische technologieën voor het screenen van deze complexe mengsels. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en een aantal toepassingen van geminiaturiseerde en geïntegreerde bioanalytische systemen die kunnen bijdragen aan deze behoefte. De hier beschreven systemen zijn gebaseerd op het principe van hoog-resolutie screening (HRS), waarin vloeistofchromatografie (LC) geïntegreerd wordt met een biochemische assay en (parallele) massaspectrometrie (MS). Dit kunnen we online doen, waarbij we (een deel van) het effluent van de LC naar een continue-flow bioassay voeren, of at-line, waarbij we het effluent met hoge resolutie fractioneren in een microtiterplaat (MTP). Detectie vindt in het eerste geval plaats met behulp van een LC-fluorescentie detector, in het tweede geval met een plaatlezer. Door deze systemen te miniaturiseren kunnen monsters met een klein volume worden gescreend. Na een algemene inleiding in de problematiek van de screening van natuurlijke extracten wordt het verrichtte onderzoek beschreven in drie secties.

Sectie 1 beschrijft de ontwikkeling van een geminiaturiseerde online setup waar nano-LC gekoppeld is met MS en een chip-gebaseerde bioassay. Hierdoor hebben we per analyse maar 5 µg (slangen)gif nodig voor de screening. Sectie 2 beschrijft at-line setups, waarbij micro-LC gekoppeld is met MS en een fractiecollector waarmee 2-min fracties worden verzameld in 384- of 1536-well MTPs. Hiermee kunnen we voor de screening enzym- en bioassays uitvoeren die een langere incubatietijd nodig hebben. Bij deze setups was micro-LC gekoppeld is aan een MS en een fractie collector (met 2 seconden per fractie). Sectie 3 beschrijft de at-line fractionering (6 seconden per fractie), waarbij de hoog-lipofiele (bioactieve) componenten niet met LC maar met gaschromatografie (GC) gescheiden worden en gefractioneerd in een 96-well MTP. In dit geval was de screeningsbioassay een cel-gebaseerde dioxine-receptorassay.

Sectie 1: Geminiaturiseerde hoog-resolutie screening

Omdat er de afgelopen decennia steeds minder medicijnen worden ontdekt door middel van *high-throughput* screening (HTS) maakt het screenen van natuurlijke producten (NPS) een comeback. Dit wordt traditioneel gedaan door dieren- of plantenextracten te fractioneren met LC, gevolgd door een MTP bioassay. Door de complexiteit van deze extracten worden de fractionering en bioassays herhaald, totdat de bioactieve stof geïdentificeerd kan worden met behulp van MS en/of NMR. Dit tijdrovende proces is niet praktisch als vele extracten moeten worden gescreend.

In plaats van de traditionele benadering kan HRS worden gebruikt, een online screening strategie die de laatste 10 jaar is ontwikkeld in ons laboratorium. In HRS worden de componenten in het complexe mengsel gescheiden met LC en meteen geïncubeerd in de bioassay (meestal met parallele MS detectie. Omdat HRS voortdurend de biochemische en MS detectie monitort, kunnen de bioassay-signalen direct met de MS signalen gecorreleerd worden. Dit zorgt voor een vereenvoudigde identificatie van slecht gescheiden liganden die, als er op minuten-schaal gefractioneerd wordt, in één fractie terecht gekomen waren. Een nadeel van HRS is de relatief grote consumptie van sample en bioassay componenten. Aan dit nadeel kan tegemoet gekomen worden door het complete screeningsysteem te miniaturiseren.

Dit kan door nano-LC te implementeren (400 nL/min) met een chip-gebaseerde bioassay. De helft van het nano-LC effluent werd gemengd en geïncubeerd in een fluorescentie enhancement bioassay met een infusie van 5 μ L/min. Om deze geminiaturiseerde assay gevoelig te kunnen uitlezen werd er een confocale LED-geïnduceerde fluorescentiedetector ontwikkeld met een *bubble-cell* (150 micrometer inwendige diameter), waarin het LED licht werd gecollimeerd. Geëmitteerd licht werd gedetecteerd in een fotomultiplicatorbuis. De andere helft van het nano-LC effluent werd gekoppeld aan de MS via een nano-ionenbron. De geminiaturiseerde setup werd vervolgens toegepast op een bioassay die het acetylcholine bindingsproteïne bevat als receptor, met in-huis gesynthetiseerde DAHBA als het fluorescente tracer ligand. In **hoofdstuk 2** werden een klein aantal moleculen geanalyseerd als een *proof-of-principle* studie. Hierbij was de split naar de MS nog niet geïmplementeerd, maar werd het totale LC effluent aan de bioassay gekoppeld via een UV detector. Hierbij werd vastgesteld dat de gevoeligheid adequaat was en dat de bioactiviteitsparameters correleerden met de literatuur. **Hoofdstuk 3** beschrijft de toepassing van de setup op neurotoxische slangengiften. Deze slangengif proteomen bevatten zgn. *three-finger toxins* (3TFXs, 60–80 aminozuren \sim 7 kDa), die bekende liganden zijn van ionkanalen, zoals de nicotine-acetylcholine receptoren (nAChRs). AChBP, een water-oplosbare homoloog van de neuronale $\alpha 7$ nAChR, was daarom een toepasbare target. Door de implementatie van de split naar de MS detectie was (voorlopige) peptide-identificatie mogelijk door de nominale massa (gecorrigeerd voor zwavelbruggen) te correleren met de literatuur via Uniprot. De geminiaturiseerde setup werd geëvalueerd met de sterke $\alpha 7$ ligand, α -bungarotoxin (α -BTX), met en zonder het gif van de slang *Vipera ammodytes* gif, een hemotoxisch gif dat naar verwachting geen nAChR liganden bevat. De detectielimiet voor α -BTX was 2 ng (en 50 ng voor MS detectie). In het *Vipera ammodytes* gif werd echter toch een (zwakke) AChBP ligand ontdekt. Vervolgens werd het gif van de slangen *Dendroaspis jamesoni kaimosae*, *Naja annulifera* en *Naja nivea* geprofileerd. Dit leverde 19 liganden op, waarvan 11 terug waren te vinden in de literatuur als cytotoxine, cardiotoxine of een zgn. *orphan* toxine. Hiermee werd laten zien dat de setup zeer efficiënt meerder liganden in een complex mengsel kan screenen, terwijl maar enkele μ g gif nodig is. De gif-monsters werden niet behandeld voor de analyse, aangezien dit de bioaffiniteit van de toxines kan beïnvloeden. Gevriesdroogde giften werden opgelost in 5% acetonitril, 0.1% trifluorazijnzuur en 40 μ M nicotine, wat diende om signalen van de biochemische assay en de MS detectie met elkaar uit te lijnen. Meestal werd slechts 5 μ g gif-extract geïnjecteerd om de laag-affiniteit binders te kunnen identificeren, gevolgd door een verdunningsreeks (tot 0.2 μ g) om ook de hoog-affiniteit liganden te analyseren. **Hoofdstuk 4** beschrijft hoe de geminiaturiseerde HRS setup werd toegepast in een uitgebreidere NPS werkwijze als een efficiënt en gevoelig pre-screening hulpmiddel. Dit werd gedemonstreerd door de bioactieve componenten van *Naja mossambica mossambica* gif met behulp van LC-MS-gestuurde fractionering te isoleren. De fractionering werd getriggerd door het isotooppatroon en de m/z van de AChBP liganden die gedetecteerd waren met de geminiaturiseerde HRS. Na het re-screenen van de pure toxines (die in de literatuur waren geclassificeerd als cytotoxinen) werd de identiteit van de peptiden bevestigd met MALDI-MS sequentie-analyse (na een digestie met trypsine). De $\alpha 7$ nAChR affiniteit van deze peptiden werd gevalideerd door een radioligand bindingsassay met membranen van neuroblastoma cellen, die $\alpha 7$ nAChR expresseren. Bij één van de geïsoleerde (cyto)toxines werd hierbij een

lage bindingsaffiniteit waargenomen, hetgeen nog niet eerder in de literatuur werd beschreven. In **hoofdstuk 5** wordt laten zien dat de geminiaturiseerde HRS setup ook een nAChR ligand kan identificeren van in het gif van *Conus textile*, een proteome dat bestaat uit ~1000 (kleinere) bioactieve peptiden (15 tot 30 aminozuren). Ook werd gedemonstreerd dat de setup gebruikt kan worden om kleine moleculen te screenen door de analyse van huidafscheiding van de padden *Bufo marinus* en *Bufo alvarius*. Hierbij werd de op basis van MS voorgestelde moleculestructuur bevestigd met behulp van NMR. $\alpha 7$ nAChR radioligand bindingsassay bevestigde de bioactiviteit van vier tryptamine liganden en van twee stereoïde liganden.

Sectie 2: Geminiaturiseerde at-line hoog-resolutie screening

Een post-column continue-flow bioassay heeft ook beperkingen, zoals de beperkte tijd die een ligand-eiwit incubatie heeft in het systeem (maximaal ~ 2 min), wat de screening van cel-gebaseerde bioassays en membraan-gebonden eiwit targets uitsluit aangezien alleen eiwitten kunnen worden gescreend die een ligand snel omzetten of binden met lage dissociatie. Deze beperkingen kunnen worden omzeild door post-kolom micro-fractionering in 96-, 384- of 1536-well MTPs (gevolgd door conventionele plaatlezeruitlezing). Als deze fractionering plaatsvindt met hoge resolutie, kunnen deze at-line systemen nog steeds een goede correlatie bieden tussen de response van de bioassay en de parallelle MS detectie. Een bijkomend voordeel is de mogelijkheid om oplosmiddelen en zuren uit het LC effluent te laten verdampen (zoals mierenzuur, methanol en acetonitril). Hierdoor kunnen ook bioassays worden gebruikt die hier gevoelig zijn voor dergelijke componenten. **Hoofdstuk 7** laat het potentieel zien in een at-line bioassay voor proteïne kinase A remmers in natuurlijke extracten, die eerst werden gescheiden met micro-LC en gefractioneerd in een 1536-well MTP. **Hoofdstuk 8** beschrijft een in-huis gebouwd fractioneringssysteem voor nanospotter technologie, die werd ontwikkeld en toegepast in hoge-resolutie bioactiviteit profilering van mengsels met een at-line AChBP bioassay in een 1536-well MTP.

Section 3: GC-gebaseerde HRS screening

Tot dusver werd online en at-line HRS alleen uitgevoerd in combinatie met LC-gebaseerde scheidingen. Dit hoofdstuk beschrijft de ontwikkeling van GC-gebaseerde HRS. Dit kan belangrijk zijn in een aantal toepassingsgebieden, bijvoorbeeld in *effect-directed* analyse (EDA) van de milieumonsters met (zeer lipofiele) polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) en/of pesticiden. **Hoofdstuk 9** beschrijft post-kolom hoog-resolutie fractionering van verbindingen gescheiden door GC. Dit werd bereikt door het koppelen van de uitlaat van de GC kolom aan een continue-flow drager-oplosmiddel stroom, die vervolgens wordt gefractioneerd in een 96-well MTP (6 s per fractie). Het ontworpen systeem werd in detail gekarakteriseerd en vervolgens toegepast op de analyse van een PAK mengsel. Na GC scheiding en post-kolom microfractionation werd een cel-gebaseerd DR-LUC bioassay toegepast op de fracties om binding van de PAKs te bevestigen. De bioactieve PAKs werden geïdentificeerd met GC-MS analyse.

Toekomstige ontwikkelingen

Miniaturisering is de sleutel tot toekomstige *drug discovery*, waarbij men baat heeft bij minder verbruik van assaycomponenten en monster en van verhoogde gevoeligheid en automatisering. At-line HRS strategieën zijn een duidelijk voorbeeld en toepassing van deze miniaturiseringstrend, omdat daarmee een ruimere toepasbaarheid van bioassays (met name ook cel-gebaseerde bioassays) en betere robuustheid wordt bereikt. Nu in nano-HTS miniaturisering van bioassays in 384-, 1536- en zelfs 3456-well MTPs (met respectievelijk ~ 10.000 tot slechts 200 cellen) wordt ontwikkeld, kan met de hier-beschreven fractioneringstechnologieën een hoog-resolutie fractionering na micro-LC of nano-LC ook gemakkelijk worden geïmplementeerd. Geminiaturiseerde online HRS benaderingen zouden toepasbaar kunnen worden als *lab-on-a-chip* technologie in een volgend ontwikkelingsstadium.