

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Mgr. Martin Růžička

Studium (bio)molekulových interakcí a enzymových reakcí
kapilárními elektroforetickými metodami

Study of (bio)molecular interactions and enzymatic reactions
by capillary electrophoretic methods

Disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Václav Kašička, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 25.05.2018

.....
Mgr. Martin Růžička

Prohlášení spoluautorů

Jménem spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Martin Růžička rozhodujícím způsobem přispěl ke vzniku odborných publikací I a II a významně se podílel na publikaci III, které jsou základem této disertační práce. Provedl většinu experimentů a významně se podílel i na jejich plánování, interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne 25.05.2018

.....
RNDr. Václav Kašička, CSc.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., vedoucímu Laboratoře elektromigračních metod ÚOCHB AV ČR, ve které byly provedeny všechny experimenty této disertační práce. Především vyjadřuji poděkování za odborné vedení, věcné komentáře a rady, i za celkovou podporu.

Děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za jeho souhlas s funkcí školitele této disertační práce.

Můj velký dík patří také všem spolupracovníkům Laboratoře elektromigračních metod ÚOCHB AV ČR za veškerou pomoc, rady a příjemné pracovní prostředí.

Můj dík rovněž patří rodině za podporu při studiu.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (granty P206/12/0453, 15-01948S, 13-32974S, 13-17224S, a 13-19213S), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 6294/2012), EMBO Installation Grant 2329, Akademií věd České Republiky (RVO 61388963), Marie Curie Career Integration Grant Project 304154 a granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, LK11206 a LO1302.

Abstrakt

Nekovalentní interakce se podílejí na většině procesů v živých organismech. Sílu interakce mezi (bio)molekulami lze charakterizovat pomocí vazebné konstanty příslušných komplexů, k jejímuž stanovení je možno využít řadu fyzikálně-chemických metod. Z nich metody kapilární elektroforézy disponují několika přednostmi: (1) interakce probíhají mezi volnými molekulami ve vodném roztoku bez nutnosti jejich immobilizace, (2) krátká doba analýzy, (3) velmi malá spotřeba zkoumaných molekul, a (4) snadná automatizace analýz.

V rámci této disertační práce byly vyvinuty metody afinitní kapilární elektroforézy s částečným plněním (PF-ACE) pro zkoumání interakce mezi oligonukleotidy dvouvláknové DNA a dobře charakterizovaným interkalátorem ethidium bromidem jako modelovou sloučeninou. Následně byly v těchto podmínkách stanoveny vazebné konstanty komplexů oligofenylenových derivátů s DNA oligonukleotidy.

Metoda PF-ACE byla optimalizována pro sledování enantioselektivních interakcí mezi helquaty a vybranými chirálními kyselými aromatickými analyty. Bylo identifikováno několik látek, jejich enantiomery byly pomocí helquatů jakožto chirálních selektorů odděleny.

Kapilární elektroforéza byla použita jako separační analytická metoda při sledování štěpení peptidových substrátů rhomboidními proteasami. Metoda byla optimalizována pro kvantifikaci produktu enzymové reakce. Byly identifikovány peptidy vhodné pro vývoj fluorescenčně značených substrátů rhomboidních proteas.

Klíčová slova

afinitní kapilární elektroforéza, částečné plnění, DNA, enzym, ethidium bromid, helquaty, chirální separace, kapilární elektroforéza, oligofenyleny, oligonukleotidy, peptidy, vazebné konstanty

Abstract

Non-covalent interactions participate in majority of processes in living organisms. The strength of interaction between (bio)molecules can be characterized by binding constants of respective complexes, which can be determined by variety of physico-chemical methods. From these methods, capillary electrophoresis features several advantages: (1) interactions takes place in aqueous solutions between free molecules without necessity of their immobilization, (2) short analysis time, (3) small consumption of analyzed compounds, and (4) easy automation of analyses.

Within this dissertation thesis, methods of partial-filling affinity capillary electrophoresis (PF-ACE) were developed for study of interactions between double-strand DNA oligonucleotides and well characterized intercalator ethidium bromide as a model compound. Subsequently, binding constants of oligophenylene derivatives complexes with DNA oligonucleotides were determined.

The PF-ACE method was optimized for study of enantioselective interactions between helquats and selected chiral acidic aromatic analytes. Several compounds whose enantiomers were separated using helquats as chiral selectors were identified.

Capillary electrophoresis was applied as a separation analytical method for monitoring of peptide substrate cleavage by rhomboid proteases. The method was optimized for quantification of enzyme reaction product. Peptides suitable for development of fluorescent-labeled substrates of rhomboid proteases were identified.

Keywords

affinity capillary electrophoresis, binding constants, capillary electrophoresis, chiral separations, DNA, enzyme, ethidium bromide, helquats, oligonucleotides, oligophenylenes, partial-filling, peptides

Obsah

1 Úvod.....	8
1.1 Studium (bio)molekulových interakcí.....	8
1.2 Metody měření asociačních konstant komplexů.....	10
1.2.1 Spektrofotometrické absorpční a fluorescenční metody.....	11
1.2.2 Izotermická titrační kalorimetrie.....	12
1.2.3 Nukleární magnetická rezonance.....	13
1.2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	14
1.2.5 Chromatografie.....	15
1.2.6 Elektroforéza.....	17
1.2.7 Ostatní metody.....	17
1.3 Kapilární elektromigrační metody.....	17
1.3.1 Instrumentace.....	18
1.3.2 Elektroforetická pohyblivost.....	21
1.3.3 Elektroosmotický tok.....	22
1.3.4 Vliv teploty.....	26
1.3.5 Vliv základního elektrolytu.....	27
1.3.6 Disperzní jevy.....	29
1.4 Módy afinitní kapilární elektroforézy.....	30
1.4.1 Nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážné směsi.....	32
1.4.2 Imunoafinitní kapilární elektroforéza.....	33
1.4.3 Dynamická rovnovážná afinitní kapilární elektroforéza.....	34
1.4.4 Afinitní kapilární elektroforéza s částečným plněním.....	35

1.4.5	Vícenásobné nanesení ligandu a analytu.....	36
1.4.6	Frontální analýza.....	36
1.4.7	Vakantní afinitní kapilární elektroforéza.....	37
1.4.8	Kapilární afinoforéza.....	37
1.4.9	Afinitní kapilární elektroforéza na imobilizovaných ligandech.....	38
1.5	Princip a aplikace afinitní kapilární elektroforézy s částečným plněním.....	39
1.6	Odvození rovnic pro afinitní kapilární elektroforézu s částečným plněním.....	40
2	Témata studia (bio)molekulových interakcí a enzymových reakcí.....	47
2.1	Interakce DNA s interkalátory a nízkomolekulárními ligandy.....	47
2.2	Interakce helquatů s chirálními analyty.....	48
2.3	Sledování enzymové aktivity rhomboidních proteas.....	51
3	Cíle práce.....	52
4	Materiál a metody.....	53
4.1	Chemikálie.....	53
4.2	Analyzované sloučeniny.....	53
4.2.1	Oligonukleotidy, ethidium bromid a oligofenylenové deriváty.....	53
4.2.2	Helquaty a chirální analyty.....	55
4.2.3	Peptidy štěpené rhomboidními proteasami.....	62
4.3	Instrumentace.....	64
4.4	Pokryvání vnitřní stěny křemenné kapiláry.....	65
5	Výsledky a diskuse.....	67
5.1	Interakce DNA s ethidium bromidem a oligofenylenovými deriváty.....	67
5.1.1	Charakterizace studovaných látek.....	67
5.1.2	Volba experimentálních podmínek.....	70

5.1.3	Stabilita duplexu DNA.....	72
5.1.4	Stabilita vnitřního povlaku kapiláry a elektroosmotického toku.....	73
5.1.5	Optimalizace metody PF-ACE pro měření interakce DNA-ethidium bromid.....	76
5.1.6	Měření interakce DNA s oligofenylenovými deriváty.....	77
5.1.7	Výpočet vazebných konstant komplexů metodou PF-ACE.....	78
5.1.8	Výsledné charakteristiky studovaných interakcí.....	80
5.2	Interakce helquatů s chirálními analyty.....	86
5.2.1	Volba experimentálních podmínek.....	86
5.2.2	Výsledné charakteristiky studovaných interakcí.....	88
5.3	Sledování enzymového štěpení peptidových substrátů.....	101
5.3.1	Volba experimentálních podmínek.....	101
5.3.2	CE analýzy peptidových substrátů a produktů jejich štěpení rhomboidními proteasami.....	102
6	Závěr.....	108
7	Seznam použité literatury.....	110
8	Přílohy.....	125

Seznam použitých zkratek a symbolů

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (affinity capillary electrophoresis)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
BNP	1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfát (1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CFACE	kontinuální frontální analýza kapilární elektroforéza (continuous frontal analysis capillary electrophoresis)
DATA	kyselina 2,3-di- <i>p</i> -anisoyl-D/L-vinná (2,3-di- <i>p</i> -anisoyl-D/L-tartaric acid)
DBTA	kyselina 2,3-dibenzoyl-D/L-vinná (2,3-dibenzoyl-D/L-tartaric acid)
DDM	dodecyl maltosid (dodecyl maltoside)
DMSO	dimethylsulfoxid (dimethyl sulfoxide)
dsDNA	dvojvláknová DNA (double stranded DNA)
DTTA	kyselina 2,3-di- <i>p</i> -toluoyl-D/L-vinná (2,3-di- <i>p</i> -toluoyl-D/L-tartaric acid)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
EtBr	ethidium bromid (ethidium bromide)
FACE	frontální analýza kapilární elektroforéza (frontal analysis capillary electrophoresis)
HPC	hydroxypropylcellulosa (hydroxypropylcellulose)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
ITC	izotermická titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
LIF	laserem indukovaná fluorescence (laser induced fluorescence)

MALDI	desorpční ionizace laserem s pomocnou maticí (matrix-assisted laser desorption/ionisation)
MIP	molekulárně vtištěný polymer (molecularly imprinted polymer)
miRNA	mikro RNA
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NECEEM	nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážné směsi (non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
OPD	oligofenylenové deriváty (oligophenylene derivatives)
PF-ACE	afinitní kapilární elektroforéza s částečným plněním (partial-filling affinity capillary electrophoresis)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecylsulfate)
SPR	metoda rezonance povrchových plasmonů (surface plasmon resonance)
ssDNA	jednovláknová DNA (single stranded DNA)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza (vacancy affinity capillary electrophoresis)

Symboly

$[A]$	rovnovážná molární koncentrace analytu
$[AL]$	rovnovážná molární koncentrace komplexu analyt-ligand
$[L]$	rovnovážná molární koncentrace ligandu
$[L_{\text{tot}}]$	celková molární koncentrace ligandu
A	analyt

AL	komplex analyt-ligand
c	koncentrace ligandu
E	intenzita elektrického pole
I	elektrický proud
K_b	vazebná (asociační, stabilitní) konstanta komplexu
K_d	disociační konstanta komplexu
L	ligand
L_{det}	efektivní délka kapiláry od injekčního konce k detektoru
L_L	délka zóny ligandu
L_{tot}	celková délka kapiláry
L_v	délka úseku kapiláry obsahující základní elektrolyt
m	hmotnost
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	látkové množství ligandu
P	elektrický příkon
R	molární plynová konstanta
R	elektrický odpor
r	vnitřní poloměr kapiláry
T	termodynamická teplota
t_0	migrační čas analytu pro nulovou délku zóny ligandu
t_{det}	migrační čas analytu v PF-ACE experimentech
t_{fill}	čas plnění kapiláry zónou ligandu od injekčního konce po detektor
t_i	migrační čas analytu i
U	elektrické (separační) napětí

v	objem
v_i	rychlost pohybu iontu
ΔG	změna Gibbsovy energie
ΔH	změna enthalpie
ΔS	změna entropie
Δt	změna migračního času analytu
$\mu_{app,i}$	zdánlivá (aparentní) elektroforetická pohyblivost (mobilita) i -tého iontu
$\mu_{eff,i}$	efektivní elektroforetická pohyblivost (mobilita) i -tého iontu
μ_{EOF}	elektroforetická pohyblivost (mobilita) elektroosmotického toku (EOF)

1 Úvod

1.1 Studium (bio)molekulových interakcí

Interakce molekul může mít za určitých podmínek podobu reaktivní, při které dochází ke vzniku či zániku kovalentní vazby a vzniku nových chemických individuí. Při nereaktivních interakcích nenastává překryv molekulových orbitalů a dochází ke vzniku molekulových komplexů. Za stabilitu komplexu je zodpovědný souhrn příspěvků elektrostatických interakcí, vodíkových vazeb, hydrofobních interakcí a Van der Waalsových sil.

V biologických systémech jsou různě specifické nekovalentní interakce všudypřítomné. Vazba substrátů a inhibitorů s enzymy, interakce hormonů a léčiv s receptory, párování nukleobází, regulace genové exprese a působení léků na všechny tyto interakce představují jen několik vybraných příkladů takových interakcí. Výzkum nekovalentních interakcí je proto naprosto zásadní pro porozumění procesům probíhajícím v živých organismech. Tyto poznatky jsou následně základem pro vývoj biomedicínských a biotechnologických aplikací.

Asociaci analytu A a ligandu L s jednoduchou stechiometrií 1:1 za vzniku komplexu analyt-ligand AL je možno popsat rovnicí:



Sílu interakce (afinitu mezi interakčními partnery) lze charakterizovat pomocí vazebné (rovnovážné, stabilitní, asociační, komplexační) konstanty K_b definované rovnicí:

$$K_b = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (2)$$

v níž $[A]$, $[L]$ a $[AL]$ jsou rovnovážné molární koncentrace analytu, ligandu a komplexu analyt-ligand. Případně lze sílu interakce vyjádřit jako disociační konstantu K_d reakce opačné (3), definované rovnicí (4),



$$K_d = \frac{[A][L]}{[AL]} \quad (4)$$

Uvedené stabilitní (disociační) konstanty komplexů jsou pak označovány za zdánlivé (aparentní) asociační (disociační) konstanty. Od termodynamické konstanty se liší aproximací termodynamických aktivit jednotlivých složek jejich molárními koncentracemi. Čím je hodnota asociační konstanty vyšší, respektive disociační konstanty nižší, tím vyšší je afinita mezi ligandem a analytem.

Změnu Gibbsovy energie ΔG při vzniku komplexu lze určit z rovnovážné konstanty K_b podle vztahu:

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (5)$$

kde je R molární plynová konstanta a T termodynamická teplota. Z průběhu závislosti stabilitní konstanty komplexu na teplotě lze na základě vztahů (5) - (7) určit další parametry komplexační reakce, reakční enthalpii ΔH a reakční entropii ΔS :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (6)$$

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

Z hodnot reakční enthalpie ΔH a reakční entropie ΔS je možné usuzovat na podíly příspěvků jednotlivých typů nevazebných interakcí na vazebnou konstantu [1].

Termodynamické stabilitní konstanty komplexů jsou závislé pouze na teplotě, aparentní stabilitní konstanty jsou ovlivněny metodou měření rovnovážných konstant.

V literatuře se lze setkat s několika odlišnými značeními interakčních partnerů v závislosti na oblasti výzkumu autorů publikace. V chirálních separacích se používá typické označování analyt-selektor (A-S), ve farmakologických studiích léčivo-protein (drug-protein, D-P), obecněji případně léčivo-cíl (drug-target, D-T), nebo léčivo-receptor (drug-receptor, D-R). Běžné je též označení ligand-receptor (L-R), ligand-cílová molekula (ligand-target, L-T) a podobně. V textu této práce je používáno označení ligand (L) a analyt (A) pro zkoumané interakční partnery, přičemž jako analyt je označována látka aplikovaná jako analyzovaný vzorek, a ligand je interakční partner přítomný v separačním prostředí dané metody.

1.2 Metody měření asociačních konstant komplexů

Metody určení asociačních (disociačních) konstant komplexů lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. První skupinou jsou metody výpočetní, které se pokoušejí aplikovat teoretické nástroje kvantové chemie k výpočtu celkové energie molekul volných a vázaných interakčních partnerů. Rozdíl těchto energií odpovídá ΔG reakce vzniku komplexu a aplikací rovnice (5) lze vyjádřit příslušnou K_b . Vzhledem k výpočetní náročnosti a značným odchylkám teoretických výsledků od experimentálních dat se *ab initio* výpočty pro popis interakcí molekul v prostředí rozpouštědla neuplatňují příliš často. Místo nich jsou upřednostňovány výpočetně jednodušší metody molekulové dynamiky, molekulový docking, semi-empirické metody a databázové zdroje [2,3].

Druhou skupinou jsou experimentální metody měření asociačních (disociačních) konstant komplexů, využívající širokou škálu fyzikálně-chemických metod.

Experimentální metody lze rozdělit na metody využívající separaci a metody neseparační. Mezi metody separační se řadí plynová a kapalinová chromatografie, elektroforéza, rovnovážná dialýza, ultrafiltrace a ultracentrifugace. Příkladem neseparačních metod jsou kalorimetrické metody, spektroskopické metody (*UV-Vis* spektrofotometrie, fluorimetrie, optická rotační disperze, cirkulární dichroismus, Ramanova spektroskopie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, aj.), elektrochemické metody, nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS), metoda rezonance povrchových plasmonů (surface plasmon resonance, SPR). Viz přehledné články a související reference [4–6].

Většina experimentálních metod je založena na stanovení poměru koncentrací volných složek a komplexu rovnovážné směsi analyt-ligand dle definičního vztahu (2). Část z nich využívá separační techniky pro oddělení volných složek a komplexu a jejich následnou kvantifikaci. Následuje výčet nejpoužívanějších metod pro stanovení stabilitních konstant komplexů a některých dalších parametrů interakce.

1.2.1 Spektrofotometrické absorpční a fluorescenční metody

Jejich principem je změna absorpčních či fluorescenčních vlastností studované látky vyvolaná vznikem komplexu této látky s interakčním partnerem [7]. Typickým příkladem je interkalátor ethidium bromid (EtBr), jehož fluorescence po vzniku komplexu s DNA výrazně vzroste [8].

Použití této techniky principiálně vyžaduje, aby v molekulách alespoň jedné ze zkoumaných látek docházelo k výrazným změnám spektrálních vlastností. Tato podmínka často nebývá splněna. V takovém případě se tato technika používá v kompetitivním módu, kdy jsou spektrofotometricky aktivní molekuly – značky

(próby) vytěsňovány z vazby v předem charakterizovaném komplexu ligand-značka vazbou studovaného interakčního partnera. Příkladem je studium interakce léčiva fluoxetin s DNA, kompetující s vazbou methylenové modři použité jakožto fluorescenční značky [9]. Další příklad, využívající jako značku EtBr, byla studie interakce cyanazinu s DNA [10].

1.2.2 Izotermická titrační kalorimetrie

Metoda izotermická titrační kalorimetrie (ITC) je založena na přímém měření tepla uvolňovaného (případně spotřebovávaného) při vzniku komplexu mezi ligandem a jeho interakčním partnerem. Její výhodou je vysoká univerzálnost, v biochemických aplikacích umožňuje sledování protein-proteinových interakcí i komplexů malých molekul a iontů s biomakromolekulami. Lze ji uplatnit i při studiu skládání proteinů, kde v rámci polypeptidového řetězce jedné molekuly proteinu vznikají nevazebné intramolekulární interakce, principiálně podobné interakci dvou proteinových molekul.

ITC je metoda kvantitativní, v jediném titračním experimentu umožňuje stanovit hodnotu K_b a změnu enthalpie ΔH , v určitých případech i vazebnou stechiometrii komplexu n [11]. Změřením změny enthalpie ΔH při různých teplotách umožňuje vypočítat změnu entropie ΔS , a Gibbsovu energii ΔG pomocí vztahů (5) a (6). Provedením série experimentů při různých teplotách lze stanovit tepelnou kapacitu C_p , z jejíhož průběhu lze usuzovat na vliv příspěvků jednotlivých typů nevazebných interakcí ke stabilitě komplexu [12]. Nevýhodou ITC je poměrně vysoká spotřeba studovaných látek ve srovnání s jinými technikami [13].

Příkladem vazby iontu kovu na molekulu proteinu studovanou metodou ITC je interakce měďnatých kationtů s lysozymem [14]. Interakcemi organických molekul

s nukleovými kyselinami se zabývá práce [15], zkoumající interakci proflavinu s G-kvadruplexovou DNA, a práce [16] studující interakce RNA s alkaloidy. Další příklady jsou uvedeny v přehledných člancích [17–19].

1.2.3 Nukleární magnetická rezonance

Určování stabilitních konstant komplexů metodami nukleární magnetická rezonance (NMR) je založeno na sledování vybraných parametrů (chemický posun určitých vodíkových atomů, relaxační rychlost, difúzní koeficienty), kterými se odlišuje detekovaný signál komplexu od signálů volných interakčních partnerů. Stabilitní konstantu nelze zjistit z jediného experimentu, vyžaduje analýzu série roztoků o konstantní koncentraci analytu, např. proteinu, a proměnlivé koncentraci ligandu. Sledovaný NMR parametr (nejčastěji změna chemického posunu) vůči koncentraci ligandu lze vynést jako vazebnou izotermu. Stabilitní konstanta komplexu byla dříve z této závislosti počítána po převedení do linearizovaného tvaru. Dnes však Scatchardův výnos, Benesiův-Hildebrandův výnos, či Hillův výnos nejsou považovány za zcela správné a výpočet se provádí přímo pomocí nelineární regresní analýzy [20,21].

Nevýhodou NMR metod jsou vysoké nároky na spotřebu experimentálního materiálu (v řádu jednotek až desítek mg na jeden experiment), což komplikuje analýzu vzácných či drahých vzorků. Proto se NMR při studiu interakcí biomakromolekul uplatňuje přednostně v případě snadno dostupného zdroje studovaných látek (např. při rekombinantní přípravě proteinů). Dalším negativem je poměrně dlouhá doba analýz nezbytná pro řešení komplikovaných vysokomolekulárních struktur, jako jsou komplexy proteinů či nukleových kyselin. Samostatnou kapitolou je pak samotná nákladnost pořízení a provozu NMR instrumentace.

V oblasti výzkumu biochemicky relevantních interakcí byla NMR nejčastěji aplikována na studium komplexů proteinů s nízkomolekulárními ligandy, interakcí protein-protein, protein-nukleové kyseliny a interakcí biomolekul s vhodnými izotopy anorganických kationtů (^{23}Na). NMR současně umožňuje sledovat konformační změny vyvolané vazbou interakčního partnera, projevující se například jako allosterická modulace enzymů, kooperativita a rekrutace. Podrobnější výčet lze nalézt v přehledných člancích [22–25].

1.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) se uplatňuje ve výzkumu biomolekulárních interakcí díky technikám umožňujícím šetrnou ionizaci analyzovaných biomolekulárních komplexů, jako je desorpční ionizace laserem s pomocnou maticí (matrix-assisted laser desorption/ionisation, MALDI) a zejména ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation, ESI), jejíž speciální modifikace je nejčastěji využívanou technikou při ionizaci vodných roztoků zkoumaných komplexů [5,26]. Výhodou MS je vysoká citlivost a rychlost analýzy, a schopnost přímého získání informace o vazebné stechiometrii. Nevýhodou MS je instrumentální a finanční náročnost této techniky.

Interakce molekul během MS analýzy probíhá v plynné fázi ve vysokém vakuu, což má vliv na sílu jednotlivých příspěvků stabilizujících komplex. Převedením vzorku z nativního vodného prostředí do vakua jsou řádově posíleny vazebné příspěvky zprostředkované elektrostatickou a van der Waalsovou interakcí, které již nejsou oslabovány odpařeným rozpouštědlem. Na druhou stranu nepřítomnost vodného roztoku

vede k destabilizaci hydrofobních interakcí, jejichž hnací silou jsou entropické změny v organizaci molekul rozpouštědla solvatujících studované látky.

Rovnovážný roztok interakčních partnerů je přiváděn na elektrosprej, kde dochází k odpaření rozpouštědla a ionizaci rozpuštěných látek. Při vhodné koncentraci je vzdálenost mezi molekulami interakčních partnerů v roztoku dostatečně velká, takže v průběhu ionizačního procesu vzniká výrazně více kapiček, než odpovídá počtu molekul studovaných látek. Tím je statisticky zajištěno, že většina molekul volných interakčních partnerů i molekul komplexu se nachází v samostatných kapičkách odpařovaného rozpouštědla. Z tohoto důvodu během ESI již nedochází ke vzniku nových komplexů a detekované zastoupení volných molekul interakčních partnerů i jejich komplexu odpovídá situaci v nativním roztoku. Samotný komplex je díky šetrné ionizaci obvykle zachován a jeho stabilita se následkem převedení do vakua obvykle zvyšuje. Pomocí tohoto „zachycení snímku“ (snapshot) je přímo kvantifikováno zastoupení volných a vázaných interakčních partnerů v roztoku, což umožňuje určit vazebnou konstantu dle rovnice 2. Získané hodnoty vazebných konstant dobře odpovídají hodnotám získaným pro vodné roztoky jinými technikami [27].

Naopak, hodnoty disociačních energií komplexů stanovené tandemovými MS technikami a z nich vypočtené stabilitní konstanty jsou relevantní pro izolované molekuly ve vakuu a řádově se odlišují od stabilitních konstant pro komplexy v roztoku [28].

1.2.5 Chromatografie

Chromatografické metody spadají do skupiny separačních metod, a jsou založeny na rozdílech v interakci zkoumaných látek se složkami stacionární a mobilní fáze. Ke

stanovení vazebných konstant se používají metody afinitní chromatografie, ve které je ligand imobilizován na stacionární fázi a analyt je přítomen v mobilní fázi. Mezi tyto techniky spadají imunoafinitní chromatografie, borátová afinitní chromatografie, lektinová afinitní chromatografie, afinitní chromatografie s imobilizovanými kovovými ionty, molekulárně imprintované polymery (MIP), afinitní chromatografie s využitím aptamerů aj.

Kritickým krokem afinitní chromatografie je imobilizace ligandu. V případě použití ligandu biologického původu (protilátky, enzymy, transportní proteiny, lektiny a jiné selektivně vázající proteiny) je potřeba zohlednit skutečnost, že imobilizace proteinu může zásadně změnit jeho konformaci a tím i narušit jeho biologickou aktivitu, v tomto případě především sílu a specifitu vazby s analytem.

Afinitní chromatografie se využívá v preparativním módu především k extrakci a purifikaci látek ze složitých biologických směsí, je však možno ji aplikovat v analytickém módu ke stanovení rovnovážných vazebných konstant a rychlostních konstant reakce. Principem stanovení vazebných konstant je sledování změn retenčního času analytu při průchodu kolonou způsobenou interakcí s ligandem. Tuto techniku lze využít i v kompetitivním módu, kdy je analyzována série roztoků s konstantní koncentrací analytu a měnícími se koncentracemi dobře charakterizované próby.

K bližší charakterizaci povahy interakce mezi analytem a ligandem lze dále využít pozorování změny retenčního času analytu v závislosti na složení mobilní fáze (změna pH, iontové síly, teploty a polarity rozpouštědla). Podrobněji v přehledném článku [29] a vnořených referencích.

1.2.6 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda využívající pohybů iontů v kapalném prostředí v elektrickém poli. Průkopnické práce na poli elektroforézy provedl Tiselius ve 30. letech 20. století [30]. Průchod elektrického proudu roztokem je zdrojem tepla a ohřevu roztoku v separačním prostoru. Aby se zabránilo rozšiřování zón separovaných látek způsobené tepelnou konvekcí v roztoku, používají se media jako agarosa nebo polyakrylamid.

Elektromigrační metody lze využít ke studiu vazebných konstant komplexů v módech afinitní elektroforézy v gelu a afinitní kapilární elektroforézy (ACE). Nejtypičtější metodou je tzv. mobility shift assay, ve které je do základního elektrolytu (nebo do gelu) přidán ligand o různé koncentraci, a jsou sledovány změny migračních vlastností analytu v závislosti na koncentraci ligandu. Vazebná konstanta je vypočítána ze změn efektivní mobility analytu vztažené na koncentraci ligandu v základním elektrolytu [31–33]. Elektromigrační metody disponují mnoha technikami stanovení vazebných konstant, které jsou podrobněji popsány v kapitole 1.4 na straně 30.

1.2.7 Ostatní metody

Mezi další metody stanovení vazebných konstant komplexů lze zařadit rovnovážnou dialýzu, ultrafiltraci, elektrochemické metody a další techniky [34].

1.3 Kapilární elektromigrační metody

Přenesením elektroforézy do otevřených kapilár o malém průměru (typicky 25 – 100 μm) jsou problémy způsobené Jouleovým teplem značně redukovány. V první řadě je procházející proud díky malému průřezu kapiláry velmi malý a vznikající teplo díky

velkému poměru plochy k objemu dobře odváděno. Dále je prostor kapiláry díky svému malému průřezu přirozeně antikonvektivní. Běžné aparatury pro kapilární elektroforézu umožňují aplikaci vysokých intenzit elektrického pole, což vede ke krátkým dobám analýzy, typicky 5 – 20 minut. Separační účinnost obvykle dosahuje stovek tisíc teoretických pater, což je o řád více než běžné chromatografické metody.

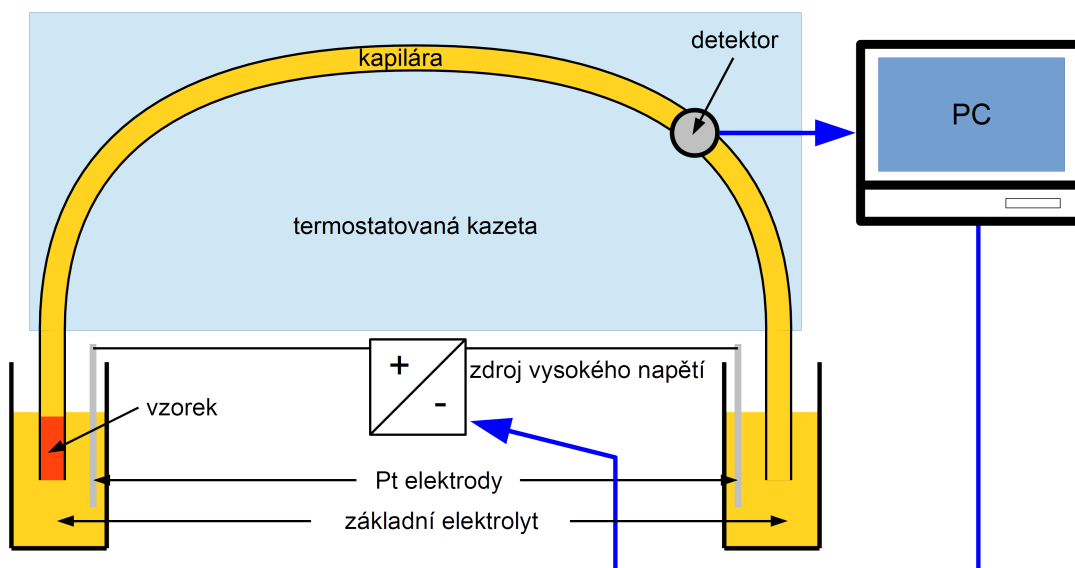
Z výše uvedených metod se kapilární elektromigrační metody vyznačují několika dalšími přednostmi. Těmi jsou především vysoká účinnost separace, nízká spotřeba analytu a ligandu, rychlost analýzy a přítomnost interakčních partnerů ve volném roztoku se snadnou kontrolou jejich koncentrace [35]. ACE dále nevyžaduje perfektní čistotu studovaných partnerů, naopak směs několika látek může být analyzována zároveň v jednom experimentu [36,37]. Analýzy mohou být prováděny ve vodném [13,38], nevodném [39] a smíšeném hydro-organickém prostředí [40–42].

Ačkoliv je princip separace odlišný od chromatografických metod, na základě vnější podobnosti s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (high-performance liquid chromatography, HPLC), i z historických důvodů (přechod pracovníků z kapalinové chromatografie k elektroforéze), přebrala kapilární elektroforéza část pojmového a analytického aparátu z chromatografie.

1.3.1 Instrumentace

Instrumentace pro CE metody je relativně jednoduchá. Schéma aparatury je zobrazeno na Obr. 1. Separačním prostorem je otevřená kapilára o malém vnitřním průměru (25 – 100 μm), která je naplněna elektricky vodivým roztokem – tzv. základním elektrolytem (background electrolyte, BGE). Kapilára je nejčastěji

zhotovena z taveného křemene (SiO_2) a pokryta vnějším polyimidovým povlakem, který zajišťuje ohebnost a mechanickou odolnost kapiláry.



Obr. 1 Schéma aparatury pro kapilární elektromigrační metody. Přístroj se skládá z otevřené kapiláry, ponořené na obou koncích do elektrodových nádobek se základním elektrolytem. Do nich je pomocí platinových elektrod přivedeno stejnosměrné napětí z vysokonapěťového zdroje, které v kapiláře vytvoří elektrické pole způsobující elektroforetickou migraci nabitých částic v roztoku.

Tavený křemen splňuje několik nároků kladených na vlastnosti kapiláry: Je dobrý elektrický izolant, umožňuje aplikovat silná elektrická pole s intenzitou až 1000 V/cm. Je transparentní pro širokou škálu vlnových délek používaných v UV-Vis spektrofotometrii. Mimo SiO_2 se používají méně často i jiné materiály, jako je např. teflon [43] či polyakrylát [44]. Inherentní vlastností křemenných kapilár po vystavení vodnému prostředí BGE je vznik silanolových skupin SiOH , které mohou disociovat a způsobovat tak záporný náboj na vnitřním povrchu kapiláry, vedoucí ke vzniku

elektroosmotického toku (electroosmotic flow, EOF) (podrobněji v sekci 1.3.3 na straně 22). K ovlivnění EOF, a často rovněž k omezení sorpce analyzovaných látek, se vnitřní povrch kapilár modifikuje stacionárními nebo dynamickými povlaky.

Oba konce kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných BGE. Kromě kapiláry jsou do nádobek ponořeny i platinové elektrody, kterými je do systému přiváděno stejnosměrné napětí z vysokonapěťového zdroje. Izolační vlastnosti materiálů umožňují aplikovat vysoké napětí v řádu desítek kV.

Elektrodové nádobky s BGE, nádobky s promývacími roztoky a vzorky jsou umístěny v karuselu či nosiči umožňujícím automatizované manipulace a zavádění nádobek do měřicí pozice. Důležitou součástí přístroje je systém umožňující aplikaci pneumatického tlaku nad hladinu roztoku v nádobkách. Toho se využívá k plnění a promývání kapiláry, k aplikaci vzorku do kapiláry i k hydrodynamické asistenci elektroforetické separace.

On-line optická detekce signálu probíhá ve velmi krátkém úseku kapiláry, kde je odstraněn vnější polyimidový povlak, v tzv. detekčním okénku. Detekční okénko je umístěno v optické soustavě v cestě paprsku mezi zdrojem a detektorem záření. Hlavními metodami optické detekce jsou UV-Vis spektrofotometrie a laserem indukovaná fluorescence (LIF). Nevýhodou použití kapilár s malým vnitřním průměrem je krátká optická dráha paprsku, která je příčinou relativně nízké citlivosti UV-Vis detekce v CE metodách.

Alternativní metodou detekce migrujících látek je bezkontaktní konduktometrie [45]. Tato metoda je vhodná pro detekci látek, které je obtížné detekovat spektrofotometricky v UV-Vis oblasti (typicky anorganické ionty).

Univerzální i specifickou metodou detekce v CE metodách je hmotnostní spektrometrie (MS). Zajišťuje relativně nejvyšší citlivost detekce a zároveň umožňuje určovat M_r a strukturu analyzovaných látek. Instrumenty lze propojit v on-line módu, tzv. CE-MS, kdy výstup z kapiláry je zaveden přímo do vstupu hmotnostního spektrometru. Off-line uspořádání spočívá ve frakcionaci výstupu z kapiláry (např. nanášením frakcí na MALDI destičku) s následnou MS analýzou těchto frakcí.

1.3.2 Elektroforetická pohyblivost

Je-li nabitá částice vystavena elektrickému poli, začne na ni působit elektrická síla, jejíž velikost je přímo úměrná velikosti náboje částice a intenzitě elektrického pole. Pokud je částice elektrickou silou uvedena v pohyb, začne na ni v opačném směru působit síla odporu prostředí. Pro nabitou částici v roztoku je tato síla definována hydrodynamickým odporem, který je dán rychlostí pohybu iontu, jeho velikostí a tvarem, a viskozitou prostředí. Za ustálených podmínek jsou obě působící síly v rovnováze a ion se pohybuje konstantní rychlostí \vec{v}_i . Tato rychlost je pro danou částici charakteristická. Po normalizaci na jednotkovou intenzitu pole je označována jako elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ . Rychlost pohybu iontu \vec{v}_i lze vyjádřit vztahem:

$$\vec{v}_i = \vec{E} \cdot \mu_i \quad (8)$$

kde \vec{E} je intenzita elektrického pole a μ_i je pohyblivost (mobilita) daného iontu [46].

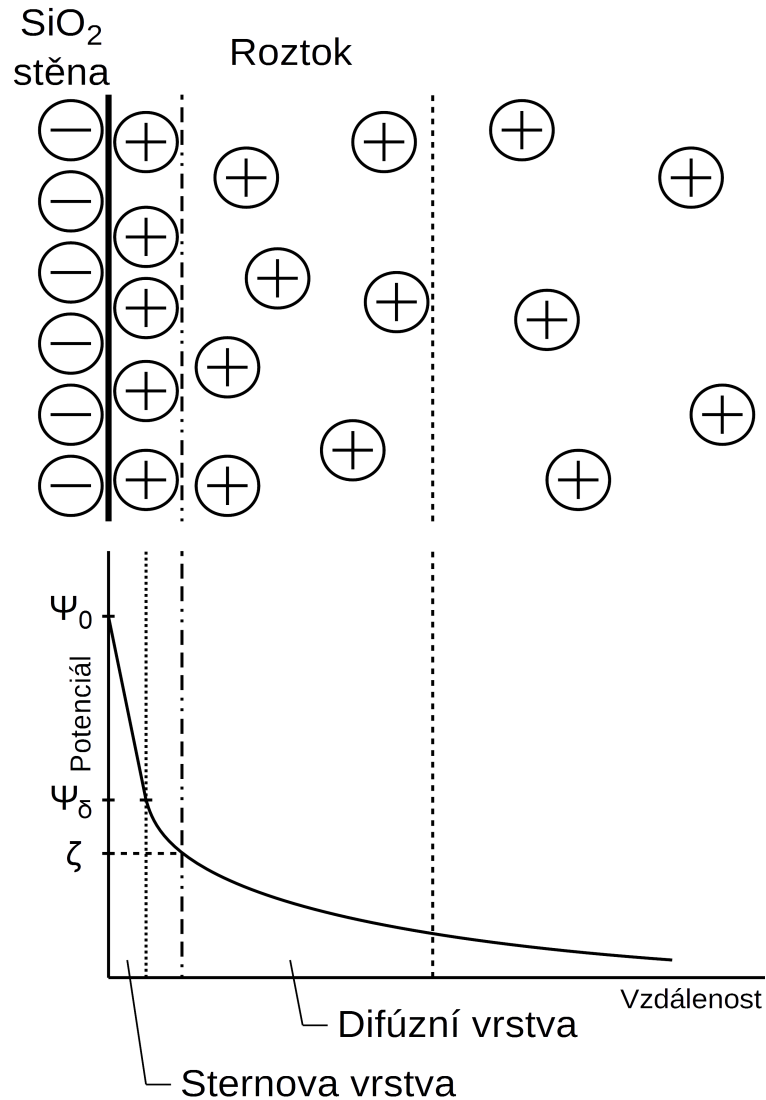
Rozdíly v pohyblivostech částic lze využít k jejich elektromigrační separaci za účelem jak analytickým, tak preparativním. Molekuly slabých elektrolytů se v roztoku ve stavu dynamické rovnováhy mohou vyskytovat v několika populacích o různém náboji, přičemž z hlediska elektroforézy se makroskopicky projevují tzv. efektivním

nábojem (vážený průměr nábojů všech populací) a s ním související efektivní mobilitou. Volbou vhodného složení BGE lze ovlivnit efektivní náboj analytů, jež jsou slabými elektrolyty, a využít rozdíly v efektivních mobilitách k elektroforetické separaci směsi analytů.

1.3.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF) je častý průvodní jev kapilární elektroforézy ovlivňující výslednou rychlost pohybu všech složek v kapiláře. Projevuje se jako celkový tok roztoku uvnitř kapiláry vyvolaný působením elektrického pole, který kontinuálně unáší nabitě i nenabitě složky roztoku stejnou rychlostí.

Principem jevu je elektrostatický náboj stěny kapiláry, který v přítomnosti BGE vyvolá ustavení elektrické dvojvrstvy, jíž lze kvantitativně popsat elektrokinetickým potenciálem, zvaným též ζ -potenciál. V případě křemenné kapiláry mohou silanolové skupiny Si-OH disociovat ($pK_a \doteq 2-4$) a vnitřní povrch kapiláry získá záporný náboj. K nabitě stěně kapiláry jsou elektrostaticky přitahovány kationty elektrolytu a vzniká gradient v jejich rozložení uvnitř kapiláry, viz obrázek 2 na straně 23. V bezprostřední blízkosti stěny jsou kationty vázány pevně v tzv. Sternově vrstvě. Se vzrůstající vzdáleností jsou kationty vázány volněji v tzv. difúzní vrstvě. V této oblasti je koncentrace kationtů vyšší než ve zbytku objemu roztoku kapiláry. Působení elektrického pole vyvolá jejich pohyb ke katodě, přičemž strhávají k pohybu i zbylý volný roztok v celém objemu kapiláry [47,48].



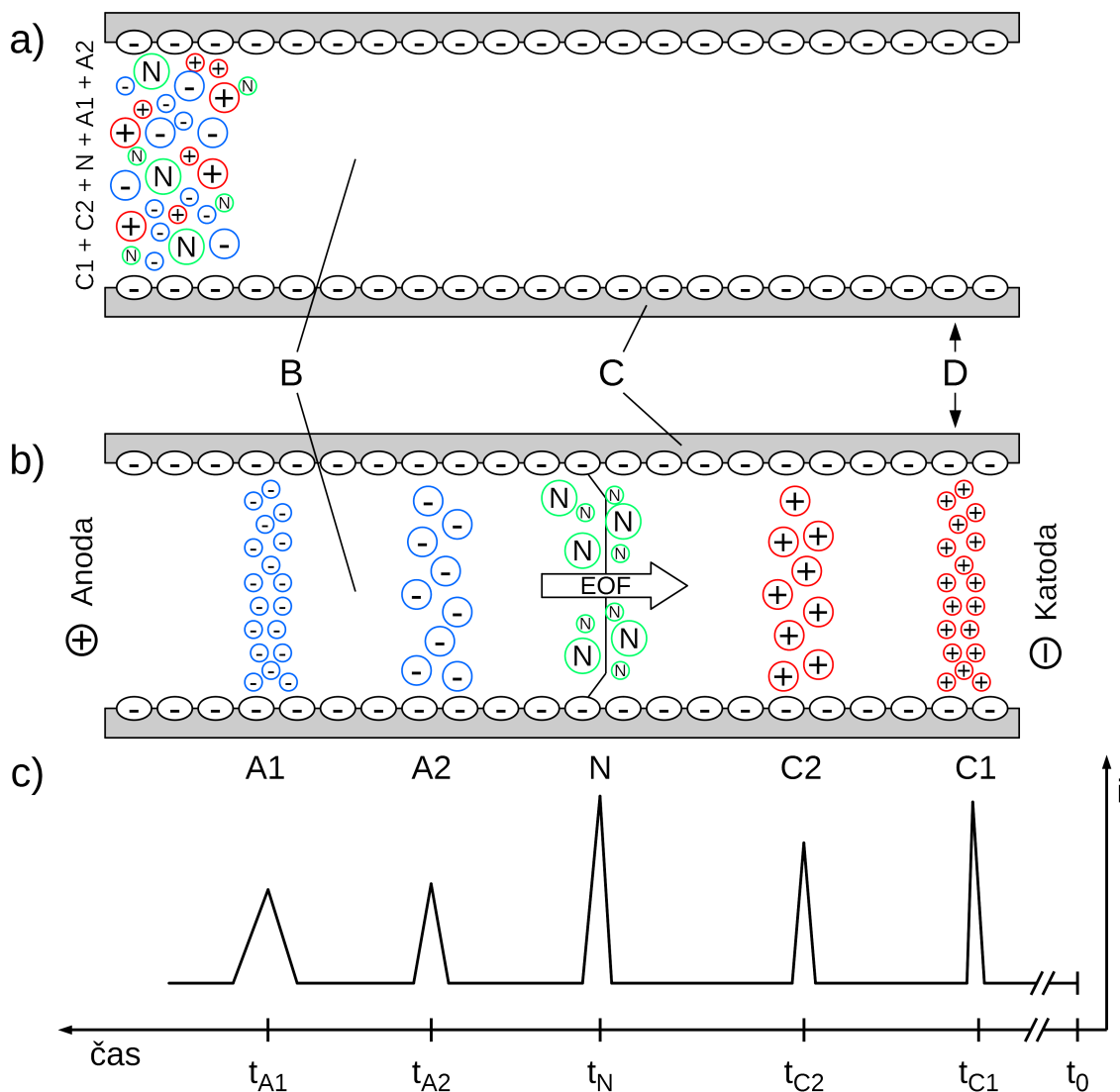
Obr. 2 Elektrická dvojvrstva, která vzniká v blízkosti povrchu křemenné kapiláry v důsledku disociace silanolových skupin. Schématické znázornění gradientu distribuce kationtů v roztoku v blízkosti záporně nabitě stěny kapiláry (horní obrázek) a grafický výnos závislosti potenciálu na vzdálenosti od stěny kapiláry (dolní obrázek). ζ , elektrokinetický potenciál; ψ_0 , povrchový potenciál; ψ_δ , Sternův potenciál.

Elektroosmotický tok se od hydrodynamického laminárního toku liší tím, že jeho rychlostní profil je kolmý na stěnu kapiláry. Naproti tomu tlakem vyvolaný hydrodynamický tok, který je typický pro HPLC, vykazuje parabolický profil rychlostí

proudění kapaliny [49]. Rychlost elektroosmotického toku závisí na pH základního elektrolytu (disociaci silanolových skupin) a případných modifikacích kapilární stěny. Pohyblivost EOF může dosáhnout hodnot řádově srovnatelných s pohyblivostí malých iontů nebo i vyšších, tudíž mohou být na detektoru pozorovány i anionty. Zdánlivá mobilita iontu pozorovaná během experimentu, $\mu_{app,i}$, je dána součtem vlastní efektivní pohyblivosti daného iontu, $\mu_{eff,i}$, a pohyblivosti EOF, μ_{EOF} , popsané vztahem:

$$\mu_{app,i} = \mu_{eff,i} + \mu_{EOF} \quad (9)$$

EOF v mnoha případech přispívá k pozitivním atributům CE metod. Díky uvedení celkového objemu roztoku základního elektrolytu do pohybu mohou být směrem k detektoru unášeny elektricky neutrální molekuly a též některé ionty migrující opačným směrem [50]. Separace kladně nabitých, neutrálních a záporně nabitých analytů v jednom experimentu je ilustrována na obrázku 3, str. 25.



Obr. 3 Separční princip kapilární zónové elektroforézy s využitím elektroosmotického toku. Analyzovaná směs (vzorek) je tvořena dvěma druhy kationtů C1 a C2 o identickém náboji, a různé velikosti ($C2 > C1$). N označuje neutrální molekuly unášené EOF. A1 a A2 jsou anionty s identickým nábojem a liší se velikostí ($A2 > A1$). B – vnitřní prostor kapiláry naplněný základním elektrolytem (BGE), C – záporně nabitá stěna kapiláry, D – pozice detektoru. a) Uspořádání na začátku experimentu – všechny látky jsou přítomny ve směsi v krátké zóně na začátku kapiláry. b) Pozice zón jednotlivých analytů v průběhu elektroforézy. c) Schématicky znázorněný elektroforegram. t_0 , čas počátku experimentu ($t_0 = 0$); t_{C1} , t_{C2} , t_N , t_{A2} , t_{A1} , migrační časy příslušných složek vzorku; i , intenzita signálu detektoru.

1.3.4 Vliv teploty

Průchod elektrického proudu kapilárou je zdrojem Jouleova tepla, které působí zvýšení teploty uvnitř kapiláry. Se vzrůstající teplotou narůstá kinetická energie molekul a tím i pohyblivost iontů, což vede ke zvýšení elektrické vodivosti elektrolytu. Při vyšší teplotě dochází v průběhu separace k vyšší podélné difúzi analytů, která vede k nežádoucímu rozšiřování jejich zón (píků). Další veličina závislá na teplotě je viskozita, která ovlivňuje hydrodynamický odpor migrujících iontů. Pokles viskozity vlivem zvýšení teploty se projevuje zvýšením mobility analytů. Teplota je proto důležitý parametr ovlivňující elektroforetické separace a její stabilita je nezbytná pro udržení konstantních experimentálních podmínek.

Stabilní teplota se nejčastěji zajišťuje pomocí aktivního chlazení co největší části kapiláry proudícím vzduchem nebo chladicí kapalinou. Jelikož jsou afinitní interakce poměrně citlivé na změny teploty v rozsahu několika málo stupňů, které vedou k výrazným změnám termodynamických parametrů těchto interakcí [51], kontrola teploty vyžaduje i sledování ohřevu elektrolytu vyvolaného průchodem elektrického proudu. V praxi se produkce Jouleova tepla (elektrický příkon P) omezuje snížením separačního napětí (U), a tím i procházejícího proudu (I), neboť platí $P = U \cdot I = U^2 / R$. Bylo experimentálně zjištěno, že příkon nižší než 0,3 W na metr délky chlazené křemenné kapiláry (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 375 μm) vede ke zvýšení vnitřní teploty kapiláry o méně než 1°C oproti teplotě chladicího média [52,53], což je v mnoha případech dostatečně nízká odchylka umožňující její zanedbání.

1.3.5 Vliv základního elektrolytu

Volba složení základního elektrolytu zásadním způsobem ovlivňuje úspěšnost a kvalitu elektroforetických separací [54,55]. Hlavní parametry jsou následující:

Iontová síla

Iontová síla ovlivňuje především vodivost BGE. Zvýšením iontové síly při stejném vloženém napětí dochází k zvýšení procházejícího proudu, a tím i produkovaného Jouleova tepla. Jelikož vysoká teplota se negativně projevuje větší disperzí zón analytu a zhoršuje kvalitu a reprodukovatelnost experimentů, je vhodné volit BGE se spíše nižší iontovou silou. Iontová síla ovlivňuje rovněž sílu mezimolekulových interakcí a má vliv na stabilitu a konformaci bio(makro)molekul.

Volba pH

Hodnota pH BGE je zásadní parametr ovlivňující náboje všech slabých a amfoterních elektrolytů v systému. Je-li směs analytů tvořena slabými nebo amfoterními elektrolyty, lze vhodnou volbou pH docílit jejich elektroforetické separace. Při studiu interakce molekul biologického původu je nutné volit podmínky blízké fyziologickým, v opačném případě nemají získané vazebné konstanty komplexů biologickou relevanci. BGE je proto většinou tvořen pufrem s pufračním maximem blízko zvoleného pH, který by měl zajistit stabilní podmínky v průběhu celého elektroforetického experimentu.

Volba elektrolytů

Molekuly elektrolytů tvořících BGE rovněž významně ovlivňují elektroforetické separace. Prvním parametrem je mobilita příslušných iontů tvořících BGE, která se v kombinaci s mobilitou analytu může projevit jako nežádoucí elektromigrační disperze (viz kap. 1.3.6). Častými složkami pufrů jsou slabé organické kyseliny a báze, které mají díky své relativně vyšší molekulové hmotnosti (a s ní souvisejícím větším hydrodynamickým odporem iontu) ve srovnání s anorganickými ionty nižší mobility a tedy i nižší molární vodivosti. Tím je při stejné iontové síle zajištěna nižší vodivost roztoku, díky čemuž je nižší i procházející proud a ohřev Jouleovým teplem.

Dále mohou látky tvořící BGE vstupovat do interakce s migrujícími analyty (např. boráty mohou interakcí se sacharidy přispívat k lepší separaci těchto látek) a ovlivňovat stabilitu komplexů (např. hořečnaté ionty ovlivňují stabilitu komplexů DNA s dalšími molekulami). Při studiu mezimolekulových interakcí mohou též komponenty BGE vstupovat jako kompetitory do vazby mezi zkoumanými látkami, a tím ovlivnit měřené stabilitní konstanty komplexů [56].

Polarita rozpouštědla

Elektroforetické separace nejčastěji probíhají ve vodných roztocích BGE, ale lze je provádět i v nepolárních a hydroorganických rozpouštědlech, pokud to vyžaduje charakter zkoumaných látek a interakcí. Přítomnost organického rozpouštědla ovlivňuje viskozitu prostředí, jeho elektrické vlastnosti (elektrickou permitivitu), pH, ionizaci, solvataci a rozpustnost analytů a další parametry mající vliv na průběh separace.

1.3.6 Disperzní jevy

Existuje několik jevů, které negativně ovlivňují kvalitu elektroforetické separace a projevují se rozšiřováním zón analytu.

Difúze

Difúze je termodynamicky hnaný jev, při kterém molekuly látky z prostředí o vyšší koncentraci samovolně pronikají do prostředí s nižší koncentrací. S rostoucí teplotou se zvyšuje rychlost neuspořádaného pohybu částic a tím i zrychluje proces difúze. Difúze je zodpovědná za gaussovské rozšiřování zóny analytu v průběhu separace. Výhodou kapilární elektroforézy je relativně krátká doba experimentu, což přispívá k nižšímu rozšiřování zón difúzí. Aktivní chlazení kapiláry a nízká vodivost BGE dále pomáhají udržet konstantní teplotu uvnitř kapiláry a kontrolovanou rychlost difúze.

Adsorpce na stěnu kapiláry

Některé látky mají tendenci sorbovat se na stěnu kapiláry, což se ve výsledném elektroforegramu projevuje výrazným chvostováním píků příslušných analytů. Tento jev je častý u látek hydrofobní povahy a makromolekul, které mají tendenci nespecificky interagovat se stěnou kapiláry. U nejčastěji používaných křemenných kapilár jejich záporně nabitý povrch elektrostaticky přitahuje kationické analyty. V závislosti na kinetice této interakce se adsorpce může projevit v odlišné míře pro různé analyty. Při rychlé kinetice sorpce a desorpce je interakce se stěnou kapiláry prakticky nepozorovatelná, naopak při pomalé disociaci jsou tvary píků výrazně deformované, v extrémních případech může být sorpce nevratná a analyt nemusí být detekován vůbec.

K omezení adsorpce lze použít vhodnou volbu podmínek a složení BGE. Dynamický povlak stěn kapiláry látkami silně se sorbujícími na stěnu kapiláry umožňuje omezit sorpci analyzovaných látek. Pro omezení adsorpce hydrofobních látek se často do BGE přidávají různé detergenty.

Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze je jev charakteristický pro elektromigrační procesy [57,58]. Jedná se o nelineární efekt, který se projevuje trojúhelníkovým tvarem píku v elektroforegramech. Jeho příčinou je lokální změna vodivosti a tím i intenzity elektrického pole v prostoru zóny migrujícího analytu, kdy se frontující či chvostující část zóny pohybuje jinou rychlostí vlivem mírně odlišné intenzity elektrického pole. Je závislý na hodnotách pohyblivosti analytů a elektrolytů v BGE, iontové síle a koncentracích analytů v migrujících zónách.

1.4 Módy afinitní kapilární elektroforézy

Kapilární elektromigrační metody umožňují studium vazebných interakcí a stanovení vazebných konstant komplexů několika různými experimentálními módy [33,36,37]. Při výběru příslušné techniky je potřeba zohlednit několik parametrů: (a) kinetické parametry zkoumané mezimolekulové interakce, (b) řádová velikost vazebné konstanty, (c) možnosti detekce ligandu a analytu, (d) dostupné množství analytu a ligandu pro provedení experimentu [59], (e) rozdíl v mobilitách mezi komplexem a volnými složkami zkoumaných interakčních partnerů [33].

Metody měření vazebných konstant mohou být rozděleny do tří skupin dle kinetiky komplexační rovnováhy [60,61]:

(1) Komplexy s relativně pomalou kinetikou disociace vzhledem k délce analýzy. CE zde souží jako separační metoda, ve které jsou v předem připravené rovnovážné směsi kvantifikovány koncentrace komplexu a volných složek. Měřená veličina je obvykle plocha píku v elektroforegramu. Příkladem je nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážné směsi (nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM) [62] nebo imunoafinitní CE [63].

(2) Komplexy s rychlou kinetikou vzniku a disociace mohou být analyzovány v módech, při kterých se ustanoví dynamická rovnováha mezi komplexem a volnými složkami v průběhu elektroforézy. Do této skupiny spadají afinitní kapilární elektroforéza (ACE) [64], afinitní kapilární elektroforéza s částečným plněním (PF-ACE) [65], Hummelova–Dreyerova metoda [66], vakantní ACE (VACE) [67], aj.

(3) Komplexy s relativně střední kinetikou jsou analyzovány v kinetických módech CE.

Metody mohou být také členěny podle měřené veličiny použité ke stanovení vazebné konstanty [33,36,37]:

(1) Efektivní mobilita analytu – tyto módy jsou založeny na sledování změny mobility analytu vlivem interakce s ligandem při vzniku komplexu. Příkladem jsou ACE a VACE.

(2) Posun migračního času – např. PF-ACE metoda, založená na sledování změny migračního času analytu vlivem interakce s ligandem při vzniku komplexu.

(3) Koncentrace vazebných partnerů a komplexu – NECEEM, Hummelova–Dreyerova metoda, frontální analýza (frontal analysis capillary electrophoresis, FACE) [68], kontinuální frontální analýza (continuous frontal analysis capillary electrophoresis, CFACE) [69].

Získané vazebné konstanty jsou tzv. zdánlivé (aparentní) vazebné konstanty, jsou závislé na konkrétních experimentálních podmínkách a odpovídají rovnovážným koncentracím ligandu a analytu, nejedná se o termodynamické vazebné konstanty.

1.4.1 Nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážné směsi

Metoda nerovnovážné kapilární elektroforézy rovnovážné směsi (NECEEM) spočívá v přípravě směsného roztoku analytu a ligandu o různých koncentracích a jeho následné analýze kapilární zónovou elektroforézou v elektrolytu prostém obou složek [62]. V tomto módu slouží elektroforéza jako separační technika umožňující oddělit od sebe komplex a jeho volné komponenty. Použití on-line detekce umožňuje kvantifikovat koncentrace jednotlivých složek a vynést vazebnou křivku, na jejímž základě lze vypočítat disociační konstantu [70,71].

Rovnici (2) lze upravit do tvaru

$$\frac{[AL]}{[A]} = -K_b[AL] + K_b[L_{tot}] \quad (10)$$

kde L_{tot} je celková koncentrace ligandu. Závislost podílu koncentrace komplexu ke koncentraci analytu vůči celkové koncentraci ligandu lze graficky znázornit jako Scatchardův výnos. Směrnice přímky je hledaná asociační konstanta.

Tento postup je použitelný pouze v jednoduchých případech, kdy stechiometrie vazby odpovídá poměru 1:1. Postup preinkubace a následné separace rovnovážné směsi se využívá i v dalších metodách stanovení disociačních konstant, jako je gelová filtrace či rovnovážná dialýza. Kapilární elektroforéza má oproti těmto technikám výhodu v tom, že analyt nemusí být čistý, pokud se jeho příměsi během separace oddělí. Další výhodou je, že velikost interagujících molekul může být podobná (to omezuje možnosti použití dialýzy i gelové permeační chromatografie). Díky minimální spotřebě vzorku

může být analýza mnohokrát opakována, tudíž lze zkoumanou směs dávkovat ještě před ustavením rovnováhy a tak průběh tohoto procesu sledovat.

Tato metoda je vhodná pouze pro studium silně interagujícího analytu s ligandem. Analýza je omezena rychlostí disociace komplexu. V ideálním případě je množství ligandu uvolněného z komplexu během separačního kroku považováno za zanedbatelné a naměřená hodnota koncentrace volného ligandu odpovídá koncentraci v rovnovážné směsi. V praxi nesmí rychlostní konstanta rozpadu překročit $0,105/t$, kde t je čas analýzy ligandu. Kapilární elektroforéza díky své rychlosti a účinnosti umožňuje stanovit vazebné konstanty pro slabší komplexy než ostatní techniky.

Určitým omezením ACE je poměrně nízká koncentrační citlivost UV-Vis absorpční detekce. Rovnovážné roztoky silných komplexů obsahují nízké koncentrace volných složek, které se obtížně stanovují běžnou UV-Vis absorpční detekcí. Z tohoto důvodu nelze tuto metodu použít ani pro příliš silné komplexy. V určitých případech lze problém obejít a zvýšit citlivost použitím laserem indukované fluorescenční (LIF) detekce. NECEEM se často používá k charakterizaci vazby fluorescenčně značených aptamerů s cílovými molekulami [33].

1.4.2 Imunoafinitní kapilární elektroforéza

Při imunochemických stanoveních se používá jako jeden z interakčních partnerů protilátka. Protilátky jsou fluorescenčně značeny a díky LIF detekci je dosahováno velmi nízkých detekčních limitů. Tuto techniku lze obecně použít i s jinými fluorescenčně značenými próbami, například s aptamery. Měření se provádí v kompetitivním a nekompetitivním módu [63,72,73].

Při nekompetitivním provedení je ekvilibrována protilátka s roztokem vzorku. Vazba antigenu se v elektroforegramu projeví vznikem nového fluorescenčního píku odpovídajícího komplexu, který se nachází v jiné poloze než pík volné protilátky. S rostoucím množstvím antigenu se zmenšuje plocha píku volné protilátky a vzrůstá plocha píku komplexu protilátka-antigen. Tento postup je výhodný u silně nabitých antigenů, které vyvolají dostatečnou změnu mobility protilátky poté, co se na ni navážou. Přirozená heterogenita protilátek (i monoklonálních a afinitně purifikovaných) představuje problém, který se projevuje přítomností několika píků imunokomplexu.

Kompetitivní provedení slouží ke studiu interakcí protilátek s nízkomolekulárními ligandy přítomnými v komplikovaných biologických vzorcích (buněčné lyzáty, tkáňové extrakty). Předmětem detekce je fluorescenčně značený antigen, který kompetuje o vazebná místa protilátky s antigeny ze vzorku. S přibývajícím množstvím antigenu ve vzorku se zmenšuje plocha píku komplexu protilátka-značený antigen a vzrůstá plocha píku volného značeného antigenu.

1.4.3 Dynamická rovnovážná afinitní kapilární elektroforéza

Dynamická rovnovážná ACE, zvaná též ACE s posunem mobility (mobility shift ACE), patří mezi nejčastěji využívané módy ACE. V této metodě je celá kapilára naplněna základním elektrolytem (BGE) obsahujícím ligand o definované koncentraci. Na začátek kapiláry je nadávkována zóna analytu a následně je provedena série experimentů s řadou BGE lišících se koncentrací ligandu. Během migrace analytu dochází k ustanovování dynamické rovnováhy mezi analytem a ligandem, která vede ke změně migrační rychlosti analytu. Typickým příkladem využití je separace směsi enantiomerů (analytů) v prostředí obsahujícím chirální selektor (ligand).

Efektivní mobilita analytu A, $\mu_{\text{eff},A}$, je dána váženým průměrem mobilit jeho volné a vázané formy

$$\mu_{\text{eff}, A} = \frac{[A]}{[A]+[AL]} \mu_A + \frac{[AL]}{[A]+[AL]} \mu_{AL} \quad (11)$$

kde μ_A a μ_{AL} jsou mobility jednotlivých forem analytu. V kombinaci s rovnicí pro konstanty stability (2) lze tuto rovnici upravit do tvaru

$$\mu_{\text{eff}, A} = \frac{\mu_A + \mu_{AL} K_b [L]}{1 + K_b [L]} \quad (12)$$

Asociační konstantu K_b lze vypočítat pomocí nelineární regrese fitováním výše uvedeného vztahu do naměřené závislosti efektivní mobility analytu na koncentraci ligandu v BGE. Při výpočtu je třeba zohlednit, že přítomnost ligandu v BGE ovlivňuje jeho složení a tím i parametry jako iontová síla, vodivost, viskozita a rychlost EOF. Pro správný výpočet vazebné konstanty je nutno provést korekci těchto parametrů.

Tato technika je vhodná pro studium komplexů s rychlou kinetikou vzniku a disociace, a se slabou až středně silnou vazebnou konstantou (K_b v řádu $10^0 - 10^4$ L/mol). Nevýhodou této metody je nutnost připravit sérii BGE se vzrůstající koncentrací ligandu, přičemž pro vzácné či drahé vzorky může být spotřeba ligandu relativně vysoká.

1.4.4 Afinitní kapilární elektroforéza s částečným plněním

Speciální modifikací dynamické rovnovážné ACE je technika s částečným naplněním kapiláry (partial filling affinity capillary electrophoresis, PF-ACE) [35,74,75]. Původně byla vyvinuta pro situace, kdy ligand použitý v celém objemu BGE v kapiláře silně absorbuje UV záření a tím představuje problém pro detekci analytu [76,77]. Řešením je naplnění pouze části kapiláry dlouhou zónou BGE s ligandem,

zatímco BGE ve zbylém úseku kapiláry, kde se vyskytuje detektor, UV absorbující ligand neobsahuje. Zóna ligandu se během elektroforézy buď nepohybuje, nebo se pohybuje opačným směrem než analyt, a proto jsou separované složky analytu detekovány v nepřítomnosti absorbujícího ligandu. Změna migračního času analytu je závislá na délce zóny obsahující ligand. Možnost provést sérii měření asociací konstanty pro různé délky zóny s jedním roztokem ligandu představuje nespornou výhodu oproti použití série roztoků o různých koncentracích ligandu, a obvykle nevyžaduje provádění korekcí [78]. Technika PF-ACE je podrobněji popsána v kapitole 1.5 na straně 39.

1.4.5 Vícenásobné nanesení ligandu a analytu

Za účelem urychlení provedení série měření pro různé koncentrace analytu a ligandu je možno použít techniku vícenásobného nanášení [79], kdy jsou požadované údaje získány během jediné analýzy. Do kapiláry jsou opakovaně nanášeny zóny obsahující analyt s markerem a zóny s ligandem, jehož koncentrace se u každé zóny postupně zvyšuje. Výsledkem jediného běhu je několik elektroforetických záznamů pro různé koncentrace ligandu.

1.4.6 Frontální analýza

V technice frontální analýzy (frontal analysis capillary electrophoresis, FACE) [68] je předem ekvilibrována směs analytu a ligandu. Tato směs je nadávkována jako relativně dlouhá zóna na začátek kapiláry. Pokud se dostatečně liší mobilita volného a vázaného analytu, jsou obě formy separovány jako dva odlišné ploché píky (zóny). Výška plochých píků (zón) je úměrná koncentraci analytu, kterou lze stanovit na základě předem změřené kalibrační křivky.

Variantou FACE je kontinuální frontální analýza (continuous frontal analysis capillary electrophoresis, CFACE) [69], při které je elektrodová nádobka na injekčním konci kapiláry naplněna BGE obsahujícím vzorek (rovnovážnou směs analytu a ligandu), který je v průběhu elektroforézy průběžně elektrokineticky dávkován po celou dobu separace.

1.4.7 Vakantní afinitní kapilární elektroforéza

V případě vakantní ACE (VACE) [67] je kapilára naplněna BGE obsahujícím ligand i analyt. Následně je nadávkována krátká zóna BGE neobsahující tyto složky a je zahájena separace. Ve výsledném záznamu se na detektoru projeví dva negativní píky odpovídající analytu a ligandu, jejichž plocha je úměrná koncentraci a migrační čas stupni komplexace. V sérii měření je koncentrace jedné ze složek konstantní a mění se u druhé. VACE umožňuje určit počet vazebných míst na základě sledování změny efektivní mobility analytu vůči koncentraci ligandu. Na základě nedávných poznatků je však tato metoda považována za nepřesnou [80].

1.4.8 Kapilární afinoforéza

V kapilární afinoforéze [81] se využívá tzv. afinofor, což je látka nesoucí silný náboj a zároveň obsahující skupinu s vysokou afinitou k analytu. Lze ho připravit konjugací zkoumaného ligandu se silně nabitým nosičem. Silný náboj umožňuje afinoforu rychle migrovat v elektrickém poli. Nachází-li se ve vzorku látka s afinitou k afinoforu, komplexací se výrazně změní její migrační čas. Je-li změna mobility dostatečná, může být tato látka separována od ostatních složek komplexní směsi. Afinoforéza může dobře sloužit ke stanovení vazebné stechiometrie, a to v podmínkách

různých ligandů. Afinoferézu lze použít i v situacích, kdy je analyt v elektroneutrálním stavu (například proteiny v blízkosti svého pI) [82,83].

1.4.9 Afinitní kapilární elektroforéza na imobilizovaných ligandech

Technika využívající imobilizované ligandy je principiálně podobná afinitní chromatografii a klasické afinitní gelové elektroforéze. Ligand je kovalentně navázán na pevný nosič (gel či stěnu kapiláry) a analyt prochází separačním prostorem hnán čistě elektroforeticky nebo s příspěvkem elektroosmotického toku. Při separaci se zároveň uplatňuje elektroforéza (pohyb iontů v závislosti na jejich náboji a hydrodynamických vlastnostech) i chromatografie (rozdělovací rovnováha mezi stacionární a mobilní fází). Převažuje-li jako hnací síla pohybu analytu EOF, používá se pro tuto techniku označení kapilární afinitní elektrochromatografie. Ligand může být navázán pouze v omezené části kapiláry, aby obdobně jako v PF-ACE jeho absorpce nebránila detekci analytu [84].

Jako stereospecifické selektory pro oddělení enantiomerů nízkomolekulárních látek, např. léčiv, je možné použít imobilizované proteiny. Další z možných typů selekce je technika tzv. „molekulových otisků“ ve speciálním polymeru (molecularly imprinted polymer, MIP), jedná se o tzv. umělé nebo plastické protilátky. Spočívá ve vytvoření umělých dutin, které jsou svým tvarem a chemickým uspořádáním komplementární k některé složce analytu. Kapilára naplněná tímto polymerem specificky zpomaluje pohyb látek, které mají afinitu k připraveným dutinám. Gel se chová jako umělý receptor. Rušivou vlastností, která ale může být v některých případech naopak výhodou, je určitá křížová selektivita mezi vazebnými místy gelu

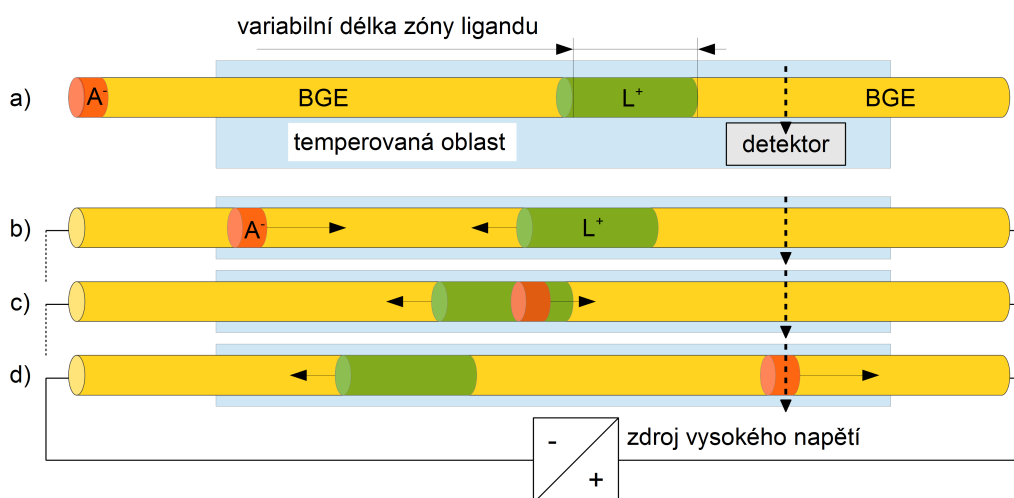
a sloučeninami strukturně podobnými analytu. Pokud se dutiny vytvoří otisknutím známého ligandu, umožňuje tato technika nalezení dalších látek, které s receptorem mohou interagovat [85].

1.5 Princip a aplikace afinitní kapilární elektroforézy s částečným plněním

V technice PF-ACE je jedna z interagujících sloučenin (ligand) rozpuštěna v BGE a vpravena do kapiláry jako zóna ligandu o konstantní koncentraci a variabilní délce. Druhý interakční partner je aplikován jako analyt v krátké zóně na začátek kapiláry. Na rozdíl od klasické ACE, kde je proměnnou veličinou koncentrace ligandu přítomného v BGE v celém objemu kapiláry, je u PF-ACE koncentrace ligandu konstantní a proměnnou veličinou je látkové množství ligandu reprezentované délkou (objemem) zóny ligandu. Schéma uspořádání PF-ACE je ilustrováno na obrázku 4. Asociační (vazebné) konstanty komplexů analyt-ligand jsou vypočítány ze závislosti změn migračního času analytu na délce zóny ligandu v kapiláře.

Metoda PF-ACE byla použita při studiu interakcí mezi thrombinem a nízkomolekulárními ligandy [86], neutrálními steroidními hormony a sérovým albuminem [87], polyelektrolyty a vybranými modelovými proteiny [88], lipoproteiny a chondroitin-6-sulfátem [89,90], či při stanovení vazebné konstanty komplexů protilátka-antigen [91]. Dále byly v technice PF-ACE využity DNA oligonukleotidy jako chirální selektory při separaci nízkomolekulárních látek [92], nebo sérový albumin jako chirální selektor při separaci léčiv a různých chirálních analytů [93–95]. PF-ACE byla též využita při studiu glykosylace proteinů s využitím protilátek [96] a lektinů [97],

screeningu potenciálních léčiv [98], a studiu interakce mezi buňkami makrofágů s vybranými nízkomolekulárními látkami [99].



Obr. 4 Schématické uspořádání a průběh PF-ACE experimentu. a) Počáteční podmínky před zahájením separace: Relativně dlouhá zóna roztoku ligandu L v BGE je zavedena do temperované části kapiláry. Na počátek kapiláry je nadávkována krátká zóna analytu A. Obě tyto zóny jsou odděleny oblastí čistého BGE. b) Po aplikaci elektrického pole začnou analyt a ligand migrovat proti sobě. c) Analyt prochází zónou ligandu v teplotně kontrolované části kapiláry. Rychlost jeho migrace je zpomalena v důsledku interakce s ligandem. d) Analyt a ligand pokračují v migraci jako oddělené zóny. Analyt následně prochází detektorem.

1.6 Odvození rovnic pro afinitní kapilární elektroforézu s částečným plněním

Mezi analytem A migrujícím kapilárou a ligandem L přítomným v BGE se v případě interakce ustanoví dynamická rovnováha. Koncentrace volného analytu

a komplexu analyt-ligand je ve stavu dynamické rovnováhy konstantní a je popsána stabilitní konstantou komplexu. Efektivní mobilita analytu A, $\mu_{eff,A}$, je dána mobilitami volné a vázané formy analytu A a molárními zlomky těchto forem, viz rovnice (11). Dosazením z definičního vztahu pro disociační konstantu (4) do rovnice (11) lze vyjádřit efektivní pohyblivost analytu A vztahem:

$$\mu_{eff,A} = \frac{\mu_A \cdot K_d + \mu_{AL} \cdot [L]}{K_d + [L]} \quad (13)$$

kde μ_A a μ_{AL} jsou mobility volného analytu A a komplexu analyt-ligand AL, K_d je disociační konstanta komplexu AL a $[L]$ je koncentrace ligandu L. Rovnici (13) lze upravit do nejčastěji používaného tvaru:

$$\mu_{eff,A} = \mu_A + (\mu_{AL} - \mu_A) \cdot \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (14)$$

Všechny tyto rovnice platí za předpokladu, že koncentrace ligandu $[L]$ je ve velkém nadbytku vůči analytu, a proto se v důsledku vzniku komplexu mění jen zanedbatelně. Výše uvedené vztahy platí pro ACE, kdy je celý objem kapiláry naplněn roztokem ligandu. Následující odvození rovnice pro situace, kdy je roztokem ligandu naplněna jen část kapiláry (jako je tomu v případě PF-ACE), je převzato z práce Nilsson et al. [78].

V případě částečného plnění kapiláry lze kapiláru rozdělit na úsek obsahující zónu ligandu o délce L_L a úsek čistého BGE neobsahujícího ligand o délce L_v , přičemž délka měřeného úseku kapiláry (tzn. od počátku k detektoru) L_{det} je dána součtem délek obou částí:

$$L_{det} = L_L + L_v \quad (15)$$

Migrující analyt procházející zónu ligandu v ní nabude v důsledku interakce s ligandem efektivní mobilitu $\mu_{eff,A}$, migrační rychlost v_z a stráví v ní čas t_z . V úseku

kapiláry s čistým BGE pak migruje s mobilitou μ_A , rychlostí v_v a stráví v ní čas t_v . Čas t_{det} , za který analyt projde délkou kapiláry k detektoru je dán součtem dílčích časů v obou zónách:

$$t_{det} = t_z + t_v \quad (16)$$

Pro migrační čas analytu strávený v zóně ligandu t_z platí vztah:

$$t_z = \frac{L_L}{v_z} = \frac{L_L}{E \cdot \mu_{eff, A}} \quad (17)$$

kde E je intenzita elektrického pole. Dále je potřeba definovat podíl X_0 délky zóny ligandu na délce kapiláry k detektoru následujícím způsobem:

$$X_0 = \frac{L_L}{L_L + L_v} \quad (18)$$

Pro situaci, kdy kapilára není naplněna roztokem ligandu ($L_L = 0$), definujeme t_0 jako migrační čas analytu pro nulovou délku zóny ligandu. Platí pro něj vztah:

$$t_0 = \frac{L_{det}}{E \cdot \mu_A} \quad (19)$$

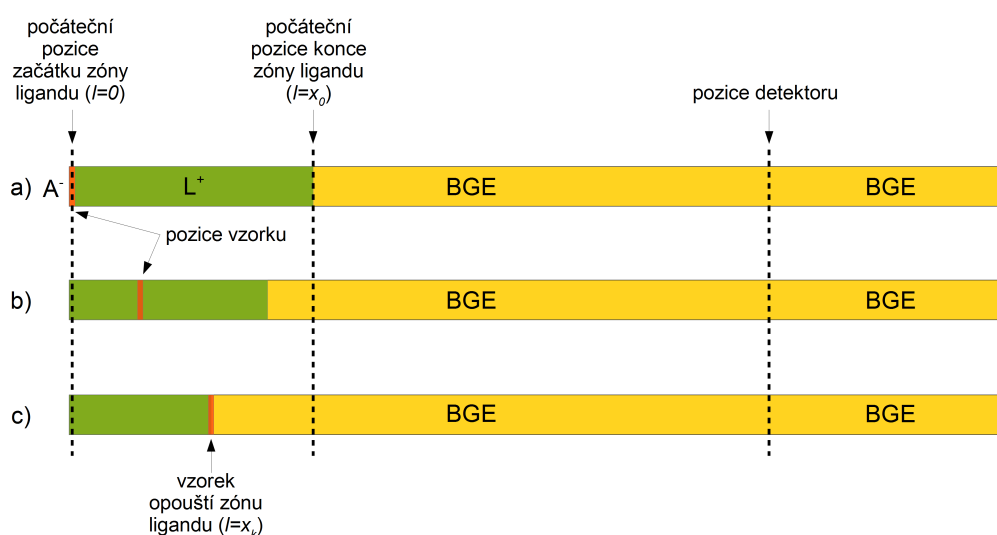
Změnu migračního času analytu Δt , způsobenou interakcí analytu s ligandem při průchodu zónou ligandu oproti migraci kapilárou naplněnou čistým BGE, lze vyjádřit jako rozdíl migračního času analytu v experimentu s částečným plněním, t_{det} , a experimentu s nulovou délkou zóny t_0 .

$$\Delta t = t_{det} - t_0 \quad (20)$$

Kombinací vztahů (14), (18) a (19) lze změnu migračního času analytu Δt vyjádřit jako:

$$\Delta t = t_{det} - t_0 = \frac{X_0 \cdot L_{det}}{E} \left(\frac{1}{\mu_A + (\mu_{AL} - \mu_A) \cdot \frac{[L]}{[L] + K_d}} - \frac{1}{\mu_A} \right) \quad (21)$$

Vztah (21) platí pouze pro ideální situace, kdy je pozice zóny ligandu uvnitř kapiláry statická (l_L a l_V jsou konstantní), tzn. pro ligand elektricky neutrální a nulový EOF v kapiláře. Dále jsou zanedbány změny viskozity a intenzity elektrického pole v zóně ligandu oproti čistému BGE. V reálné situaci je ligand velmi často tvořen elektricky nabitými molekulami a vliv EOF je též nezanedbatelný, tudíž vlivem migrace dochází ke změně pozice zóny ligandu a tím i změně času, po který mohou analyt a ligand vzájemně interagovat.



Obr. 5 Schématický průběh experimentu pro potřeby odvození obecných rovnic PF-ACE. a) Počáteční podmínky před zahájením separace: Zóna analytu A o zanedbatelně malé délce je bezprostředně následována zónou ligandu L. b) V průběhu separace migruje analyt skrze zónu ligandu a je ustavena dynamická rovnováha mezi volným analytem A a analytem vázaným v komplexu analyt-ligand AL. c) Analyt opouští zónu ligandu a migruje čistým BGE k detektoru.

Pro potřeby odvození obecné rovnice PF-ACE platné pro situace, kdy mobilita ligandu není nulová, lze vycházet ze schématu na obrázku 5. V kapiláře je přítomna zóna ligandu o nenulové délce, která se nachází mezi začátkem kapiláry ($l = 0$)

a koncovým bodem ($l = x_0$), definovaným délkou zóny. Zóna analytu je přítomna na samém začátku kapiláry a pro potřeby odvození je považována za zanedbatelně krátkou. V okamžiku zahájení elektroforézy vstoupí analyt do zóny ligandu a pohybuje se skrz ni efektivní mobilitou $\mu_{eff,A}$. Zároveň se vůči původní pozici ($l = x_0$) pohybuje konec zóny ligandu. V určitém bodě ($l = x_k$) dosáhne analyt migrujícího konce zóny ligandu, opustí jí a začne se pohybovat s mobilitou μ_A čistým BGE až po detektor. Pro jednoduchost jsou opět zanedbány změny viskozity a intenzity elektrického pole v zóně ligandu oproti čistému BGE.

Po zahájení elektroforézy lze vyjádřit závislost pozice zóny analytu x_A na čase t migrujícím zónou ligandu následujícím vztahem:

$$x_A = E \cdot \mu_{eff,A} \cdot t \quad (22)$$

Zároveň s migrací analytu se pohybuje i konec zóny ligandu, jehož pozici x_L lze vyjádřit:

$$x_L = x_0 + E \cdot \mu_L \cdot t \quad (23)$$

kde μ_L je mobilita ligandu L. V okamžiku, kdy analyt opouští zónu ligandu (dosáhne bodu x_k v obrázku 5), musí platit:

$$x_L = x_A \quad (24)$$

Dosažením ze vztahů (22) a (23) do rovnosti (24) lze získat:

$$E \cdot (\mu_{eff,A} - \mu_L) \cdot t = x_0 \quad (25)$$

Pro pozici konce zóny ligandu v počátečních podmínkách lze použitím vztahu (18) definovat následující rovnost:

$$x_0 = X_0 \cdot L_{det} \quad (26)$$

Kombinací rovnic (25) a (26) lze získat:

$$x_A = \frac{X_0 \cdot L_{det} \cdot \mu_{eff,A}}{\mu_{eff,A} - \mu_L} \quad (27)$$

Dosazením za $\mu_{eff,A}$ ze vztahu (14) do (27) lze vyjádřit:

$$x_A = \frac{X_0 \cdot L_{det} \cdot \left(\mu_A + (\mu_{AL} - \mu_A) \cdot \frac{[L]}{[L] + K_d} \right)}{\left(\mu_A + (\mu_{AL} - \mu_A) \cdot \frac{[L]}{[L] + K_d} \right) - \mu_L} \quad (28)$$

Za předpokladu, že se mobilita ligandu po vzniku komplexu analyt-ligand příliš nemění (např. je-li ligandem protein a analytem nízkomolekulární látka, případně buď analyt či ligand jsou látky silně nabitě), tedy platí:

$$|\mu_{AL} - \mu_L| \ll \mu_A \quad (29)$$

pak lze μ_L nahradit za μ_{AL} . Dosazení do (28) a úprava vede k rovnici:

$$x_A = X_0 \cdot L_{det} \cdot \left(\frac{[L]}{K_d} \cdot \frac{\mu_{AL}}{\mu_A - \mu_{AL}} + \frac{\mu_A}{\mu_A - \mu_{AL}} \right) \quad (30)$$

Dosazením vztahu (30) do rovnice pro statickou zónu ligandu (21) vznikne:

$$\Delta t = \frac{X_0 \cdot L_{det}}{E} \cdot \left(\frac{[L]}{K_d} \cdot \frac{\mu_{AL}}{\mu_A - \mu_{AL}} + \frac{\mu_A}{\mu_A - \mu_{AL}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\mu_A + (\mu_{AL} - \mu_A) \cdot \frac{[L]}{[L] + K_d}} - \frac{1}{\mu_A} \right) \quad (31)$$

Tuto rovnici (31) lze upravit do tvaru:

$$\Delta t = \frac{X_0 \cdot L_{det}}{E} \cdot [L] \cdot \left(\frac{\mu_A - \mu_{AL}}{(\mu_A - \mu_{AL}) \cdot K_d \cdot \mu_A} \right) = \frac{X_0 \cdot l_{det}}{E \cdot K_d \cdot \mu_A} \cdot [L] \quad (32)$$

Za předpokladu přítomnosti konstantního látkového množství n ligandu v kapiláře, tzn. platí:

$$[L] = \frac{c}{X_0} \quad (33)$$

v níž je koncentrace ligandu c definována:

$$c = \frac{n}{\pi \cdot r^2 \cdot L_{det}} \quad (34)$$

kde r je vnitřní poloměr kapiláry. Dosazením výrazů (33) a (34) do rovnice (32) lze vyjádřit:

$$\Delta t = \frac{c \cdot L_{det}}{E \cdot K_d \cdot \mu_A} = \frac{n}{\pi \cdot r^2 \cdot E \cdot K_d \cdot \mu_A} \quad (35)$$

V reálném experimentu lze definovat $t_{0,det}$ jako migrační čas analytu od počátku kapiláry po detektor pro nulovou délku zóny ligandu, a t_{det} pro experimenty s částečným plněním, tj. s nenulovou délkou zóny ligandu. Rovnici (35) lze tak vyjádřit jako:

$$\Delta t = t_{det} - t_{0,det} = \frac{n \cdot t_{0,det}}{\pi \cdot r^2 \cdot K_d \cdot L_{det}} \quad (36)$$

Z této rovnice lze vyjádřit disociační konstantu K_d

$$K_d = \frac{n \cdot t_{0,det}}{\pi \cdot r^2 \cdot \Delta t \cdot L_{det}} \quad (37)$$

Vazebnou konstantu K_b je výhodné počítat z diferenciálního tvaru závislosti změny migračního času analytu Δt na látkovém množství ligandu n obsaženém v kapiláře:

$$K_b = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot L_{det}}{t_{0,det}} \cdot \frac{d \Delta t}{d n} \quad (38)$$

Z rovnice (36) vyplývá, že při splnění výše uvedených předpokladů je změna migračního času analytu závislá pouze na látkovém množství ligandu obsaženém v kapiláře, nikoliv na jeho koncentraci či prostorové distribuci uvnitř kapiláry. Z tohoto důvodu lze volit pozici zóny ligandu při PF-ACE experimentu tak, aby k interakci mezi analytem a ligandem docházelo až v temperované části kapiláry, tj. mezi zónami analytu a ligandu je nadávkována zóna čistého BGE (viz obrázek 4 na straně 40).

2 Témata studia (bio)molekulových interakcí a enzymových reakcí

V rámci této disertační práce byly metody afinitní kapilární elektroforézy a kapilární zónové elektroforézy využity ke studiu (bio)molekulových interakcí a enzymových reakcí ve třech projektech.

2.1 Interakce DNA s interkalátory a nízkomolekulárními ligandy

Nukleové kyseliny jsou makromolekuly nesoucí dědičné informace všech známých forem živých organismů. Sloučeniny se schopností interagovat s DNA či mRNA mají potenciál ovlivnit chování buňky na základě interference s replikací DNA a/nebo genovou expresí [100]. Takové sloučeniny představují zajímavý výzkumný cíl s potenciálem vývoje nových léčiv a terapeutických aplikací. V současné době se látky z této skupiny používají v klinické praxi zejména jako protinádorová chemoterapeutika. Mechanismus účinku spočívá v interakci s jadernou DNA nádorových buněk, kde působí jako ligandy se specifitou pro velký či malý žlábek DNA molekuly, jako interkalátory, či alkylační činidla [101–105]. Interakce krátkých řetězců nukleotidů, zejména mikro RNA (miRNA), s ligandy přítomnými v buňce se ukazuje být důležitým mechanismem regulace různých buněčných pochodů, včetně nádorového bujení [106,107].

Nově syntetizované sloučeniny ze skupiny oligofenylenových derivátů jsou považované za látky schopné interagovat s DNA [108]. Hrubé odhady jejich afinity

k dsDNA provedených pomocí ultrafiltrace [109] naznačily hodnoty asociačních konstant řádově podobné dobře charakterizovanému interkalátoru ethidium bromidu (EtBr), používanému jako fluorescenční barvivo pro vizualizace zón dsDNA při separacích prováděných gelovou elektroforézou [110]. V tomto projektu byly zkoumány interakce oligofenylenových derivátů s dvouvláknovou molekulou DNA (dsDNA).

2.2 Interakce helquatů s chirálními analyty

Značná část látek vyskytujících se v přírodě i uměle syntetizovaných je tvořena molekulami s asymetrickým prostorovým uspořádáním atomů. Takové objekty se nazývají chirální a mají jediný prvek symetrie – identitu. K danému chirálnímu objektu lze najít s ním neztotožnitelný objekt, který je jeho zrcadlovým obrazem, jenž se v případě molekul označuje jako enantiomer.

Zdrojů chiralita může být několik typů. Nejběžnější typ chiralita v chemii je chiralita bodová, která je vlastní molekulám obsahujícím atomy se čtyřmi různými substituenty. Dalšími typy chiralita jsou chiralita osová (axiální), rovinná (planární) a šroubovicová (helikální). Helikální chiralita je typ stereoizomerie, který je vlastní molekulám s helikální strukturou. U těchto objektů je chiralita popsána smyslem závitů (pravotočivá šroubovice, značená symbolem P, popisuje posun podél osy ve směru od pozorovatele spojený s otáčením ve směru hodinových ručiček, levotočivá šroubovice – M, ve směru opačném) [111,112].

Většina sloučenin přítomných v živých organismech patří mezi látky chirální a často pouze jeden z enantiomerů vykazuje biologickou aktivitu. Reakce katalyzované enzymy jsou vysoce enantiospecifické, jako substrát vstupující do enzymové reakce vyžadují konkrétní enantiomer dané chirální sloučeniny, případně produktem reakce je

jeden konkrétní stereoizomer. Oproti tomu při klasické chemické *in-vitro* syntéze vzniká obvykle směs enantiomerů. Vhodnou volbou podmínek (např. přidáním chirálních katalyzátorů do reakční směsi) lze jejich poměr ovlivnit ve prospěch žádaného produktu. Ačkoliv oba enantiomery vykazují shodu ve většině fyzikálně-chemických vlastností, jejich biologická aktivita se může diametrálně lišit. Zatímco jeden stereoizomer může být pro daný biologický systém nativní, opačný stereoizomer bývá neznámé xenobiotikum, které daný organismus nedokáže metabolizovat svým enzymovým aparátem, a může pro organismus dokonce vykazovat toxické účinky. V případě léčiv bývá biologicky aktivní většinou pouze jedna enantiomerní forma. Opačný stereoizomer, který může vznikat během syntézy daného léčiva, byl v několika případech prokázán jako toxický či karcinogenní pro člověka [113].

Z výše uvedených důvodů je zcela nezbytné provádět analýzu a kvantifikaci enantiomerního složení směsi chirálních látek, zejména ve farmaceutickém průmyslu, nicméně kontrola enantiomerní čistoty je důležitá ve většině chemických syntéz. Jednou z metod používanou pro separaci a kvantifikaci enantiomerů je ACE [114,115]. Rozdělení enantiomerů v průběhu elektroforetické separace je založeno na jejich rozdílné interakci s chirálním selektorem přítomným v BGE. Enantiomery analytu se mohou vzájemně lišit afinitou k chirálnímu selektoru, tedy při vzniku diastereomerního komplexu je preferována vazba jednoho z nich na úkor druhého [116]. Dále může existovat rozdíl mezi mobilitami obou diastereomerních komplexů vlivem jejich odlišných hydrodynamických vlastností [117]. Kombinace těchto jevů má za následek separaci obou enantiomerů působením elektrického pole jako dvou oddělených zón.

Je mnoho sloučenin, které se využívají jako chirální selektory v CE a ostatních separačních technikách. Typickým zástupcem jsou cyklodextriny a jejich neutrální

a nabité deriváty [118–120]. Obdobou cyklodextrinů jsou cyklofruktany [121,122]. Pro separaci látek hydrofobní povahy se používají chirální surfaktanty [123]. Mezi často využívané selektory patří také peptidová makrocyclická antibiotika, oligo- a polysacharidy a některé proteiny, podrobněji v přehledných člancích [124–127].

Výše zmíněné chirální selektory jsou aplikovatelné na separaci pouze některých látek. Pro chirální separace mnoha zkoumaných sloučenin nejsou účinné selektory známy. Z tohoto důvodu je potřeba hledat nové typy chirálních selektorů, které by umožnily dosáhnout efektivních separací i dalších typů chirálních analytů.

Helquaty (helikálně prodloužené diquaty) představují novou třídu funkčních organických molekul, kombinující strukturní vlastnosti helicenů [128–131] a viologenů [132]. Jejich potenciální uplatnění se předpokládá v materiálových vědách, molekulární elektronice a jakožto katalyzátory. Helquaty vykazují chiralitu helicenů (označované *P* a *M*) a obsahují jejich konjugovaný aromatický systém. Zároveň obsahují dusíkové heteroatomy viologenů, vázané ve formě kvarterních aminů a zodpovědných za permanentní kladný náboj v širokém rozmezí pH. Přítomnost těchto nabitých heteroatomů zajišťuje helquatům dobrou rozpustnost ve vodě [133–136].

Helquaty neobsahují žádný stereogenní atom a jejich chirální vlastnosti vyplývají z jejich helikální asymetrie. V předchozích pracích byly helquaty úspěšně separovány za účelem stanovení jejich chirální čistoty pomocí CE s využitím vysoce sulfátovaných cyklodextrinů jako chirálních selektorů [137]. Některé z helquatů se podařilo izolovat jako čisté enantiomery v relativně vysokých množstvích (jednotky gramů) [138,139], což umožnilo jejich použití k dalším experimentům.

Cílem této práce bylo studium interakcí vybraných chirálně čistých helquatů s anionickými aromatickými chirálními analyty, např. léčivý nebo katalyzátory.

2.3 Sledování enzymové aktivity rhomboidních

proteas

Rhomboidní intramembránové proteasy patří mezi evolučně široce rozšířenou skupinu proteolytických enzymů. Jde o transmembranové proteiny s aktivním místem lokalizovaným uvnitř fosfolipidové membrány, štěpící hydrofobní intramembránové části polypeptidového řetězce jiných membránových proteinů [140].

Rhomboidní proteasy se účastní mnoha významných biologických dějů a představují nový potenciální cíl pro biomedicínské aplikace. V současnosti je popsána jejich role v kontrole kvality a odstraňování transmembránových proteinů [141], při sekreci růstových faktorů [142,143], v dynamice mitochondriální membrány [144], při průniku parazita *Plasmodium falciparum* do hostitelských erytrocytů [145], v onkologických dějích [146,147] a dalších medicínsky relevantních procesech [148–151].

Významnou překážkou, která ztěžuje výzkum rhomboidních proteas a vývoj jejich inhibitorů, je nedostatek vhodných substrátů pro experimentální sledování jejich enzymové aktivity [152]. Cílem tohoto projektu bylo využít CE při vývoji robustního fluorogenního substrátu specifického pro širokou skupinu rhomboidních proteas a aplikovatelného pro měření enzymové aktivity ve velkém rozsahu experimentálních podmínek [153]. Kapilární elektroforéza byla v pilotní fázi tohoto projektu použita jako analytická metoda k nalezení vhodného peptidového substrátu pro vývoj fluorescenční značky (próby), jelikož umožňovala relativně snadno sledovat a kvantifikovat produkty štěpení vybraných transmembránových peptidů a stanovit tak substrátovou specifitu testovaných rhomboidních proteas.

3 Cíle práce

Obecným cílem práce bylo studium (bio)molekulových interakcí a sledování průběhu proteolytických enzymových reakcí metodami afinitní kapilární elektroforézy (ACE) a kapilární elektroforézy (CE) a vývoj postupů a podmínek umožňujících výzkum těchto interakcí a reakcí. Dílčí cíle práce byly vymezeny následovně:

V projektu studia interakce oligonukleotidových fragmentů dvouvláknové DNA (dsDNA) s interkalátory a jinými ligandy bylo prvotním cílem vyvinout vhodnou ACE metodu pro stanovení vazebných konstant vznikajících komplexů s využitím ethidium bromidu jako modelového interkalátoru. Následným cílem bylo změřit v tomto experimentálním uspořádání vazebné konstanty komplexů oligofenylenových derivátů s výše uvedenými fragmenty dsDNA. Výsledky tohoto studia byly prezentovány v práci I.

V projektu studia enantioselektivních interakcí (bio)molekul bylo cílem vyvinout vhodnou metodu pro sledování nekovalentní vazby mezi chirálně čistými helquaty a anionickými aromatickými analyty a pro charakterizaci síly této interakce vazebnými konstantami příslušných komplexů. Výsledky tohoto studia byly prezentovány v publikaci II.

V projektu vývoje fluorogenních substrátů rhomboidních proteas bylo cílem vyvinout rychlou a účinnou CE metodu umožňující sledovat produkty enzymového štěpení pokusných peptidových substrátů. Výsledky tohoto studia byly základem pro publikaci III.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Pro přípravu roztoků a jako standardy byly použity následující chemikálie. Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty. Kyselina fosforečná, kyselina boritá, kyselina octová, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, hydroxid sodný a ethanol byly získány od firmy Penta (Chrudim, ČR). Tyramin/HCl a mesityloxid byly zakoupeny od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Dimethylsulfoxid (DMSO) a hydroxypropylcellulosa (M_r 100000) byly získány od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) byl zakoupen od firmy Serva (Heidelberg, Německo).

Roztoky základních elektrolytů byly připraveny odměřením potřebných objemů jeho složek z 1 M zásobních roztoků a doplněním deionizovanou vodou v odměrné baňce. Bylo změřeno pH roztoku a v případě potřeby upraveno přidáním malého množství zásobního roztoku jedné či druhé složky elektrolytu.

4.2 Analyzované sloučeniny

4.2.1 Oligonukleotidy, ethidium bromid a oligofenylenové

deriváty

Oligonukleotid DNA se samokomplementární sekvencí 5'-CGCGAATTCGCG-3' (Dickersonův dodekamer) a oligonukleotidy s prodlouženými sekvencemi (viz tabulka 1) byly získány v odsolené a pevné formě od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, ČR).

Vzorky byly rozpuštěny v deionizované vodě na 1 mM zásobní roztoky (vztaženo na jedno vlákno DNA) a uchovávány při -20 °C. Při experimentech byly vzorky zředěny na 0,1 mM koncentraci deionizovanou vodou, případně BGE.

Tabulka 1. Kódy, nukleotidové sekvence a predikované teploty tání testovaných DNA oligonukleotidů.

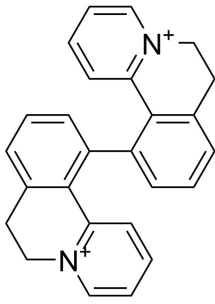
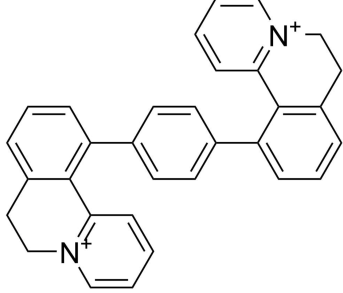
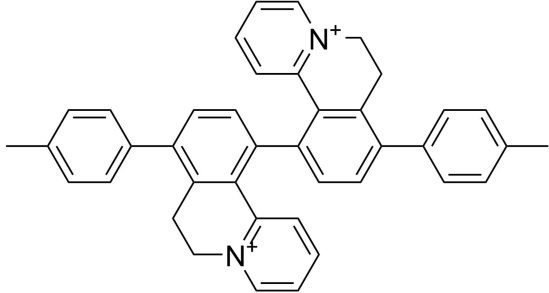
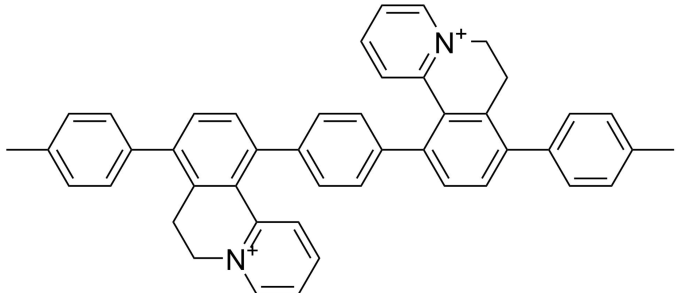
Kód	Nukleotidová sekvence	Predikovaná teplota tání T_m [°C]
DNA12	CGCGAATTCGCG	33
DNA14aa	ACGCGAATTCGCGT	37
DNA14gc	GCGCGAATTCGCGC	41
DNA16aa	AACGCGAATTCGCGTT	63
DNA16gc	CGCGCGAATTCGCGCG	76
DNA18aa	AAACGCGAATTCGCGTTT	66
DNA18gc	GCGCGCGAATTCGCGCGC	81
DNA20aa	AAAACGCGAATTCGCGTTTT	67
DNA20gc	CGCGCGCGAATTCGCGCGCG	87

Pozn. Predikovaná teplota tání dimeru byla získána nástrojem OligoCalc [154].

Ethidium bromid (EtBr) byl získán od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, ČR) a byl použit jako modelová sloučenina dobře charakterizovaného intarkalátoru silně interagujícího s dsDNA.

Oligofenylenové deriváty (OPD) se strukturami zobrazenými v tabulce 2 byly syntetizovány podle postupu popsaného jinde (M. Čížková, F. Teplý, publikace v přípravě). Pevné vzorky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na zásobní roztoky o koncentraci 10 mg/mL. Roztoky ligandů použité v experimentech byly připraveny zředěním zásobních roztoků v BGE na 1,0 – 0,1 mM koncentrace.

Tabulka 2. Kódy, struktury, protiionty a relativní molekulové hmotnosti (M_r) testovaných oligofenylenových derivátů.

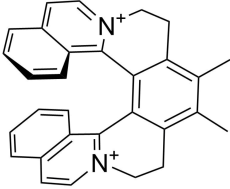
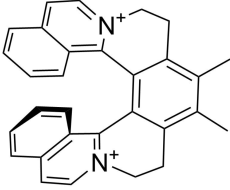
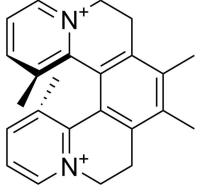
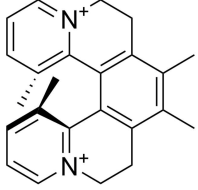
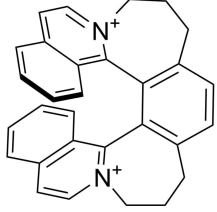
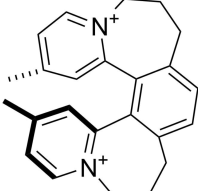
Kód	Struktura	Protiiont	M_r (sůl)
OPD1		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	660,61
OPD2		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	736,70
OPD3		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	840,85
OPD4		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	916,95

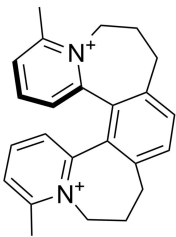
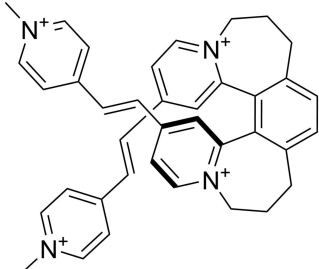
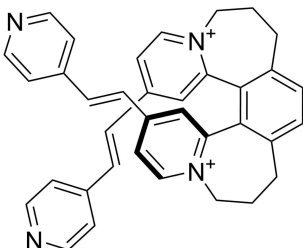
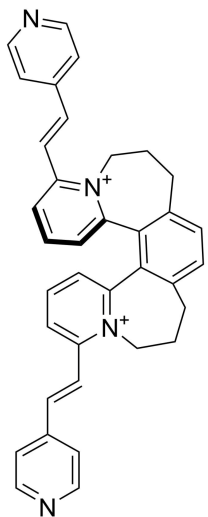
4.2.2 Helquaty a chirální analyty

Helquaty (se strukturami zobrazenými v tabulce 3) byly syntetizovány ve skupině F. Teplého podle postupů popsaných jinde [133,135,136,138,139,152]. Helquaty byly

dodány jako stereoizomery s čistotou 96-99% ee (enantiomeric excess). Vzorčky byly uchovávány v suchém stavu bez přístupu světla při -20 °C. Roztoky ligandů byly připraveny rozpuštěním potřebného množství helquatu v BGE.

Tabulka 3. Kódy, struktury, protiionty a relativní molekulové hmotnosti (M_r) helquatů.

Kód	Struktura	Protiiont	M_r (sůl)
(<i>P</i>)-HQ1		2 CF ₃ -CO ₂ ⁻	712,68
(<i>M</i>)-HQ1		2 CF ₃ -CO ₂ ⁻	712,68
(<i>P</i>)-HQ2		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	640,61
(<i>M</i>)-HQ2		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	640,61
(<i>P</i>)-HQ3		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	712,68
(<i>M</i>)-HQ4		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	640,61

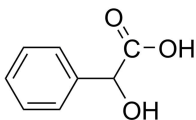
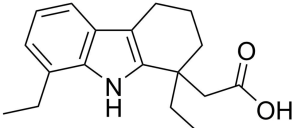
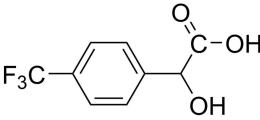
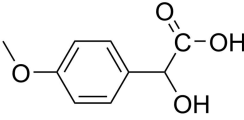
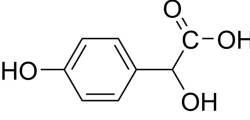
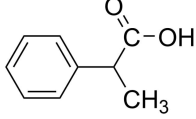
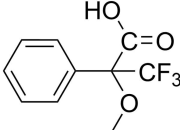
Kód	Struktura	Protiiont	M_r (sůl)
(<i>P</i>)-HQ5		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	640,61
(<i>M</i>)-HQ6		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	848,88
(<i>M</i>)-HQ7		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	818,81
(<i>P</i>)-HQ8		2 CF ₃ -SO ₃ ⁻	818,81

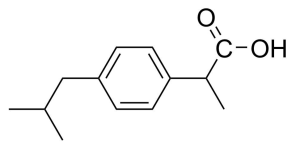
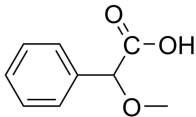
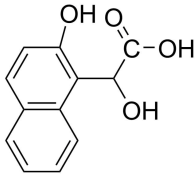
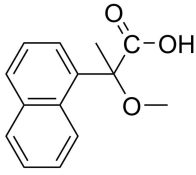
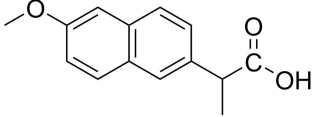
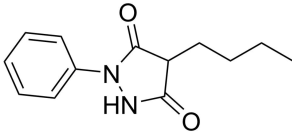
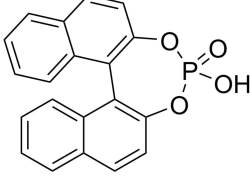
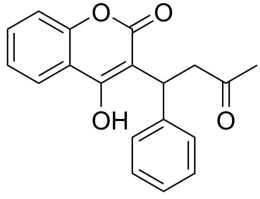
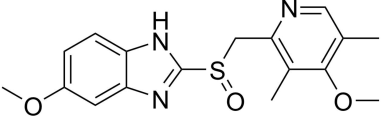
Symetrie (helicita) *P* a *M* je vyznačena v kódu sloučeniny.

Jako modelové analyty pro testování enantioselektivních interakcí helquatů byly vybrány chirální aromatické anionické sloučeniny, z nichž některé jsou používány jako

léčiva nebo katalyzátory. Kyselina mandlová a etodolac byly zakoupeny od Tokyo Chemical Industry Co., LTD (Tokyo, Japan). Ibuprofen, deriváty kyseliny mandlové a 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfát byly získány od společnosti Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany). Všechny ostatní analyty byly zakoupeny od Sigma-Aldrich. Plný výčet analytů je uveden v tabulce 4.

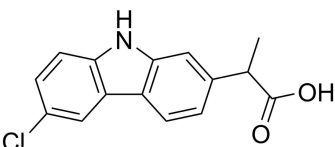
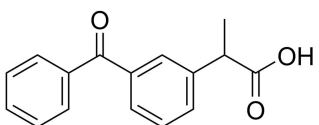
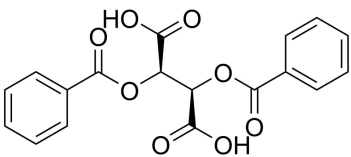
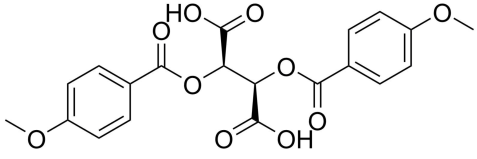
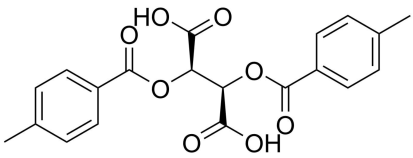
Tabulka 4. Kódy, struktury, protiionty, názvy a relativní molekulové hmotnosti (M_r) chirálních analytů použitých k testování enantioselektivních interakcí helquatů.

Kód	Struktura	Název	M_r
C01		kyselina mandlová	152,15
C02		etodolac	287,36
C03		kyselina 4-(trifluormethyl)mandlová	220,15
C04		kyselina 4-methoxymandlová	182,18
C05		kyselina 4-hydroxymandlová	186,17
C06		kyselina 2-fenylpropionová	150,18
C07		kyselina α -methoxy- α - (trifluoromethyl)fenyloctová	234,14

Kód	Struktura	Název	M_r
C08		ibuprofen	206,29
C09		kyselina α -methoxyfenyloctová	166,17
C10		kyselina 2-hydroxy-2-(2- hydroxy-1-naftyl)octová	218,21
C11		kyselina 2-methoxy-2-(1- naftyl)propanová	230,26
C12		naproxen	230,26
C13		4-butyl-2,5-diketo-1- fenylpyrazolidin	232,29
C14		1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfát (BNP)	348,29
C15		warfarin	308,33
C16		omeprazol	345,42

Kód	Struktúra	Název	M_r
C17		3,3'-bis(2,4,6-triisopropylfenyl)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenofosfát	752,96
C18		3,3'-bis(triphenylsilyl)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenofosfát	865,07
C19		3,3'-bis(3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenofosfát	772,47
C20		4-(2-chlorofenyl)-2-hydroxy-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxafosforinán 2-oxid	276,65

Kód	Struktúra	Název	M_r
C21		2-hydroxy-4-(2-methoxyfenyl)-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxafosforinán 2-oxid	272,23
C22		1,1'-bi-2-naftol	286,32
C23		VAPOL hydrogenfoszfát	600,6
C24		3,3'-bis(cyklohexyl)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfoszfát	512,58
C25		fenoprofen	522,6
C26		ketorolac	376,4
C27		flurbiprofen	244,26

Kód	Struktura	Název	M_r
C28		carprofen	273,71
C29		ketoprofen	254,28
C30		kyselina 2,3-dibenzoyl-D/L- vinná (DBTA)	358,3
C31		kyselina 2,3-di- <i>p</i> -anisoyl- D/L- vinná (DATA)	418,3
C32		kyselina 2,3-di- <i>p</i> -toluoyl- D/L- vinná (DTTA)	386,36

Analyty byly připraveny jako 0,1 mM racemické roztoky v 0,1 mM roztoku NaOH pro zajištění ionizace jejich anionických skupin.

4.2.3 Peptidy štěpené rhomboidními proteasami

V tomto projektu byly analyzovány produkty enzymové reakce rhomboidních proteas. Jako substráty byly použity peptidy s aminokyselinovými sekvencemi uvedenými v tabulce 5.

Tabulka 5. Kódy a aminokyselinové sekvence peptidů použitých k testování substrátové specifity rhomboidních proteas.

Kód peptidu	Aminokyselinová sekvence
N-term	KRHDINHISKS
26	KRHDINHISKS-DTGIIFAA
27	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISL
28	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISLFLSL
29	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISLFLSLLFQP
30	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFG
31	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK
42	KRHDINHISKV-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK-NH ₂
43	KRHDINHSSKS-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK-NH ₂
44	KRHDINHISKF-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK-NH ₂
45	KRHDINHGSKS-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK-NH ₂
46	KRHDINHISKG-DTGIIFAAISLFLSLLFQPLFGLLSKK-NH ₂
47	KRHDINHISKS-DTGIIFAAISLFLSLLFAALFGLLSKK-NH ₂

Místo enzymového štěpení je v sekvenci naznačeno pomlčkou. Peptidy 42-47 byly na C-konci modifikovány amidací.

Bakteriální rhomboidní proteasy *E. coli* GlpG, *Bacillus subtilis* YqgP, *Providencia stuartii* AarA a *Bacteroides thetaiotaomicron* rhomboid 3 (BtioR3) a mutant aktivního místa GlpG.S201A byly exprimovány v *E. coli* C41(DE3) postupem popsaným v práci [155].

Enzymová reakce byla prováděna v pufru o složení 20 mM HEPES, pH 7,4, obsahujícím 10% (v/v) DMSO a 0,05% (m/v) dodecyl maltosidu (DDM). Reakce byla prováděna při 37 °C s koncentrací peptidového substrátu 250 μM a enzymu GlpG 2,6 μM. Pro stanovení počáteční rychlosti reakce byly v intervalu 15 min odebírány vzorky reakční směsi, ve kterých byla reakce zastavena přidáním HCl na výslednou koncentraci 10 mM.

Peptidové standardy pro identifikaci produktů štěpení byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na 1 mM koncentraci a zředěny 50 mM HEPES pufrům obsahujícím 0.05% (m/v) DDM na výslednou koncentraci peptidu 50 μ M.

4.3 Instrumentace

Experimenty, ve kterých byly studovány interakce DNA s interkalátorem EtBr a s oligofenylenovými deriváty byly prováděny na kapilárním elektroforetickém systému P/ACE MDQ DNA analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) řízeném software 32 Karat. Analyty byly detekovány UV-Vis absorpčním spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem při vlnové délce 214 nm. Byla použita křemenná kapilára s vnějším polyimidovým povlakem (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) o vnitřním průměru 50 μ m a vnějším průměru 375 μ m. Efektivní/celková délka kapiláry byla 30/40 cm. Vnitřní stěna kapiláry byla pokryta hydroxypropylcellulosovým (HPC) povlakem postupem popsáním v sekci 4.4.

Pro zkoumání interakcí helquatů s aromatickými anionickými sloučeninami a pro měření enzymové kinetiky proteas byl použit kapilární elektroforetický systém Agilent CE7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) vybavený UV-Vis absorpčním spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem pracujícím v rozsahu vlnových délek 190-600 nm. Pro experimenty s interakcemi helquatů byl přístroj vybaven shodnou kapilárou s HPC vnitřním povlakem jako ve výše uvedeném případě. Efektivní/celková délka kapiláry byla 40/48,5 cm nebo 56/64,5 cm.

Analýzy peptidových standardů a enzymaticky štěpených produktů byly provedeny v přístroji Agilent CE7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) s UV detekcí při vlnových délkách 192, 205 a 214 nm. Vlnová délka 192 nm (s šířkou pásma 4 nm) byla

zvolena pro kvantitativní vyhodnocení z důvodu nejvyššího odstupů signálu od šumu. Byla použita holá křemenná kapilára s polyimidovým vnějším povlakem (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 375 μm , efektivní délka 40 cm, celková délka 48,5 cm, dodaná od Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Kapilára byla temperována na 20 °C a karusel se vzorky byl chlazen na 20 °C pomocí externí vodní lázně.

4.4 Pokrývání vnitřní stěny křemenné kapiláry

Pro potlačení EOF a omezení adsorpce studovaných látek na vnitřní stěnu křemenné kapiláry byl použit povlak z hydroxypropylcellulosity (HPC, M_r 100000, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Jeho aplikace proběhla podle postupu popsánoho v práci [156] s určitými modifikacemi. Holá křemenná kapilára požadované délky (obvykle 2-3 m pro přípravu několika separačních kapilár) byla promyta 5% (m/v) roztokem HPC v deionizované vodě. K průchodu viskózního roztoku HPC kapilárou byla použita injekční pumpa s průtokem 10 $\mu\text{L}/\text{hod}$, případně bylo promytí uskutečněno aplikací vnějšího tlaku dusíku o hodnotě 8 bar. Celkem bylo kapilárou protlačeno cca 25 μL roztoku HPC.

V následujícím kroku byl roztok HPC z kapiláry odstraněn plynným dusíkem o tlaku 1 bar a kapilára byla promývána dusíkem k usušení přes noc. Následně byla kapilára za kontinuálního promývání dusíkem tlakem 1 bar zahřáta v peci plynového chromatografu na teplotu 140 °C (nárůst teploty 5 °C/min), která byla udržována po dobu 30 min. V těchto podmínkách je předpokládán vznik kovalentních etherových vazeb mezi molekulami HPC a silanolovými skupinami taveného křemene, který vede k imobilizaci HPC na vnitřní stěnu kapiláry [156].

Následně byla kapilára rozřezána na požadované délky a detekční okénko bylo vytvořeno rozpuštěním vnějšího polyimidového povlaku působením koncentrované kyseliny sírové zahřáté na 100 °C. Běžně používané techniky odstranění vnějšího polyimidového povlaku, jako je opálení plamenem či silným zahřátím, nejsou vhodné pro kapiláry s vnitřním povlakem, neboť vystavení vysoké teplotě by mohlo vést k poškození či degradaci vnitřního povlaku.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Interakce DNA s ethidium bromidem

a oligofenolenovými deriváty

V tomto projektu byla zkoumána interakce nově syntetizovaných oligofenolenových derivátů (OPD) s oligonukleotidovými fragmenty dvouvláknové DNA (double strand DNA, dsDNA). Jako modelová sloučenina byl použit dobře charakterizovaný interkalátor ethidium bromid.

5.1.1 Charakterizace studovaných látek

DNA

Molekuly DNA jsou polyelektrolyty, jejichž fosfátové skupiny jsou ve vodném prostředí při neutrálním a alkalickém pH plně disociované. Na jeden nukleotid připadá náboj -1 a celkový náboj molekuly DNA je pak přímo úměrný délce jejího řetězce. Z tohoto důvodu nelze dělit různě dlouhé molekuly DNA elektroforézou ve volném roztoku, neboť poměr náboje vůči velikosti molekuly (hydrodynamickému odporu) je pro různě dlouhé řetězce téměř totožný. Výjimkou jsou oligonukleotidy kratší než 20 nukleotidů, u kterých se ještě mohou projevit mírné rozdíly mezi hydrodynamickými vlastnostmi různě dlouhých řetězců, a tedy je možné provést jejich elektroforetickou separaci ve volném roztoku [157].

Dvojice jednovláknových molekul ssDNA (single strand DNA) s komplementárními sekvencemi bazí při vhodných podmínkách nekovalentně

interagují za vzniku dvouvláknové dsDNA. Stabilizujícími faktory tohoto komplexu jsou vodíkové můstky mezi nukleobasemi obou vláken DNA (které zároveň zprostředkovávají selektivitu v párování bází) a stacking interakce mezi sousedními nukleobasemi. Počet vodíkových vazeb má významný vliv na stabilitu komplexu, kterou lze charakterizovat teplotou tání vláken T_m . Poměr zastoupení A-T a G-C párů mezi nukleobasemi proto zásadně ovlivňuje hodnotu T_m konkrétní molekuly dsDNA, vyšší poměr G-C párů má stabilizující efekt a zvyšuje T_m . Protichůdný efekt, destabilizující duplex dsDNA, je elektrostatické odpuzování záporně nabitých fosfátových skupin vázaných v páteři molekuly. Při fyziologických podmínkách se molekuly DNA vyskytují v roztocích elektrolytů o iontové síle přibližně 160 mM [158]. Jejich anorganické kationty, především Na^+ a Mg^{2+} , vytvářejí stínící efekt vůči odpuzování mezi vlákny. Tudiž, pokud je při *in vitro* experimentech zvolena jiná než fyziologická koncentrace solí v roztoku obsahujícím molekuly dsDNA, může docházet k disociaci jinak stabilních dsDNA. Z tohoto důvodu bylo potřeba brát zřetel na iontovou sílu a složení roztoků, ve kterých byla prováděna měření s ohledem na potenciální destabilizaci dsDNA.

V tomto projektu byl jako modelová molekula dsDNA použit tzv. Dickersonův dodekamer. Jedná se o DNA se samo-komplementární sekvencí 5'-CGCGAATTCGCG-3', která vytváří dimer s kanonickou strukturou B-DNA [105]. Tato molekula vykazuje relativně nízkou T_m , která činí pouze 33 °C [159], a proto byly pro potřeby některých ověřovacích experimentů zvoleny delší oligonukleotidové sekvence s vyšším zastoupením G-C párů a s T_m až 87 °C.

Existují tři módy reverzibilní interakce malých molekul s dsDNA: a) látky interagující elektrostaticky s fosfátovými skupinami páteře DNA, b) látky interagující

s velkým či malým zářezem dsDNA prostřednictvím vodíkových vazeb, c) interkalátory, jejichž molekuly disponují schopností se vmezeřit mezi nukleobase a jsou stabilizovány hydrofobními a π - π interakcemi [160,161].

Oligofenylenové deriváty

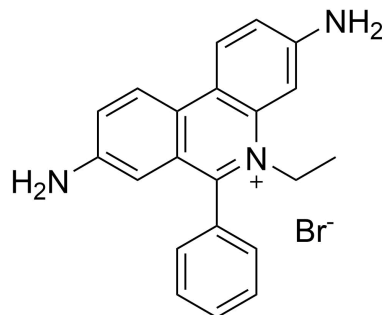
Oligofenyleny jsou látky obsahující řetězec tvořený di-substituovanými arylovými skupinami. Předmětem tohoto studia byly deriváty odvozené z *p*-oligofenylenů začleněním pyridiniových skupin, připojených prostřednictvím šestičlenného heterocyklu. Struktury zkoumaných oligofenylenových derivátů (OPD) jsou znázorněny v tabulce 2 (str. 55). Pro všechny čtyři testované sloučeniny je charakteristická přítomnost dvou kvarterních aminů, zodpovědných za permanentní kladný náboj +2 v širokém rozmezí pH. Ačkoliv jsou tyto molekuly tvořeny relativně velkým aromatickým systémem, přítomnost kvarterních amoniových skupin jim zajišťuje dobrou rozpustnost ve vodných prostředích [108].

Na základě předběžných experimentů prováděných metodou ultrafiltrace [109] byla zjištěna afinita těchto derivátů k dsDNA s vazebnými konstantami v řádu $10^2 - 10^3$ L/mol. Tyto hodnoty odpovídají afinitě dobře charakterizovaného interkalátoru dsDNA ethidium bromidu (EtBr), pro který se hodnoty vazebných konstant pohybují v závislosti na podmínkách a použité metodě měření v rozmezí $10^2 - 10^5$ L/mol [8].

Ethidium bromid (EtBr)

Na základě podobné síly interakce studovaných OPD s dsDNA byl dobře charakterizovaný interkalátor EtBr zvolen jako modelový interakční partner pro dsDNA. Struktura EtBr je zobrazena na obrázku 6. Podobně jako OPD disponuje EtBr

vícečlenným konjugovaným aromatickým systémem obsahujícím kvarterně vázaný dusík, zajišťující této sloučenině permanentní pozitivní náboj +1 v širokém rozmezí pH.



Obr 6. Struktura interkalátoru ethidium bromidu.

Interakce EtBr s dsDNA probíhá prostřednictvím vmezeření fenantridinového tříčlenného kruhu mezi nukleobase, čímž způsobí strukturní změnu dsDNA helixu a natažení jeho délky ve směru podélné osy. Přítomnost interkalátoru v molekule DNA má za následek narušení její biologické aktivity, zejména replikace a transkripce. Vznik komplexu mezi EtBr a dsDNA vede k výrazné změně jeho fluorescenčních vlastností, proto se EtBr často používá jako fluorescenční barvivo pro vizualizaci a kvantifikaci dsDNA [162,163]. Z důvodu relativní podobnosti struktur OPD a EtBr (přítomnost vícečlenného aromatického systému obsahujícího kvarterní dusík) lze zavést hypotézu, že interakce OPD s dsDNA probíhá též formou interkalace.

5.1.2 Volba experimentálních podmínek

Při výběru a následné optimalizaci experimentálních podmínek byl brán zřetel na fyzikálně-chemický charakter studovaných sloučenin. DNA jakožto homogenní polyelektrolyt získává v neutrálním a alkalickém pH záporný náboj a migruje jako

aniont. Všechny zkoumané molekuly použité jako její interakční partneři mají v těchto podmínkách permanentní kladný náboj a migrují jako kationty.

Složení BGE pro provádění afinitních experimentů bylo voleno s ohledem na potenciální budoucí aplikace studovaných OPD či jejich případných derivátů jako DNA senzitivní barviva, použitelná jak na izolovanou DNA *in vitro*, tak i na fluorescenční značení DNA uvnitř buněk. Hodnota pH uvnitř jádra savčích buněk se pohybuje v blízkosti pH 7,5 [164]. Z tohoto důvodu byla volba BGE omezena na pH v rozmezí 7,0 – 8,5. Úplná replikace fyziologických podmínek by vyžadovala iontovou sílu BGE odpovídající 160 mM. Takto vysoké iontové síly však nejsou vhodné pro zónovou elektroforézu, zejména z důvodu silné produkce Jouleova tepla vlivem vysoké elektrické vodivosti roztoku. Použité BGE byly proto kompromisem mezi imitací fyziologických podmínek a kompatibilitou s elektroforetickými technikami, přičemž byly testovány elektrolyty s nízkou i vysokou iontovou silou a též byl sledován vliv kationtů Mg^{2+} na stabilitu dsDNA.

V rámci vývoje a optimalizace metody PF-ACE na modelové interakci DNA-EtBr bylo testováno více BGE. Na základě dílčích výsledků byly vybrány dva pufrы pro provedení analýz interakce DNA s OPD. Složení těchto BGE je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6. Označení, složení, pH a iontová síla základních elektrolytů (BGE) použitých v této studii.

Označení	Složení BGE	pH	Iontová síla [mM]
BGE1	45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl	8,0	14,3
BGE2	50 mM H_3PO_4 , 90 mM NaOH, 1 mM $MgCl_2$	7,5	133

Iontová síla byla vypočítána programem PeakMaster [165].

Pufir BGE1 byl zvolen jako zástupce základního elektrolytu o nízké iontové síle. Pufry založené na borátech vykazují dobré separační vlastnosti především pro látky obsahující sacharidy. Testované vzorky DNA v nich byly separovány jako úzké zóny. Z důvodu relativně malé iontové síly (cca 4 mM) byly pro stabilizaci duplexu dsDNA do pufru přidány soli $MgCl_2$ a $NaCl$. Relativně nízká vodivost umožnila aplikaci vysokých separačních napětí, při zvoleném napětí 25 kV činila intenzita elektrického pole 625 V/cm a příkon odpovídal 1,06 W/m.

Pufir BGE2 byl zvolen jako zástupce základního elektrolytu o iontové síle blízké fyziologickým podmínkám. Vícenásobně disociované anionty kyseliny fosforečné přispívají k vysoké iontové síle roztoku, zároveň však jejich relativně střední mobilita měla za následek udržení elektrické vodivosti roztoku (a produkce Jouleova tepla) v mezích přijatelných pro kapilární elektroforézu. Z důvodu již vysokého zastoupení Na^+ iontů nebyl do roztoku přidán $NaCl$, který by dále přispíval ke zvyšování vodivosti BGE a u něhož byl pozorován výrazný vliv na rozšiřování zón DNA. Při zvoleném separačním napětí 20 kV (intenzita elektrického pole 500 V/cm) odpovídal příkon v tomto BGE 3,75 W/m.

5.1.3 Stabilita duplexu DNA

Dickersonův dodekamer použitý v této studii vykazoval poměrně nízkou stabilitu duplexu s predikovanou T_m 33°C. Tento fakt vedl k otázce, zda se DNA nachází ve formě duplexu během průchodu zónou ligandu. S ohledem na volbu experimentálního uspořádání docházelo k interakci obou zón v temperované části kapiláry nastavené na 20°C. Na základě literárních údajů [166] byla odhadnuta vnitřní teplota kapiláry 21°C

v případě BGE1 a 27°C v případě BGE2, což bylo v obou případech níže než predikované T_m .

Bylo provedeno několik dílčích experimentů s nižšími příkony a nižšími teplotami temperované části kapiláry, při kterých byly zóny DNA v elektroforegramech v obou BGE pozorovány jako jeden více či méně široký pík, a změny vazebných konstant byly zanedbatelné v rámci chyb měření. Z těchto experimentů vyplynulo, že i kdyby dsDNA disociovala při průchodu netemperovanou částí kapiláry, při vstupu do temperované oblasti dochází k opětovné asociaci jednotlivých DNA vláken a interakce s ligandem probíhá ve formě dsDNA.

5.1.4 Stabilita vnitřního povlaku kapiláry

a elektroosmotického toku

Pro zajištění detekce analytu separovaného v anionickém módu (tedy proti směru EOF v holé křemenné kapiláře) a zároveň pro potlačení adsorpce kationických ligandů na záporně nabitou stěnu kapiláry byl vnitřní povrch kapiláry upraven. Bylo testováno několik typů vnitřních povlaků, např. polyakrylamid, hydroxypropylcellulosa (HPC) a několik komerčních produktů. Z dostupných možností byl vybrán povlak tvořený HPC. Z hlediska trvanlivosti a stability potlačení EOF vykazoval podobné vlastnosti jako ostatní testované vnitřní povlaky, zároveň však umožňoval snadnou, cenově dostupnou a reprodukovatelnou přípravu v laboratorních podmínkách.

Stabilita vnitřního povlaku kapiláry byla proto hodnocena z hlediska sledování změn mobility EOF a pozorování projevů adsorpce zkoumaných látek na stěnu kapiláry. Mobilita EOF byla měřena CE metodou podle Williamse a Vigha [167] spočívající v zavedení tří zón neutrálního EOF markeru do kapiláry a v měření změn časových

rozestupů mezi zónami vyvolaných posunem jejich pozice vlivem EOF. Mobilita EOF byla vypočtena použitím vztahu:

$$\mu_{EOF} = \frac{t_3 - 2t_2 + t_1}{t_3 + t_{inj}/2} \cdot \frac{L_{det} \cdot L_{tot}}{(t_{elfo} - t_{ramp}/2) \cdot U} \quad (39)$$

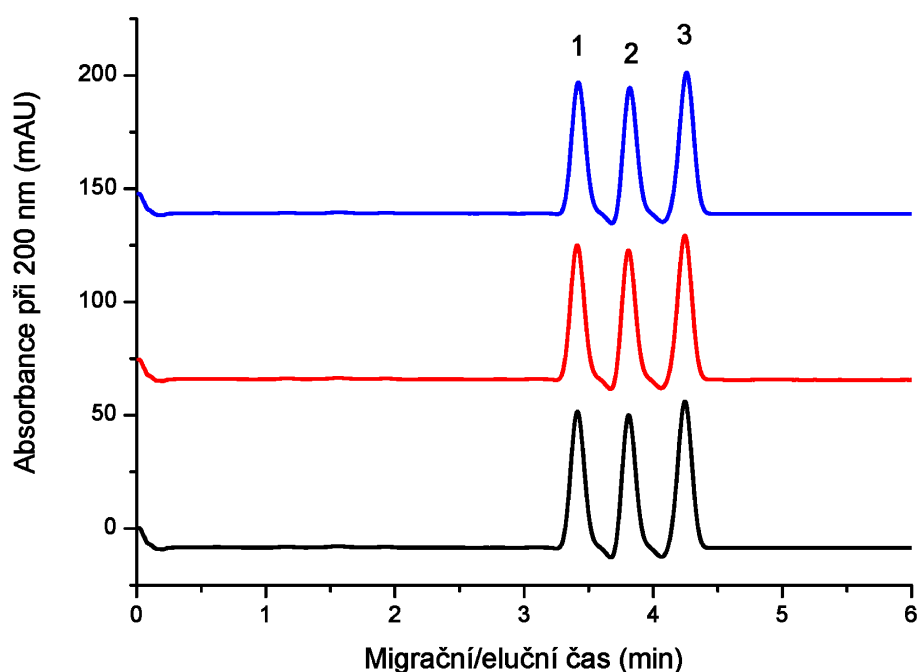
ve kterém t_1 , t_2 a t_3 jsou migrační/eluční časy píků neutrálního markeru, t_{inj} je injekční čas zón markeru, t_{elfo} je doba připojení separačního napětí, t_{ramp} je náběhový čas separačního napětí po zahájení CE experimentu, L_{det} je efektivní délka kapiláry, L_{tot} je celková délka kapiláry a U je vložené separační napětí.

Mobilita EOF v nově připravené kapiláře činila přibližně $0,50 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a v průběhu času pomalu vzrůstala. Při dosažení mobility EOF přibližně $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ byl již EOF mezi jednotlivými experimenty nestálý a kapilára byla vyměněna za novou. Průměrná doba použití kapiláry do její výměny činila přibližně dva týdny (zhruba 200 experimentů).

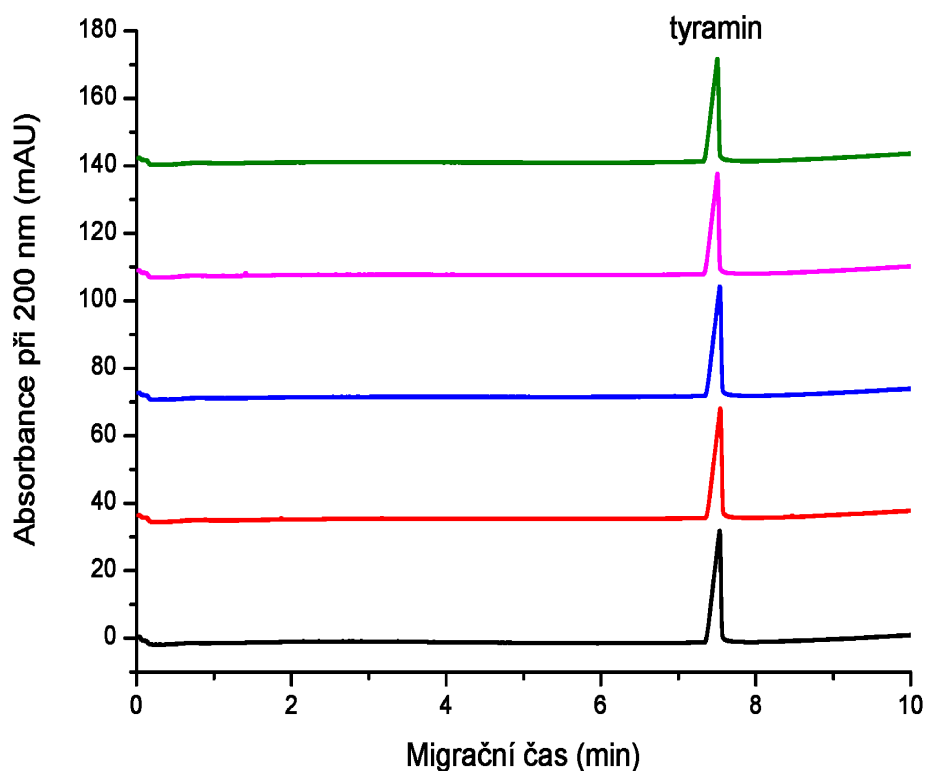
Nevýhodou této metody je nemožnost jejího použití současně s analýzou vzorku. Měření EOF mobility bylo proto nutno provádět před a po sérii afinitních experimentů a hodnoty EOF mobilit interpolovat. Pro monitorování EOF v průběhu analýz a jeho korekci na nulovou hodnotu byl použit mobilní marker – pro anionické analyty kyselina ftalová, pro kationické analyty tyramin. Požadavkem na marker bylo, aby měl relativně vysokou elektroforetickou mobilitu a zároveň absorboval UV záření pro jeho snadnou detekci. Obě uvedené sloučeniny splňují tyto předpoklady.

Mobilita markeru byla změřena v sérii nezávislých experimentů. V nově připravené kapiláře byla provedena tři měření EOF mobility podle Williamse a Vigha, následovaná pěti analýzami markeru v módu kapilární zónové elektroforézy, a zakončena opakováním tří měření mobility EOF. Mobilita markeru byla měřena

v příslušném BGE, při shodné teplotě a identickém vloženém napětí odpovídajícím podmínkám v PF-ACE experimentu. Odečtením mobility EOF od aparentní mobility markeru byla stanovena vlastní mobilita markeru, která byla následně používána pro korekce na mobilitu EOF.



Obr. 7 Tři záznamy měření EOF mobility CE metodou podle Williamse a Vigha [167]. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka). Tři zóny 1% (v/v) vodného roztoku neutrálního markeru mesityloxiidu (1, 2, 3) byly postupně nadávkovány (10 s x 20 mbar) s tím, že byly vždy odděleny zónami tvořenými BGE1 (45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, pH 8,0), dávkovanými tlakem 100 mbar po dobu 10 s. Mezi nadávkováním zóny 2 a 3 byla provedena elektroforéza (10 kV, 5 min). Následně byly zóny mobilizovány k detektoru tlakem 100 mbar. Stanovená mobilita EOF z těchto tří experimentů činila $(0,43 \pm 0,05) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.



Obr. 8 Ukázka pětinasobného měření mobility markeru tyraminu kapilární elektroforézou. BGE: 45 mM H₃BO₃, 5 mM Tris, 0,5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH 8,0. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka) temperovaná na 20 °C. Injekce 0,1 mg/mL vodného roztoku tyraminu 5 s x 20 mbar, separace při napětí +25 kV. Stanovená efektivní mobilita markeru po odečtení mobility EOF byla $(16,77 \pm 0,09) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

5.1.5 Optimalizace metody PF-ACE pro měření interakce DNA-ethidium bromid

Pilotní CE analýzy všech studovaných látek přinesly zjištění, že jako analyt je vhodné použít DNA. V případě OPD docházelo k výrazné distorzi tvaru píků vlivem adsorpce na stěnu kapiláry. Intenzita tohoto jevu měla vzrůstající tendenci, korelující se

zvyšující se hydrofobicitou OPD, přičemž píky OPD3 a OPD4 byly detekovány jen s velkými obtížemi. Z tohoto důvodu byly PF-ACE experimenty uspořádány tak, že DNA byla dávkována jako analyt na začátek kapiláry a EtBr a OPD byly aplikovány jako zóny ligandu v BGE. V takovém uspořádání se DNA pohybuje v anodickém směru k detektoru, zatímco ionizované molekuly EtBr a OPD v zóně ligandu migrují opačným (katodickým) směrem.

Jako nepřímý marker mobility EOF při každém experimentu byl zpočátku testován aniont kyseliny ftalové, přidaný ve formě hydrogentftalanu draselného v koncentraci 0,1 mg/mL k roztoku DNA. Z dílčích výsledků vyplynulo, že tato sloučenina při průchodu zónou ligandu vykazuje prodlužování migračního času přímo úměrného délce zóny ligandu způsobené interakcí s ligandem, a proto není vhodná pro použití jako nepřímý marker EOF. Jako vhodný marker byl zvolen kationický tyramin, který byl dávkován ve zvláštní zóně do výstupního konce kapiláry. Výhodou tohoto řešení bylo, že marker v průběhu migrace k detektoru nepřicházel do kontaktu se zónou ligandu a jeho mobilita nebyla ovlivněna potenciální interakcí se zkoumanými látkami.

5.1.6 Měření interakce DNA s oligofenylenovými deriváty

Po optimalizaci metody PF-ACE na modelu EtBr byly následně studovány interakce fragmentů dsDNA s oligofenylenovými deriváty. Konečné uspořádání experimentu bylo následující: Na začátku měření byla kapilára stabilizována promytím BGE (5 min při 2 bar) a použitím separačního napětí 20 kV po dobu 30 min. Následně byl změřen čas plnění kapiláry t_{fill} pomocí injekce neutrálního markeru mesityloxiidu 1% (v/v) (5 s při 20 mbar), který byl hydrodynamicky dopraven injekcí BGE směrem k detektoru tlakem 20 mbar, s trojitým opakováním.

Soubor PF-ACE experimentů se skládal z pěti opakování měřící série. Před každým měřením byla kapilára promyta BGE (1 min při 2 bar). V měřící sérii PF-ACE experimentů byl při konstantním tlaku 20 mbar zaváděn roztok ligandu, přičemž injekční čas ligandu byl v každém experimentu prodlužován o 0,5 min až na dobu 3 min, odpovídající délkám zóny 0 – 75 mm s krokem 12,5 mm. Následně byla zóna ligandu hydrodynamicky posunuta do temperované části kapiláry (20 °C) injekcí roztoku BGE tlakem 240 mbar po dobu 30 s, délka zóny BGE oddělující zóny ligandu a analytu na počátku experimentu odpovídala 150 mm.

DNA oligonukleotid byl zaváděn jako analyt (5 s při 20 mbar) a 0,1 mg/mL tyramin (použitý jako nepřímý marker mobility EOF při každém experimentu) byl vpravován do výstupního konce kapiláry (5 s při 6,7 mbar). Elektroforéza byla prováděna při -25 kV pro BGE1 a -20 kV pro BGE2 (katoda při injekčním vstupu kapiláry).

5.1.7 Výpočet vazebných konstant komplexů metodou

PF-ACE

Při experimentech PF-ACE byla v prvním kroku provedena korekce migračního času analytu na nulovou rychlost EOF. Jako nepřímý marker EOF byl použit tyramin. Tento marker byl dávkován ve zvláštní zóně do výstupního konce kapiláry. Na základě známé efektivní mobility markeru $\mu_{eff,M}$, stanovené pro dané BGE v odděleném experimentu, a naměřené aparentní mobility markeru, $\mu_{app,M}$, mohla být vypočítána mobilita elektroosmotického toku, μ_{EOF} :

$$\mu_{EOF} = \mu_{app,M} - \mu_{eff,M} \quad (40)$$

Odečtením μ_{EOF} od naměřené aparentní mobility analytu, $\mu_{app,A}$, mohla být stanovena jeho efektivní mobilita, $\mu_{eff,A}$:

$$\mu_{eff,A} = \mu_{app,A} - \mu_{EOF} \quad (41)$$

Z této hodnoty byl vypočítán efektivní migrační čas analytu A, t_A :

$$t_A = \frac{L_{det}}{\mu_{eff,A}} \frac{L_{tot}}{U} \quad (42)$$

kde L_{det} je efektivní délka kapiláry od injekčního konce k detektoru, L_{tot} celková délka kapiláry, a U vložené separační napětí.

Pro asociaci analytu a ligandu s jednoduchou stechiometrií 1:1, a za předpokladu uniformní intenzity elektrického pole, vodivosti a viskozity, lze vazebnou konstantu v PF-ACE experimentu vypočítat ze vztahu (38) odvozeného v práci Nilsson et al [78]. Jelikož byla v námi prováděných experimentech proměnou veličinou injekční čas ligandu t_L , byla tato rovnice upravena následujícím způsobem:

Látkové množství ligandu n v této rovnici (38) bylo vyjádřeno na základě známé koncentrace ligandu c a objemu zóny ligandu, která je funkcí průřezu kapiláry a délky zóny. Lze ji vyjádřit vztahem:

$$n = \pi r^2 \cdot c \cdot L_{det} \frac{t_L}{t_{fill}} \quad (43)$$

kde r je vnitřní poloměr kapiláry, t_L injekční doba roztoku ligandu a t_{fill} experimentálně zjištěný čas nutný k naplnění kapiláry zónou ligandu od injekčního konce po detektor. Dosazením za látkové množství n z rovnice (43) do rovnice (38) lze vazebnou konstantu vyjádřit jako funkci závislosti změny migračního času Δt na injekčním čase ligandu t_L :

$$K_b = \frac{1}{K_d} = \frac{t_{fill}}{c \cdot t_{0,det}} \frac{d \Delta t}{d t_L} \quad (44)$$

V této rovnici vystupují jako parametry známá koncentrace ligandu c , experimentálně zjištěný plnicí čas kapiláry t_{fill} , a efektivní migrační čas analytu bez přítomnosti ligandu v BGE (tj. pro nulovou délku zóny ligandu) $t_{0,det}$. Tato rovnice může být upravena do tvaru:

$$\Delta t = K_b \frac{c \cdot t_{0,det}}{t_{fill}} t_L \quad (45)$$

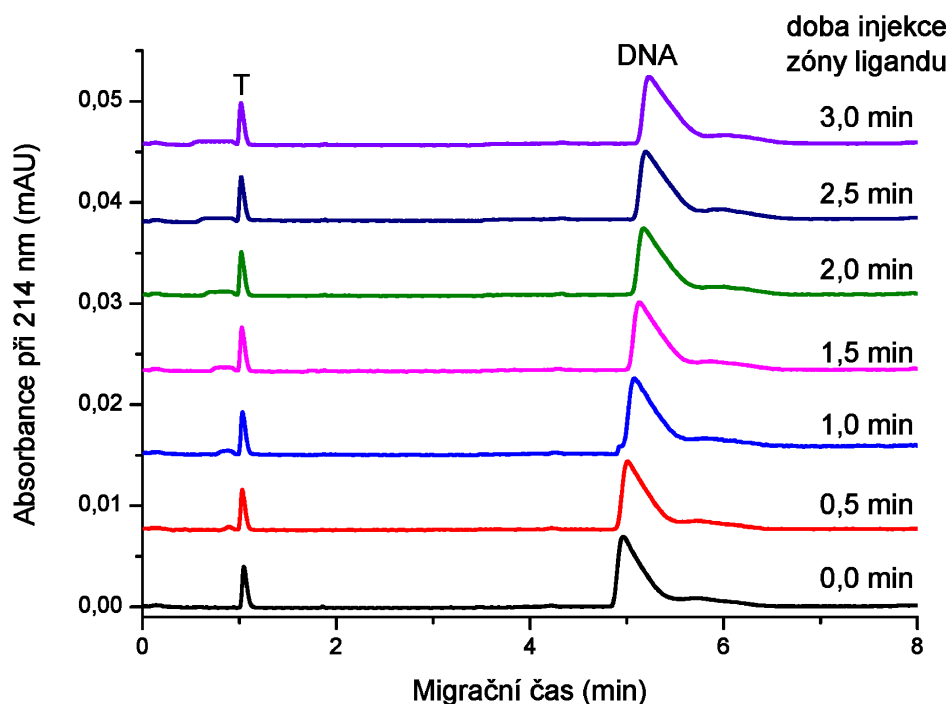
Vazebná konstanta byla v PF-ACE experimentech vypočítána ze směrnice lineární závislosti změn migračního času analytu (DNA) Δt na injekčním čase ligandu t_L . K provedení lineární regresní analýzy byl použit software Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

5.1.8 Výsledné charakteristiky studovaných interakcí

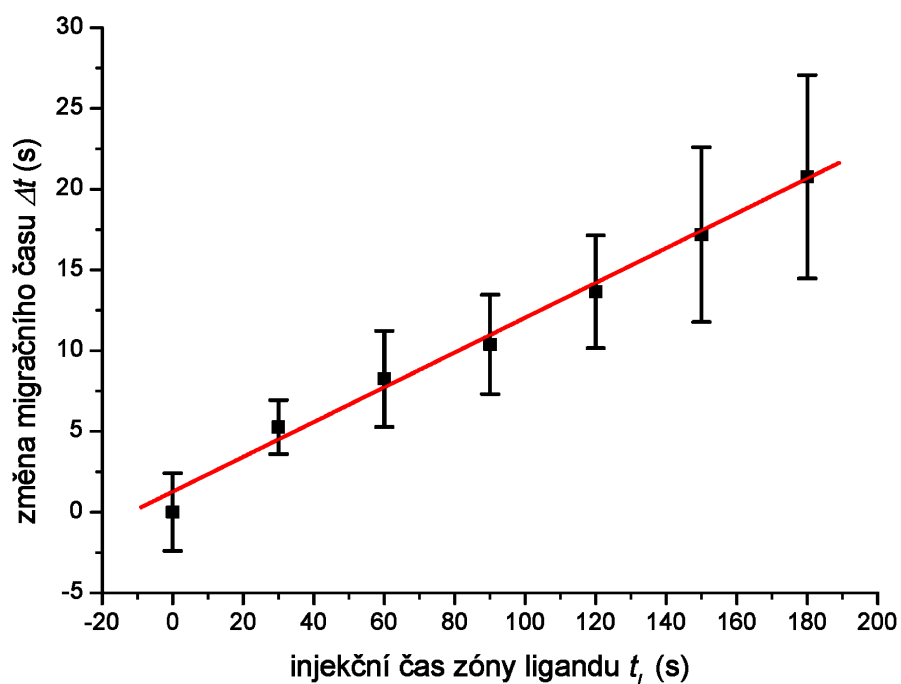
V rámci optimalizace metody PF-ACE byly studovány interakce dsDNA oligonukleotidů s modelovým interkalátorem ethidium bromidem (EtBr). Ukázka záznamu PF-ACE experimentu sledujícího interakci mezi Dickersonovým dodekamerem (DNA12) a EtBr v pufru BGE1 je na obrázku 9. S prodlužováním délky zóny ligandu (EtBr) docházelo ke zvyšování migračního času analytu (DNA). Tomuto experimentu odpovídající výnos závislosti změny migračního času DNA na injekčním čase zóny ligandu je zobrazen na obrázku 10. Ze směrnice této lineární závislosti byla vypočtena vazebná konstanta jejich komplexu 8130 ± 760 L/mol.

Srovnání změřených vazebných konstant komplexů DNA oligonukleotidů se sekvencemi o délkách 12-20 bazí s EtBr v pufru BGE1 (45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, pH 7,5) jsou zobrazeny na obrázku 11. Hodnoty vazebných konstant byly podobné pro DNA12 a oligonukleotidy odvozené prodloužením sekvence o A-T páry (cca 7000 L/mol). V případě oligonukleotidů

odvozených prodloužením sekvence o G-C páry byly s výjimkou DNA14gc hodnoty vazebných konstant výrazně menší (cca 2000 L/mol). Z těchto výsledků lze vyvozovat, že oligonukleotidy mají v čase průchodu zónou ligandu strukturu dsDNA, a v případě tepelně nejméně stálého oligonukleotidu DNA12 nedochází k disociaci vláken v průběhu elektroforézy. Z faktu, že vazebná konstanta nevzrůstá s prodlužováním oligonukleotidové sekvence lze usuzovat, že stechiometrie interakce je pro DNA12 i pro DNA20aa shodná a odpovídá poměru 1:1. Pokles vazebných konstant pro komplexy oligonukleotidových sekvencí odvozených od DNA12 prodloužením o G-C páry lze vysvětlit větší stabilitou duplexů dsDNA, která brání EtBr v interkalaci mezi nukleobase.

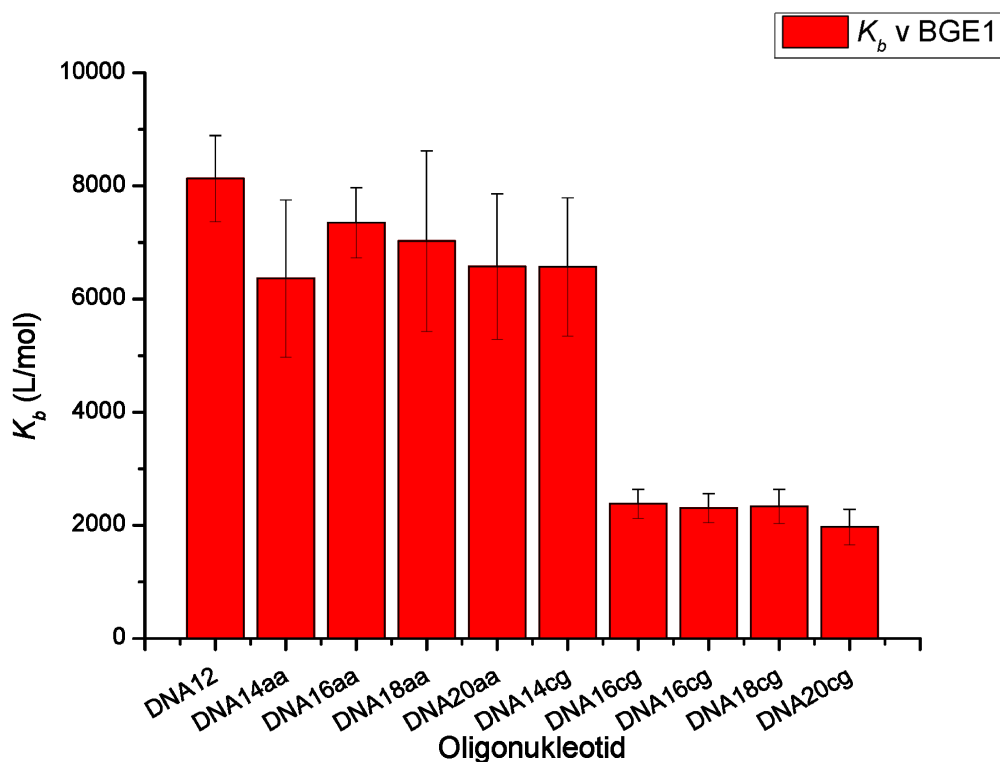


Obr. 9 Elektroforegramy dokumentující interakci mezi dodekamerem dsDNA a ethidium bromidem (EtBr). EtBr v 0,1 mM koncentraci v BGE1 (45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, pH 7,5) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 50 mbar po dobu 0–3 min s krokem 0,5 min. DNA o koncentraci 0,1 mM byla dávkována 10 s při 20 mbar, mobilní marker tyramin byl dávkován do výstupního konce kapiláry 5 s tlakem 6,7 mbar. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 30/40 cm efektivní/celková délka) temperovaná na 20 °C. Separace byla prováděna při napětí –25 kV. T, tyramin; DNA, oligonukleotid dsDNA.



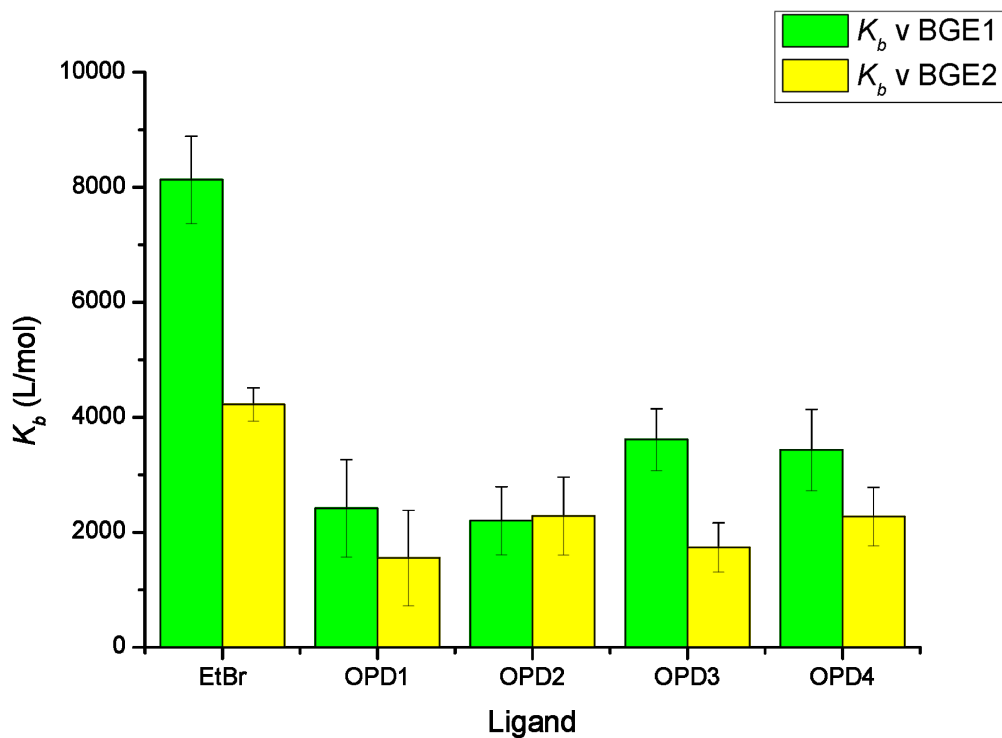
Obr. 10 Závislost změny migračních časů dsDNA dodekameru (DNA12), Δt , na délce injekčního času roztoku ligandu (ethidium bromidu), t_L .

Relativně vysoký rozptyl Δt byl způsoben použitím nízké koncentrace ligandu. Z tohoto důvodu jsou změny migračního času vyvolané vazbou mezi analytem a ligandem poměrně malé, tudíž se výrazněji projeví experimentální chyby CE aparatury a nestability EOF mezi jednotlivými měřeními. Použití vyšší koncentrace ligandu nebyly možné z důvodu ovlivnění vlastností BGE v zóně ligandu mimo limity předpokladů metody PF-ACE pro měření vazebných konstant (tj. nezanedbatelná změny vodivosti a viskozity).



Obr. 11 Graf porovnávající zjištěné vazebné konstanty, K_b , komplexů DNA oligonukleotidů s ethidium bromidem v pufru BGE1 (45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, pH 7,5).

V navazujících experimentech byla optimalizovaná metoda PF-ACE použita ke studiu interakce dsDNA oligonukleotidů s oligofenylenovými deriváty v prostředích o nízké (BGE1) a vysoké (BGE2) iontové síle. Zjištěné vazebné konstanty jsou zobrazeny v grafu na obrázku 12. Komplexy DNA s ethidium bromidem vykázaly přibližně 2-3x vyšší hodnoty vazebných konstant než komplexy DNA s testovanými oligofenylenovými deriváty. Stabilita komplexů byla nižší v pufru o vyšší iontové síle, což lze vysvětlit stínícím efektem iontů BGE na elektrostatický příspěvek vazebné interakce. Bylo prokázáno, že oligofenylenové deriváty mohou interagovat s fragmenty DNA s afinitou podobnou ethidium bromidu.



Obr. 12 Graf porovnávající zjištěné vazebné konstanty, K_b , komplexů Dickersonova dodekameru (DNA12) s ethidium bromidem a oligofenylenovými deriváty (OPD) v pufrch BGE1 (45 mM H_3BO_3 , 5 mM Tris, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, pH 8,0) a BGE2 (50 mM H_3PO_4 , 90 mM NaOH, 1 mM $MgCl_2$, pH 7,5).

5.2 Interakce helquatů s chirálními analyty

5.2.1 Volba experimentálních podmínek

Helquaty jsou tvořeny konjugovaným aromatickým systémem a disponují dvěma kvarterně vázanými dusíkovými heteroatomy, které jim poskytují permanentní kladný náboj v širokém rozmezí pH a zajišťují jejich dobrou rozpustnost ve vodných roztocích. Jako modelové analyty pro testování enantioselektivních interakcí helquatů byly vybrány chirální aromatické anionické sloučeniny, z nichž některé jsou používány jako léčiva nebo katalyzátory. Analyty byly rozpuštěny v 0,1 mM roztoku NaOH pro zajištění jejich ionizace a migrace jako anionty.

V experimentech studujících interakce helquatů s vybranými kyselými aromatickými chirálními sloučeninami byla použita metoda PF-ACE. Pro tuto metodu bylo zvoleno uspořádání, kdy helquaty jsou rozpuštěny v BGE a aplikovány jako zóny ligandů o různé délce, zatímco roztoky jejich studovaných interakčních partnerů byly dávkované jako analyty v krátké zóně na začátek kapiláry.

Analýzy byly prováděny na přístroji Agilent CE7100 s UV detekcí při vlnových délkách 200, 210, 220, a 230 nm (šířka pásma 4 nm, bez referenční vlnové délky). Pro vyhodnocení byly zvoleny vlnové délky, při kterých píky příslušného analytu vykazovaly největší odstup signálu od šumu. Byla použita kapilára s efektivní délkou 40 cm a celkovou délkou 48,5 cm, temperovaná na 20 °C. K potlačení EOF a zamezení sorpce zkoumaných látek na stěnu kapiláry by použit vnitřní povlak HPC. Přístroj byl dále vybaven externím termostatem pro temperování vzorkového karuselu, jehož teplota byla udržována na 20 °C (indikováno v ovládacím software Chemstation) při nastavení

teploty chladicí vody na 18 °C. Kontrola teploty vzorků a BGE umožnila přesnější dávkování zón ligandu a analytu, neboť byl odstraněn vliv variabilní vnější teploty na viskozitu roztoků při hydrodynamickém dávkování.

Jako BGE byl použit roztok 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8,1. Jeho složení zajišťovalo dobrou separaci zkoumaných látek při zachování nízké elektrické vodivosti roztoku. Jeho relativně nízká iontová síla (cca 20 mM) byla zvolena pro omezení stínícího efektu složek BGE na elektrostatický příspěvek interakce mezi opačně nabitými analyty a ligandy.

Na začátku měření byla kapilára ekvilibrována promytím BGE (2 bar x 5 min) a aplikací separačního napětí -25 kV po dobu 20 min. Na začátku každého měření byla kapilára promyta BGE (1 bar x 2 min). Následně byla dávkována zóna 1 mM ligandu aplikací tlaku 50 mbar po dobu 0, 1, 2 a 3 min, odpovídající délkám zóny 0, 43, 87, a 130 mm. Plnicí čas kapiláry t_{fill} (z rovnice 43) byl změřen v nezávislém experimentu jako 9,2 min pro naplnění efektivní délky kapiláry k detektoru (40 cm). Příslušné délky zón ligandu, L_L , byly vypočítány z podílu injekčního času zóny ligandu, t_L , k času plnění kapiláry k detektoru, t_{fill} , a efektivní délky kapiláry, L_{det} .

$$L_L = \frac{t_L}{t_{fill}} L_{det} \quad (46)$$

Pro účely screeningu nebyl použit nepřímý mobilitní marker v PF-ACE měřeních, ale mobilita EOF byla průběžně monitorována v nezávislých experimentech, a migrační časy analytů byly korigovány na intrapolovanou mobilitu EOF. Kapilára byla vyměněna, pokud mobilita EOF dosáhla hodnoty přibližně $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, případně pokud byla pozorována silná či ireverzibilní sorpce některých hydrofobních analytů na stěnu kapiláry.

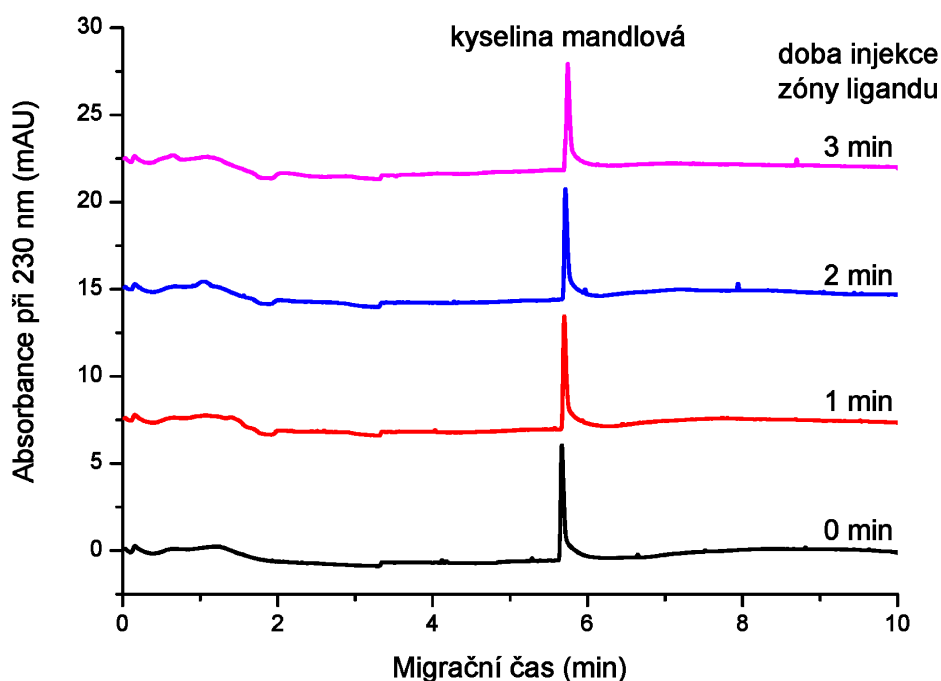
5.2.2 Výsledné charakteristiky studovaných interakcí

Mezi zkoumanými analyty a helquaty byly pozorovány tři typy interakcí:

Slabá nebo zanedbatelná interakce

Migrační čas analytu se v rámci chyby měření nezměnil bez ohledu na délku zóny ligandu přítomného v kapiláře. Příkladem slabé interakce je interakce mezi (*D,L*)-enantiomery kyseliny mandlové a sedmičlenným helquatem (*P*)-HQ1. Záznam PF-ACE experimentu je ukázán na obrázku 13.

Ačkoliv zóna kyseliny mandlové procházela zónou ligandu o délce 130 mm, migrační čas vzrostl pouze o 4,6 s (prodloužení o 1,3%). Takto malá změna potvrzuje, že interakce mezi analytem a ligandem je velmi slabá. Zároveň ukazuje, že přítomnost zóny ligandu měla jen zanedbatelný vliv na viskozitu roztoku a intenzitu elektrického pole, migrační čas analytu nebyl ovlivněn průchodem zónou ligandu. Tento výsledek validuje použití PF-ACE pro studium interakcí helquatů s kyselými aromatickými analyty v uspořádání, kde helquaty jsou aplikovány jako zóny ligandu.



Obr. 13 Elektroforegramy dokumentující slabou až zanedbatelnou interakci (*D*)- a (*L*)-enantiomerů kyseliny mandlové (racemická směs) s helquatem (*P*)-HQ1. Migrační čas analytu v rámci chyby měření zůstal konstantní nezávisle na délce zóny ligandu přítomného v kapiláře. Helquat v 1 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 50 mbar po dobu 0–3 min s krokem 1 min. Analyt o koncentraci 0,1 mM v 0,1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka). Separace byla prováděna při napětí -25 kV.

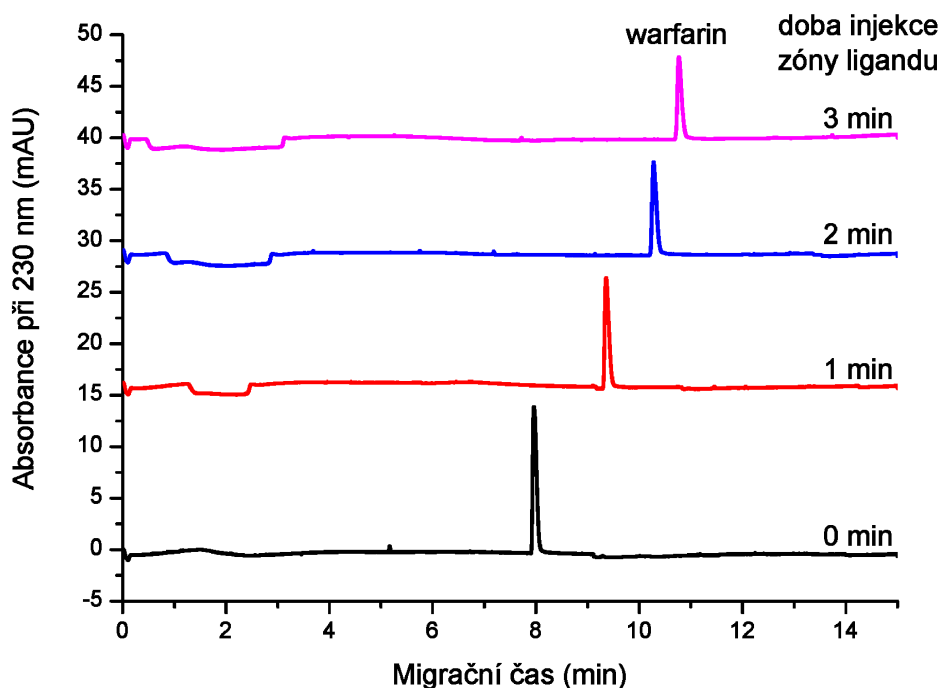
Běžná experimentální chyba migračního času, která byla pozorována v těchto PF-ACE experimentech, činila 1-1,5%. Taková změna migračního času by odpovídala K_b o hodnotě přibližně 50 L/mol. Jako slabé až zanedbatelné interakce byly označeny v tabulce 7 všechny interakce s $K_b < 50$ L/mol. Společným rysem analytů se slabou

afinitou k helquatům se jeví být přítomnost jednoduchého aromatického systému s jediným benzenovým jádrem, jako je např. kyselina mandlová a její deriváty.

Na základě těchto výsledků se metoda PF-ACE jeví méně vhodná pro studium slabých interakcí mezi analytem a ligandem než metoda klasické ACE s posunem mobility, v níž je celá délka kapiláry naplněna roztokem ligandu.

Středně silná neenantioselektivní interakce

Při středně silné neenantioselektivní interakci docházelo k prodlužování migračního času analytu v závislosti na délce zóny ligandu, ale enantiomery analytu nebyly odděleny a migrovaly společně v jedné zóně. Příkladem takové interakce je vazba mezi warfarinem a helquatem (*P*)-HQ2. Záznam PF-ACE experimentu je zobrazen na obrázku 14. Na základě závislosti změny migračního času analytu na délce zóny ligandu mohly být aplikací vztahu (45) vypočítány vazebné konstanty příslušných komplexů analyt-ligand (helquat), které jsou uvedeny v tabulce 7.

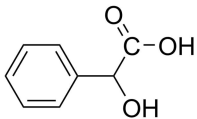
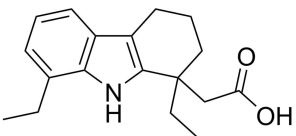
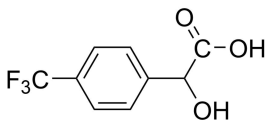
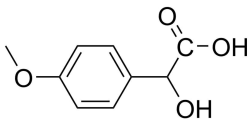
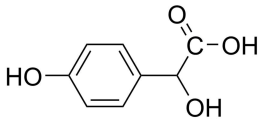
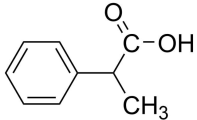
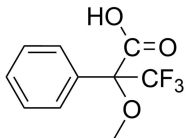
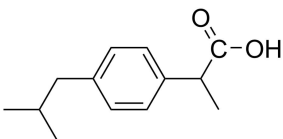


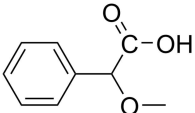
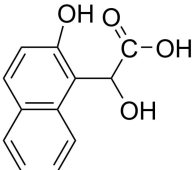
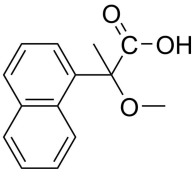
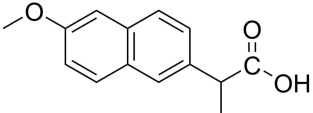
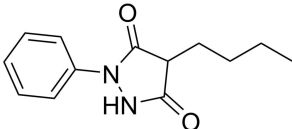
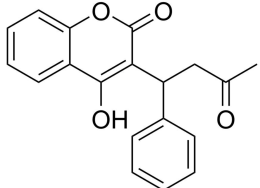
Obr. 14 Elektroforegramy dokumentující středně silnou neenantioselektivní interakci (*D*)- a (*L*)-enantiomerů warfarinu (racemická směs) s helquatem (*P*)-HQ2. Migrační čas analytu vzrůstal s prodlužováním zóny ligandu v kapiláře, ale enantiomnery analytu nebyly odděleny. Helquat v 1 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 50 mbar po dobu 0–3 min s krokem 1 min. Analyt o koncentraci 0,1 mM v 0,1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka). Separace byla prováděna při napětí -25 kV.

Charakteristickým rysem analytů, které vykázaly středně silnou interakci s helquaty, byla přítomnost vícečlenného aromatického systému. Lze předpokládat, že hlavními příspěvky ke stabilitě těchto komplexů jsou hydrofobní a π - π interakce mezi aromatickými systémy helquatů a příslušných analytů. Vzhledem k řádovému nadbytku

ligandu vůči analytu lze předpokládat, že v průběhu PF-ACE experimentů byla stechiometrie interakce 1:1.

Tabulka 7. Enantioselektivně nerozdělené analyty a vazebné konstanty K_b jejich slabých a středně silných komplexů s vybranými helquaty.

Analyt	K_b (L/mol)			
	(<i>P</i>)-HQ1	(<i>P</i>)-HQ2	(<i>P</i>)-HQ3	(<i>M</i>)-HQ4
	< 50	< 50	< 50	< 50
	133 ± 22	< 50	57 ± 1	59 ± 4
	< 50	< 50	< 50	< 50
	86 ± 19	830 ± 133	< 50	< 50
	< 50	469 ± 45	419 ± 41	< 50
	< 50	389 ± 59	360 ± 54	< 50
	< 50	263 ± 39	253 ± 38	< 50
	271 ± 62	202 ± 24	189 ± 28	56 ± 7

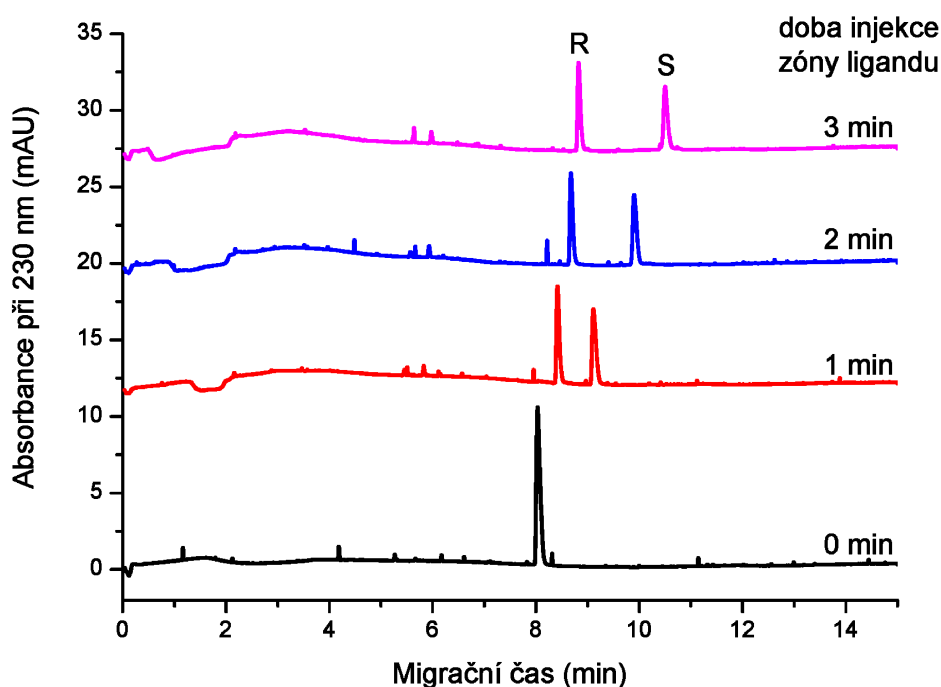
Analyt	K_b (L/mol)			
	(<i>P</i>)-HQ1	(<i>P</i>)-HQ2	(<i>P</i>)-HQ3	(<i>M</i>)-HQ4
	117 ± 29	1040 ± 180	119 ± 16	52 ± 5
	89 ± 13	768 ± 119	619 ± 46	56 ± 1
	< 50	506 ± 79	663 ± 118	57 ± 5
	88 ± 4	382 ± 54	485 ± 72	66 ± 1
	251 ± 55	230 ± 33	296 ± 45	58 ± 4
	137 ± 19	997 ± 153	266 ± 31	133 ± 3

Pozn. Běžná experimentální chyba změny migračního času pozorovaná v těchto PF-ACE experimentech činila 1-1,5%, což odpovídá K_b o hodnotě přibližně 50 L/mol. Jako slabé interakce jsou v této tabulce považovány všechny komplexy s $K_b < 50$ L/mol.

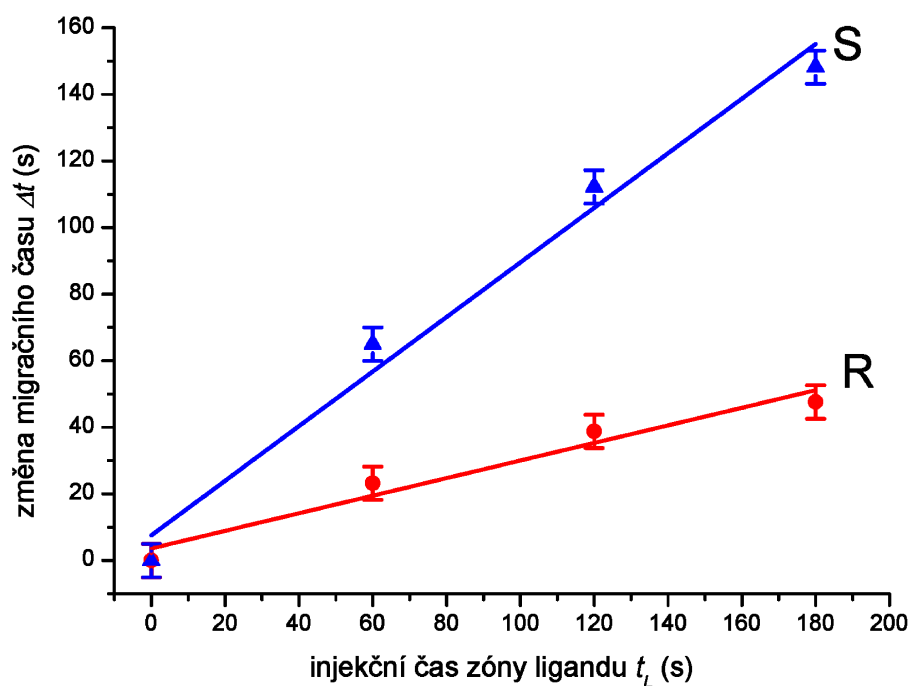
Enantioselektivní interakce

Při enantioselektivní interakci byly enantiomery analytu separovány jako dvě oddělené zóny a změny jejich migračních časů (a rozlišení jejich píků) vzrůstaly se vzrůstající délkou zóny ligandu. Z vybraných analytů byly úspěšně separovány na základní linii

pouze (*R,S*)-enantiomery 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (BNP). Záznam PF-ACE experimentů s helquatem (*P*)-HQ1 jakožto ligandem je zobrazen na obrázku 15 a odpovídající výnos závislosti změn migračního času na koncentraci ligandu je ukázán na obrázku 16.

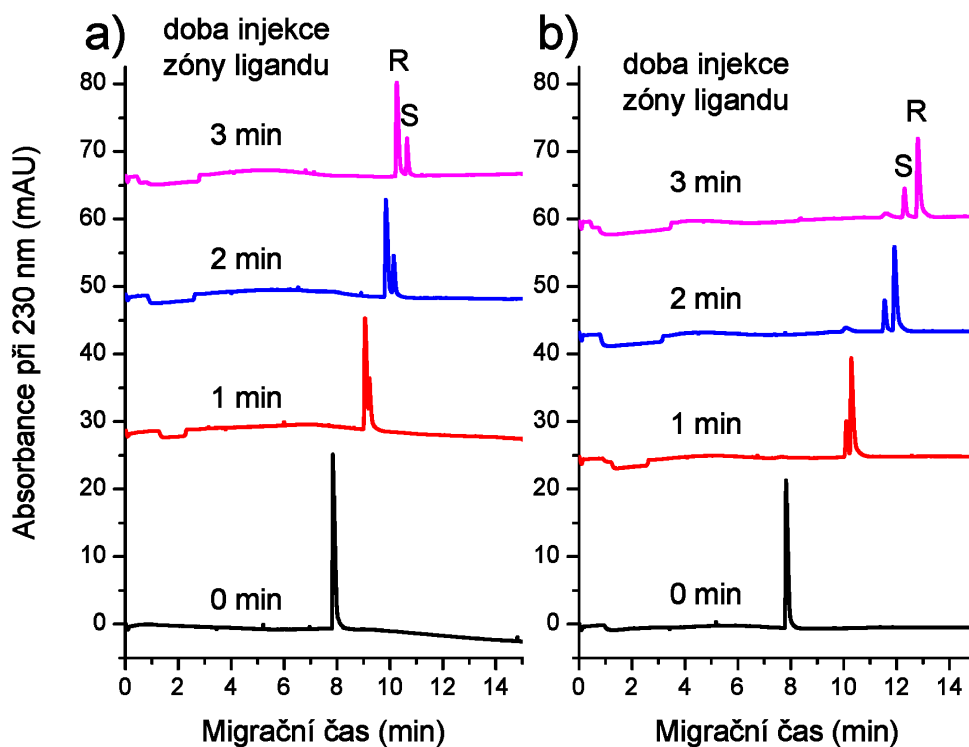


Obr. 15 Elektroforegramy dokumentující enantioselektivní interakci (*R*)- a (*S*)-izomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (BNP) (racemická směs) s helquatem (*P*)-HQ1. Enantiomery byly separovány jako dvě oddělené zóny. Jejich migrační časy a rozlišení jejich píků se zvětšují s prodlužováním zóny ligandu. Helquat v 1 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 50 mbar po dobu 0–3 min s krokem 1 min. Analyt o koncentraci 0,1 mM v 0,1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka). Separace byla prováděna při napětí -25 kV.



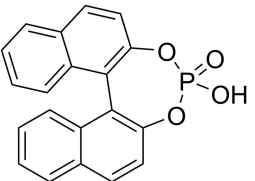
Obr. 16 Závislost změny migračních časů (*R*)- a (*S*)-enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (BNP), Δt , na délce injekčního času roztoku ligandu (helquatu (*P*)-HQ1), t_L . Enantiomer (*S*)-BNP interagoval s helquatem (*P*)-HQ1 silněji než (*R*)-enantiomer, proto je změna jeho migračního času větší než u (*S*)-enantiomeru.

Pro důkladnější charakterizaci interakce BNP s helquaty byla připravena směs enantiomerů BNP v koncentračním poměru (*R*):(*S*) = 3:1, která umožňovala určit migrační pořadí jednotlivých enantiomerů tohoto analytu. Enantioselektivnost interakce mezi helquaty a BNP byla dále demonstrována sledováním interakce BNP s oběma izomery helquatu. Příkladem jsou elektroforegramy na obrázku 17, kdy záměna selektoru (*P*)-HQ2 za opačný stereoizomer (*M*)-HQ2 měla za následek změnu migračního pořadí enantiomerů BNP. Změřené vazebné konstanty komplexů BNP enantiomerů s vybranými helquaty jsou uvedené v tabulce 8.



Obr. 17 Elektroforegramy demonstrující enantioselektivní interakce (*R*)- a (*S*)-enantiomerů (v koncentračním poměru 3:1) 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (BNP) s helquatem a) (*P*)-HQ2 b) (*M*)-HQ2. Migrační pořadí enantiomerů BNP se změnilo po záměně selektoru HQ2 za opačný stereoizomer. Migrační časy enantiomerů a rozlišení jejich píků se zvětšují s prodlužováním zóny ligandu. Helquat v 1 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 50 mbar po dobu 0–3 min s krokem 1 min. Analyt o koncentraci 0,1 mM v 0,1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka). Separace byla prováděna při napětí -25 kV.

Tabulka 8. Vazebné konstanty K_b komplexů (*R*)- a (*S*)-enantiomerů BNP s vybranými helquaty.

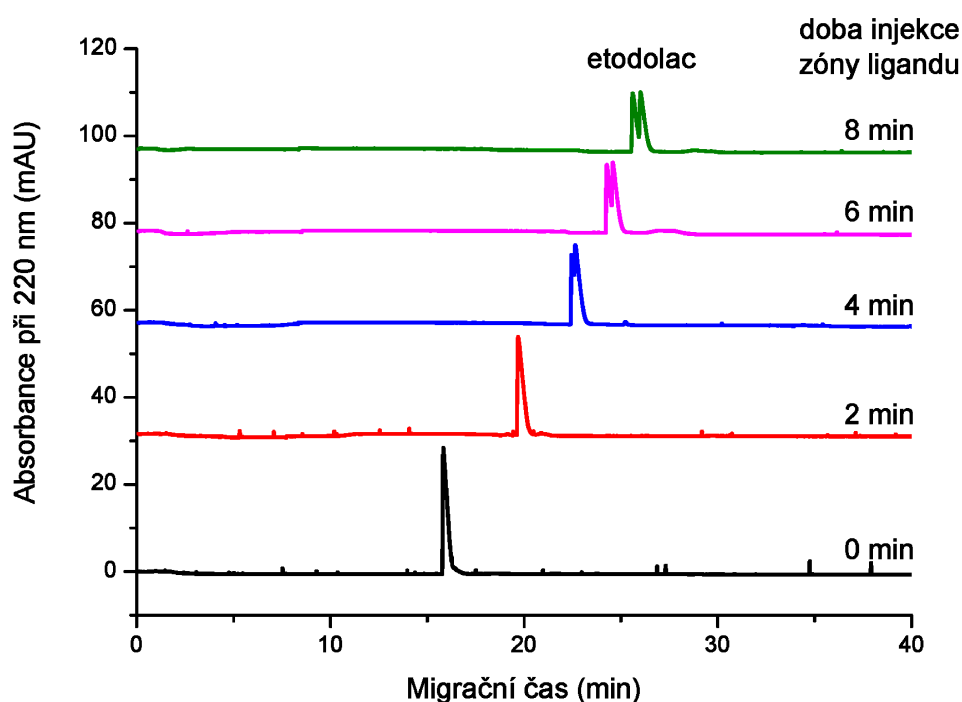
 1,1'-binaftyl-2,2'- diyl hydrogenofosfát (BNP)	Enantio- mer	K_b (L/mol)				
		(<i>P</i>)-HQ1	(<i>P</i>)-HQ2	(<i>P</i>)-HQ3	(<i>M</i>)-HQ4	(<i>P</i>)-HQ5
<i>R</i>		394 ± 77	870 ± 138	136 ± 9	332 ± 27	1246 ± 213
<i>S</i>		872 ± 124	1011 ± 150	229 ± 18	332 ± 27	1392 ± 236

Jako pravděpodobné vysvětlení původu enantioselektivní interakce mezi molekulami BNP a helquatů se jeví prostorová struktura molekuly BNP, která je principiálně podobná pětičlenným helicenům. Z tohoto důvodu může být na axiální chiralitu BNP nahlíženo jako na helicitu, (*S*)-BNP může být označen jako (*P*)-helix a (*R*)-BNP může být označen jako (*M*)-helix. V tomto kontextu je patrná vyšší afinita mezi enantiomery BNP a helquaty se stejnou helikální symetrií, viz tabulka 8. Enantiomer (*P*)-BNP (označený jako (*S*)-BNP v tabulce 8) vykazuje přibližně dvojnásobnou vazebnou konstantu komplexu s helquaty (*P*)-HQ1 a (*P*)-HQ3 než izomer (*M*)-BNP (označený jako (*R*)-BNP v tabulce 8). Nahrazením helquatu za opačný stereoisomer byly získány totožné hodnoty vazebných konstant s enantiomery BNP s tím rozdílem, že byl ve vazbě upřednostňován opačný enantiomer s identickou helicitou jako helquat. Shodná helicita pravděpodobně umožňuje větší kontaktní plochu aromatických systémů molekul BNP a helquatů, čímž přispívají k silnější hydrofobní a π - π stacking interakci.

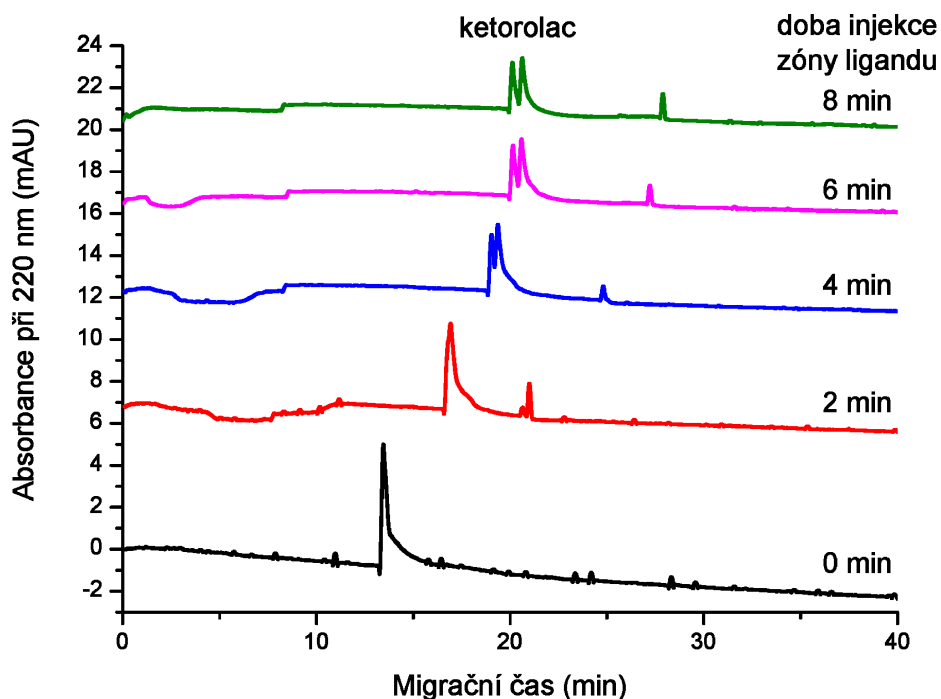
Výše uvedené uspořádání PF-ACE využívající relativně krátké zóny ligandu (do cca 25% efektivní délky kapiláry) se ukázalo jako nevhodné pro charakterizaci velmi

slabých komplexů a enantioselektivních interakcí s velmi malými rozdíly v mobilitách mezi diastereomerními komplexy. PF-ACE analýzy s některými analyty byly zopakovány v uspořádání, které se blížilo klasické ACE. Byla použita kapilára s delší efektivní/celkovou délkou 56,0/64,5 cm, koncentrace ligandu byla zvýšena na 10 mM a injekční čas ligandu byl prodloužen až na 8 min při tlaku 100 mbar, odpovídající délce zóny cca 50 cm. V takovémto uspořádání se podařilo částečně rozdělit enantiomery léčiv etodolac (obrázek 18) a ketorolac (obrázek 19). V těchto podmínkách již nejsou splněny předpoklady pro výpočet vazebných konstant metodou PF-ACE, odchylka změn migračního času od lineární závislosti na délce zóny ligandu je zřejmá zejména pro ketorolac.

Metoda PF-ACE se ukázala jako vhodná pro screening středně silné enantioselektivní interakce mezi helquaty a aromatickými kyselými analyty. Ze zkoumaných sloučenin byla sloučenina 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfát (BNP) identifikována jako látka s výrazně enantioselektivní interakcí se zkoumanými helquaty. Toto zjištění umožňuje její potenciální uplatnění jako katalyzátoru pro enantiospecifickou syntézu helquatů a příbuzných helikálních sloučenin.



Obr. 18 Elektroforegramy demonstrující enantioselektivní interakce (*R*)- a (*S*)-izomerů analytu etodolac (racemická směs) s helquatem (*P*)-HQ2. Jejich migrační časy a rozlišení jejich píků se zvětšují s prodlužováním zóny ligandu. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 56,0/64,5 cm efektivní/celková délka). Helquat v 10 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 100 mbar po dobu 0–8 min s krokem 2 min. Analyt o koncentraci 1 mM v 1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Separace byla prováděna při napětí -25 kV.



Obr. 19 Elektroforegramy demonstrující enantioselektivní interakce (*R*)- a (*S*)-izomerů analytu ketorolac (racemická směs) s helquatem (*P*)-HQ2. Jejich migrační časy a rozlišení jejich píků se zvětšují s prodlužováním zóny ligandu. Byla použita křemenná kapilára s HPC vnitřním povlakem (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 56,0/64,5 cm efektivní/celková délka). Helquat v 10 mM koncentraci v BGE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, pH 8.1) byl hydrodynamicky zaváděn do kapiláry jako zóna ligandu tlakem 100 mbar po dobu 0–8 min s krokem 2 min. Analyt o koncentraci 1 mM v 1 mM NaOH byl dávkován 10 s při 20 mbar. Separace byla prováděna při napětí -25 kV.

5.3 Sledování enzymového štěpení peptidových substrátů

5.3.1 Volba experimentálních podmínek

Peptidové substráty uvedené v tabulce 5 byly analyzovány v kyselém vodném základním elektrolytu (BGE) o složení 100 mM H_3PO_4 , 69 mM Tris, pH 2,5. V tomto prostředí migrovaly všechny zkoumané peptidy jako kationty. Kyselé pH zároveň vedlo k omezení disociace silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry a tím i k potlačení EOF. Pro separaci hydrofobních peptidů byl BGE modifikován přidáním 0.05 % (m/v) dodecyl maltosidu (DDM). Enzymová reakce byla prováděna v prostředí micel tvořených DDM za vzniku relativně hydrofobních produktů, proto byla koncentrace tohoto detergentu v BGE zvolena tak, aby odpovídala jeho koncentraci ve vzorku. To mělo omezit potenciální sorpci peptidů v průběhu elektroforetické analýzy, ale pro delší hydrofobní peptidy se to ukázalo jako nedostatečné.

Před každou analýzou byla kapilára postupně promyta následujícími roztoky pro odstranění možných zbytků hydrofobních peptidů a detergentů z předchozích analýz: (1) 100 mM dodecylsulfát sodný (SDS), (2) ethanol, (3) 1 M NaOH, (4) H_2O , (5) 1 M HCl, (6) BGE, všechny roztoky dávkovány tlakem 8 bar po dobu 30 s.

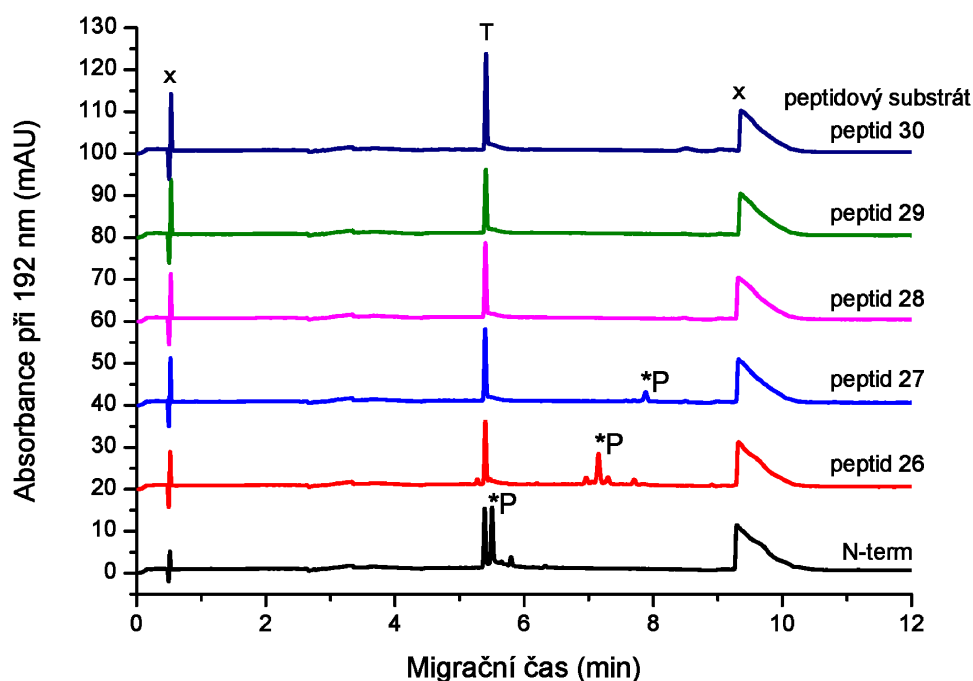
Vzorky pro CE byly připraveny smísením 20 μL 50 μM roztoku peptidu s 2 μL 2.2 mM vodného roztoku tyraminu/HCl na jeho výslednou koncentraci 200 μM . Tyramin sloužil jako interní standard pro kvantitativní analýzu. Vzorky byly nadávkovány do kapiláry 10 s při tlaku 20 mbar a separace byla provedena při +25 kV (anodické napětí

přivedeno na začátek kapiláry). Všechny analýzy byly provedeny v trojitém opakování. BGE v elektrodových nádobkách byl vyměněn po každém měření.

5.3.2 CE analýzy peptidových substrátů a produktů jejich

štěpení rhomboidními proteasami

V prvním kroku byly provedeny analýzy peptidových substrátů pro zjištění jejich elektromigračních vlastností a ověření schopnosti jejich detekce, aby mohly být posléze identifikovány produkty jejich enzymového štěpení rhomboidními proteasami. Elektroforegramy dokumentující analýzy peptidových substrátů jsou zobrazeny na obrázku 20. Z testovaných peptidů byly detekovány peptidy N-term, peptid 26 a peptid 27. Signál ostatních testovaných peptidů byl velmi slabý a nejednoznačný. Bylo pozorováno, že se vzrůstající délkou peptidového řetězce docházelo ke zhoršení kvality jejich separace, pravděpodobně z důvodu rostoucí hydrofobicity analytu a jejich sorpce na stěnu kapiláry. Tato sorpce nebyla potlačena ani v jiných experimentech, kde byly analýzy prováděny v módu micelární elektrokinetické chromatografie.

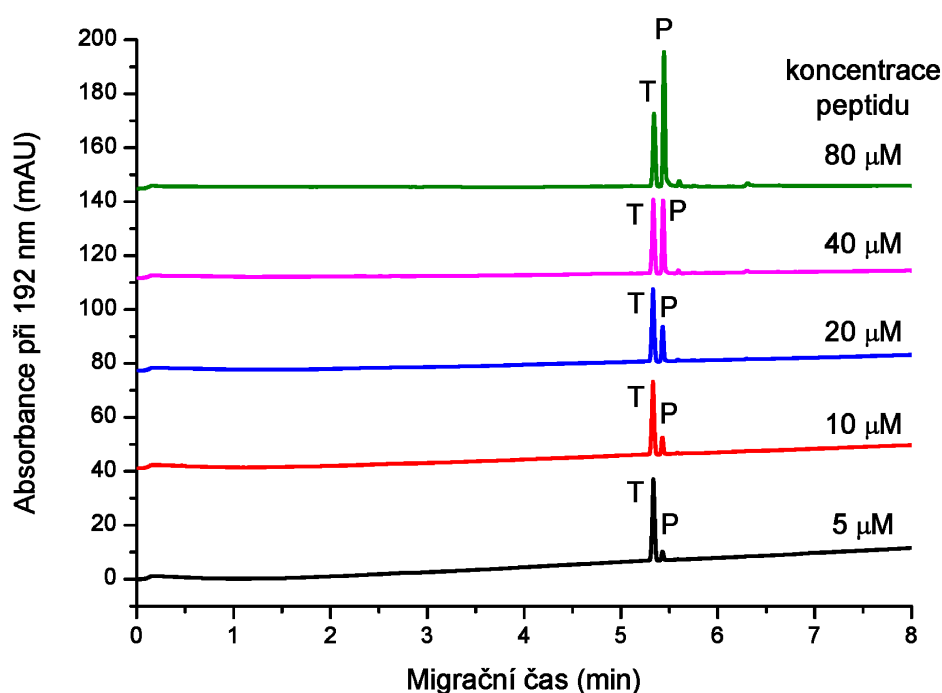


Obr. 20 Elektroforegramy dokumentující analýzy peptidových substrátů. Z testovaných peptidů byly detekovány peptidy N-term, peptid 26 a peptid 27. K 20 μL roztoku peptidu o koncentraci 50 μM byly přidány 2 μL 2,2 mM vodného roztoku tyraminu/HCl na jeho výslednou koncentraci 200 μM . Tyramin sloužil jako interní standard pro kvantitativní analýzu. Vzorek byl dávkovaný 10 s tlakem 20 mbar. CE analýzy byly prováděny v BGE tvořeném 100 mM H_3PO_4 , 69 mM Tris, 0.05 % (m/v) dodecyl maltosid (DDM), pH 2.5, v holé křemenné kapiláře (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka) při separačním napětí +25 kV. T, tyramin; *P, pík peptidu; x, příměsi ve vzorku.

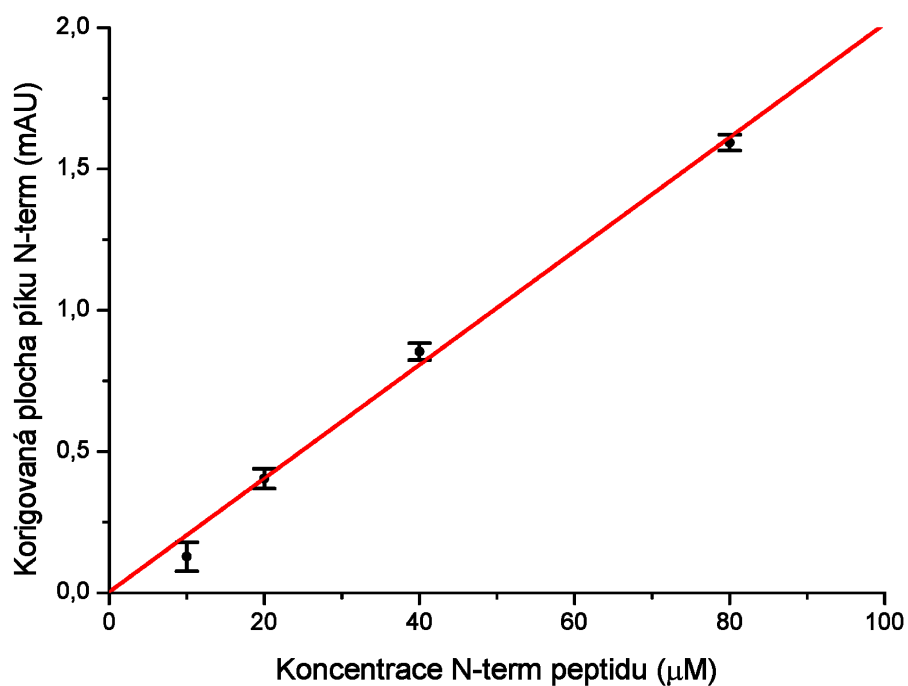
Na základě dílčích výsledků bylo zjištěno, že ve většině testovaných enzymových reakcí je produktem štěpení peptid N-term, v menším množství případů preferenčně vznikal s mnohem pomalejší kinetikou peptid 27. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že sledovaným produktem bude peptid N-term.

Kvantitativní analýza byla provedena na základě korigovaných ploch píků zkoumaných peptidů, normalizovaných vůči migračnímu času pomocí interního standardu tyraminu. Ke kvantifikaci koncentrace peptidu N-term vzniklého v enzymové reakci byla změřena kalibrační závislost korigované plochy jeho píku na jeho koncentraci. Vybrané elektroforegramy z těchto experimentů jsou demonstrovány na obrázku 21. Výnos závislosti korigovaných ploch píků N-term peptidu na jeho koncentraci je ukázán na obrázku 22.

Z experimentů vyplynulo, že koncentrace N-term peptidu cca 10 μM je na hranici detekce pro kvantitativní vyhodnocení. Dále pro koncentrace vyšší než cca 100 μM závislost korigované plochy píku peptidu na jeho koncentraci již vykazovala odchylku od linearit a pro kvantitativní vyhodnocování nebyla využívána.

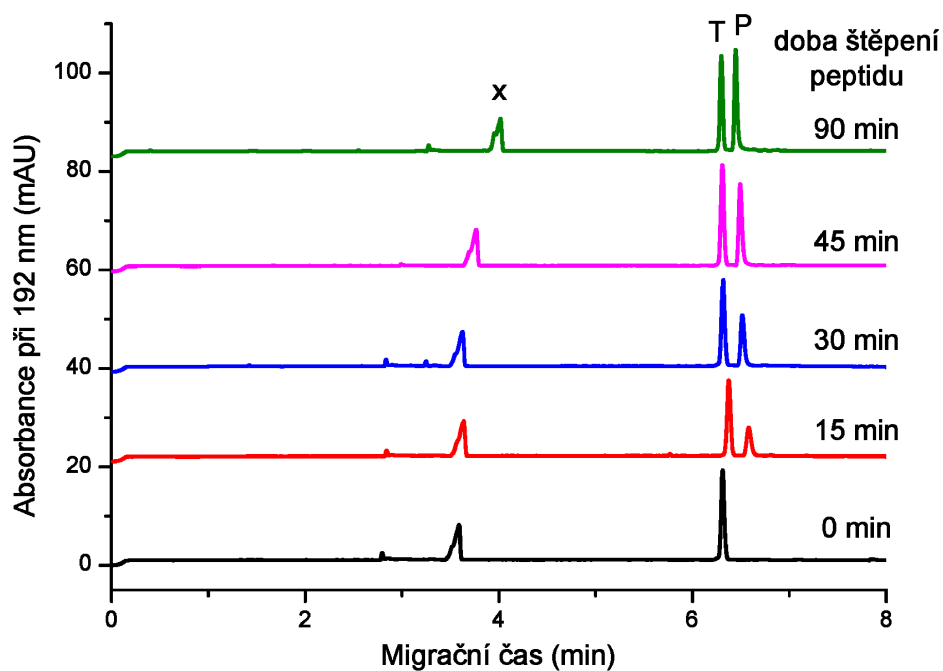


Obr. 21 Vybrané elektroforegramy dokumentující měření kalibrační závislosti plochy píku N-term peptidu na jeho koncentraci. Vzorky peptidu N-term byly připraveny smísením jeho roztoků o koncentracích 5 – 80 μM s 2,2 mM vodným roztokem tyraminu/HCl na jeho výslednou koncentraci 200 μM (sloužícím jako interní standard pro kvantitativní analýzu) a byly dávkovány 10 s tlakem 20 mbar. CE analýzy byly prováděny v BGE tvořeném 100 mM H_3PO_4 , 69 mM Tris, 0.05 % (m/v) dodecyl maltosid (DDM), pH 2.5, v holé křemenné kapiláře (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka) při separačním napětím +25 kV. T, tyramin; P, pík peptidu N-term.



Obr. 22 Kalibrační závislost korigované plochy píku peptidu N-term na jeho koncentraci.

Byly provedeny enzymové reakce zkoumající štěpení vybraných peptidových substrátů a jejich derivátů modifikovaných připojením fluorescenčních skupin některými rhomboidními proteasami. Elektroforegramy demonstrující štěpení peptidového substrátu KSp31 (fluorescenčního derivátu peptidu 31) rhomboidní proteasou (GlpG, divoký typ) jsou zobrazeny na obrázku 23. V čase zahájení štěpení je detekován pouze pík markeru tyraminu (T). V průběhu štěpení se objevuje nový pík produktu (pík P), odpovídající peptidu N-term, jehož velikost se v průběhu času zvětšuje.



Obr. 23 Elektroforegramy demonstrující štěpení peptidového substrátu KSp31 rhomboidní proteasou (GlpG, divoký typ). Vzorky pro CE analýzy byly připraveny smísením 20 μL zastavené reakční směsi s 2 μL 2.2 mM vodného roztoku tyraminu/HCl a byly dávkovány 10 s při 20 mbar. CE analýzy byly prováděny v BGE tvořeném 100 mM H_3PO_4 , 69 mM Tris, pH 2.5, v holé křemenné kapiláře (50/375 μm vnitřní/vnější průměr, 40/48.5 cm efektivní/celková délka) při separačním napětí +25 kV. P, produkt reakce (odštěpený peptid N-term); T, tyramin (200 μM interní standard pro kvantitativní vyhodnocení); x, příměs ve vzorku.

Peptidový substrát KSp31 (fluorescenční derivát peptidu 31) byl z testovaných peptidů štěpen vybranými rhomboidními proteasami s nejvyšší počáteční rychlostí vzniku produktu, proto byl vybrán jako kandidát pro další studium s cílem vývoje substrátu pro testování rhomboidních proteas. Navazující experimenty již byly prováděny s přímým sledováním enzymové reakce on-line fluorescenční detekcí vznikajícího produktu a nejsou součástí této disertační práce.

6 Závěr

V rámci této disertační práce byly metody kapilární elektroforézy (CE) a afinitní kapilární elektroforézy s částečným plněním (PF-ACE) využity při studiu (bio)molekulových interakcí a sledování proteolytických enzymových reakcí.

Byla vyvinuta PF-ACE metoda umožňující studium interakcí dvouvláknových DNA oligonukleotidů s ethidium bromidem nebo oligofenylenovými deriváty. Metoda byla optimalizována na sledování interakce dobře charakterizovaného interkalátoru ethidium bromidu s DNA oligonukleotidy, následně byly změřeny vazebné konstanty komplexů oligonukleotidů DNA s oligofenylenovými deriváty. Změřené vazebné konstanty těchto komplexů se pohybovaly v řádu $10^3 - 10^4$ L/mol, přičemž oligofenylenové deriváty se vázaly slaběji než ethidium bromid. Výsledky této studie byly základem pro publikaci I.

Metoda PF-ACE je se ukázala jako vhodný nástroj pro screening středně silných enantioselektivních interakcí mezi helquaty a chirálními aromatickým kyselými analyty. Ze zkoumaných sloučenin byla sloučenina 1,1'-binaftyl-2,2'-diyl hydrogenfosfát (BNP) identifikována jako látka s výrazně enantioselektivní interakcí se zkoumanými helquaty. Toto zjištění umožňuje její potenciální uplatnění jako katalyzátoru pro enantiospecifickou syntézu helquatů a příbuzných helikálních sloučenin. Dále byly v uspořádání blízkém klasické afinitní kapilární elektroforéze s posunem mobility částečně rozděleny enantiomery léčiv etodolac a ketorolac. Bylo potvrzeno, že helquaty lze použít jako chirální selektory pro určité typy chirálních analytů. Výsledky této studie byly základem pro publikaci II.

Metoda kapilární elektroforézy byla optimalizována pro sledování štěpení peptidových substrátů rhomboidními proteasami. Derivát KSp31 byl z testovaných peptidů štěpen vybranými rhomboidními proteasami s nejvyšší počáteční rychlostí vzniku produktu, proto byl vybrán jako kandidát pro další studium s cílem vyvinout vhodný substrát pro testování rhomboidních proteas. Výsledky této studie byly základem pro publikaci III.

7 Seznam použité literatury

- [1] Atkins, P. W., Bartovská, L., De Paula, J., Fyzikální Chemie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2013, pp. 194–228.
- [2] Irudayam, S. J., Henchman, R. H., Entropic cost of protein-ligand binding and its dependence on the entropy in solution. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 5871–5884.
- [3] Lambrinidis, G., Vallianatou, T., Tsantili-Kakoulidou, A., In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 86, 27–45.
- [4] Michalcová, L., Glatz, Z., Nové směry ve studiu biomolekulárních interakcí pomocí kapilární elektroforézy. *Chem. List.* 2016, 110, 249–257.
- [5] Chen, Z., Weber, S. G., Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 738–748.
- [6] Winzor, D. J., Determination of binding constants by analogous procedures in size exclusion chromatography and capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 2008, 383, 1–17.
- [7] Segoviano-Garfias, J. J. N., Mendoza-Díaz, G., Moreno-Esparza, R., Spectrophotometric determination of the formation constants of the cupric halogen complexes with 1,3-propanediamine and 1,4-butanediamine in methanol solution and their activity on the oxidative coupling of the 2,6-di-tert-butylphenol. *Inorganica Chim. Acta* 2013, 400, 184–190.
- [8] Yamaoka, K., Matsuda, T., Shiba, D., Takatsuki, M., Interaction between ethidium bromide and various polyelectrolytes and DNA with emphasis on spectral characteristics and binding curves of the bound dye. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1982, 55, 1300–1305.
- [9] Kashanian, S., Javanmardi, S., Chitsazan, A., Paknejad, M., Omidfar, K., Fluorometric study of fluoxetine DNA binding. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2012, 113, 1–6.
- [10] Zhang, G., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Spectroscopic studies of cyanazine binding to calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a probe. *Sensors Actuators, B Chem.* 2013, 182, 453–460.
- [11] Brown, A., Analysis of cooperativity by isothermal titration calorimetry. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 3457–3477.

- [12] Pierce, M. M., Raman, C. S., Nall, B. T., Isothermal titration calorimetry of protein–protein interactions. *Methods* 1999, 19, 213–221.
- [13] Andrási, M., Lehoczki, G., Nagy, Z., Gyémánt, G., Pungor, A., Gáspár, A., A comparative study of capillary electrophoresis and isothermal titration calorimetry for the determination of binding constant of human serum albumin to monoclonal antibody. *Electrophoresis* 2015, 36, 1274–1281.
- [14] Jing, M., Song, W., Liu, R., Binding of copper to lysozyme: Spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016, 164, 103–109.
- [15] Basu, A., Suresh Kumar, G., Calorimetric investigation on the interaction of proflavine with human telomeric G-quadruplex DNA. *J. Chem. Thermodyn.* 2016, 98, 208–213.
- [16] Kumar, G. S., Basu, A., The use of calorimetry in the biophysical characterization of small molecule alkaloids binding to RNA structures. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2016, 1860, 930–944.
- [17] Zhou, M., Li, Q., Wang, R., Current Experimental Methods for Characterizing Protein-Protein Interactions. *ChemMedChem* 2016, 11, 738–756.
- [18] Syafrizayanti, Betzen, C., Hoheisel, J. D., Kastelic, D., Methods for analyzing and quantifying protein-protein interaction. *Expert Rev. Proteomics* 2014, 11, 107–120.
- [19] Kabiri, M., Unsworth, L. D., Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: Peptide self-assembly and protein adsorption case studies. *Biomacromolecules* 2014, 15, 3463–3473.
- [20] Fielding, L., NMR Methods for the Determination of Protein- Ligand Dissociation Constants. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, 3, 39–53.
- [21] Takeuchi, K., Wagner, G., NMR studies of protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006, 16, 109–17.
- [22] Oxenoid, K., Chou, J. J., A functional NMR for membrane proteins: Dynamics, ligand binding, and allosteric modulation. *Protein Sci.* 2016, 25, 959–973.
- [23] Cala, O., Guillière, F., Krimm, I., NMR-based analysis of protein-ligand interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 943–956.
- [24] Stark, J. L., Powers, R., Application of NMR and molecular docking in structure-based drug discovery. *Top. Curr. Chem.* 2012, 326, 1–34.

- [25] Williamson, M. P., Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2013, 73, 1–16.
- [26] Jonker, N., Kool, J., Irth, H., Niessen, W. M. A., Recent developments in protein-ligand affinity mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 2669–81.
- [27] Boeri Erba, E., Zenobi, R., Mass spectrometric studies of dissociation constants of noncovalent complexes. *Annu. Reports Sect. "C" (Physical Chem.* 2011, 107, 199–228.
- [28] Benesch, J. L. P., Ruotolo, B. T., Simmons, D. A., Robinson, C. V., Protein Complexes in the Gas Phase: Technology for Structural Genomics and Proteomics. *Chem. Rev.* 2007, 107, 3544–3567.
- [29] Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 69, 93–105.
- [30] Tiselius, A., A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* 1937, 33, 524–531.
- [31] Vespalec, R., Boček, P., Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities. *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 431–445.
- [32] Tanaka, Y., Terabe, S., Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 768, 81–92.
- [33] Jiang, C., Armstrong, D. W., Use of CE for the determination of binding constants. *Electrophoresis* 2010, 31, 17–27.
- [34] Oravcová, J., Böhs, B., Lindner, W., Drug-protein binding studies new trends in analytical and experimental methodology. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1996, 677, 1–28.
- [35] Amini, A., Westerlund, D., Evaluation of association constants between drug enantiomers and human alpha 1-acid glycoprotein by applying a partial-filling technique in affinity capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1425–1430.
- [36] Neubert, R. H. H., Ruttinger, H. H., Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 2003.

- [37] Štěpánová, S., Kašička, V., Capillary electrophoretic methods applied to the investigation of peptide complexes. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 2708–21.
- [38] Marie, A.-L., Tran, N. T., Bianchini, E. P., Saller, F., Pautus, S., Abache, T., Plantier, J.-L., Urbain, R., Borgel, D., Taverna, M., A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 111, 64–70.
- [39] Ehala, S., Kašička, V., Makrlík, E., Determination of stability constants of valinomycin complexes with ammonium and alkali metal ions by capillary affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 2008, 29, 652–657.
- [40] Ehala, S., Makrlík, E., Toman, P., Kašička, V., ACE applied to the quantitative characterization of benzo-18-crown-6-ether binding with alkali metal ions in a methanol-water solvent system. *Electrophoresis* 2010, 31, 702–708.
- [41] Varenne, F., Bourdillon, M., Meyer, M., Lin, Y., Brellier, M., Baati, R., Charbonnière, L. J., Wagner, A., Doris, E., Taran, F., Hagège, A., Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenation for the determination at the nanogram scale of metal affinities and binding constants of phosphorylated ligands. *J. Chromatogr. A* 2012, 1229, 280–287.
- [42] Chankvetadze, L., Servais, A.-C., Fillet, M., Salgado, A., Crommen, J., Chankvetadze, B., Comparative enantioseparation of talinolol in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis and study of related selector-selectand interactions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 206–16.
- [43] Huang, T., Pawliszyn, J., Axially illuminated fluorescence imaging detection for capillary isoelectric focusing on Teflon capillary. *Analyst* 2000, 125, 1231–1233.
- [44] Borges, E. M., Volmer, D. A., Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. Part II: Chemical and thermal stability. *J. Chromatogr. Sci.* 2015, 53, 1107–1122.
- [45] Opekar, F., Štulík, K., Some important combinations of detection techniques for electrophoresis in capillaries and on chips with emphasis on electrochemical principles. *Electrophoresis* 2011, 32, 795–810.
- [46] Kašička, V., Teoretické základy a separační principy kapilárních electromigračních metod. *Chem. List.* 1997, 91, 320–329.
- [47] Rathore, A. S., Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 2002, 23, 3827–3846.

- [48] Kirby, B. J., Hasselbrink, E. F., Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis* 2004, 25, 187–202.
- [49] Ghosal, S., Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2004, 25, 214–228.
- [50] Klepárník, K., Boček, P., Theoretical background for clinical and biomedical applications of electromigration techniques. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1991, 569, 3–42.
- [51] Musheev, M. U., Filiptsev, Y., Krylov, S. N., Temperature difference between the cooled and the noncooled parts of an electrolyte in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 2010, 82, 8692–8695.
- [52] Geffertová, D., Ali, S. T., Šolínová, V., Krečmerová, M., Holý, A., Havlas, Z., Kašička, V., Investigation of the acid-base and electromigration properties of 5-azacytosine derivatives using capillary electrophoresis and density functional theory calculations. *J. Chromatogr. A* 2017, 1479, 185–193.
- [53] Berezovski, M., Krylov, S. N., Thermochemistry of protein-DNA interaction studied with temperature-controlled nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *Anal. Chem.* 2005, 77, 1526–1529.
- [54] Varenne, A., Descroix, S., Recent strategies to improve resolution in capillary electrophoresis-A review. *Anal. Chim. Acta* 2008, 628, 9–23.
- [55] Beckers, J. L., Boček, P., The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* 2003, 24, 518–535.
- [56] Beneš, M., Riesová, M., Svobodová, J., Tesařová, E., Dubský, P., Gaš, B., Complexation of buffer constituents with neutral complexation agents: Part II. Practical impact in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 2013, 85, 8526–8534.
- [57] Gaš, B., Kenndler, E., Dispersive phenomena in electromigration separation methods. *Electrophoresis* 2000, 21, 3888–3897.
- [58] Dubský, P., Dvořák, M., Mullerová, L., Gaš, B., Determination of the correct migration time and other parameters of the Haarrhoff-van der Linde function from the peak geometry characteristics. *Electrophoresis* 2015, 36, 655–661.
- [59] Michalcová, L., Glatz, Z., Comparison of various capillary electrophoretic approaches for the study of drug-protein interaction with emphasis on minimal

- consumption of protein sample and possibility of automation. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 325–331.
- [60] Heegaard, N. H. H., Affinity in Electrophoresis. *Electrophoresis* 2009, 30, S229–S239.
- [61] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001, 22, 1419–1427.
- [62] Berezovski, M., Krylov, S. N., Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures - A single experiment reveals equilibrium and kinetic parameters of protein-DNA interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 13674–13675.
- [63] Guzman, N. A., Blanc, T., Phillips, T. M., Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices. *Electrophoresis* 2008, 29, 3259–3278.
- [64] Pan, Y., Karns, K., Herr, A. E., Microfluidic electrophoretic mobility shift assays for quantitative biochemical analysis. *Electrophoresis* 2014, 35, 2078–2090.
- [65] Witos, J., Samuelsson, J., Cilpa-Karhu, G., Metso, J., Jauhiainen, M., Riekkola, M.-L., Partial filling affinity capillary electrophoresis including adsorption energy distribution calculations – towards reliable and feasible biomolecular interaction studies. *Analyst* 2015, 140, 3175–3182.
- [66] Berger, G., Girault, G., Macromolecule-ligand binding studied by the Hummel and Dreyer method: Current state of the methodology. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 797, 51–61.
- [67] Busch, M. H. A., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants. *J. Chromatogr. A* 1997, 775, 313–326.
- [68] Østergaard, J., Heegaard, N. H. H., Capillary electrophoresis frontal analysis: principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. *Electrophoresis* 2003, 24, 2903–2913.
- [69] Lounis, F. M., Chamieh, J., Leclercq, L., Gonzalez, P., Cottet, H., Modelling and predicting the interactions between oppositely and variously charged polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Soft Matter* 2016, 12, 9728–9737.
- [70] Kanoatov, M., Galievsky, V. A., Krylova, S. M., Cherney, L. T., Jankowski, H. K., Krylov, S. N., Using nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium

- mixtures (NECEEM) for simultaneous determination of concentration and equilibrium constant. *Anal. Chem.* 2015, 87, 3099–3106.
- [71] Krylova, S. M., Dove, P. M., Kanoatov, M., Krylov, S. N., Slow-dissociation and slow-recombination assumptions in nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *Anal. Chem.* 2011, 83, 7582–5.
- [72] Guzman, N. A., Phillips, T. M., Immunoaffinity capillary electrophoresis: A new versatile tool for determining protein biomarkers in inflammatory processes. *Electrophoresis* 2011, 32, 1565–1578.
- [73] Moser, A. C., Willicott, C. W., Hage, D. S., Clinical applications of capillary electrophoresis based immunoassays. *Electrophoresis* 2014, 35, 937–955.
- [74] Heintz, J., Hernandez, M., Gomez, F. A., Use of a partial-filling technique in affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors. *J. Chromatogr. A* 1999, 840, 261–268.
- [75] Ansorge, M., Dubský, P., Ušelová, K., Into the theory of the partial-filling affinity capillary electrophoresis and the determination of apparent stability constants of analyte-ligand complexes. *Electrophoresis* 2018, 39, 742–751.
- [76] Valtcheva, L., Mohammad, J., Pettersson, G., Hjertén, S., Chiral separation of β -blockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein. *J. Chromatogr. A* 1993, 638, 263–267.
- [77] Tanaka, Y., Terabe, S., Separation of the enantiomers of basic drugs by affinity capillary electrophoresis using a partial filling technique and α 1-acid glycoprotein as chiral selector. *Chromatographia* 1997, 44, 119–128.
- [78] Nilsson, M., Harang, V., Bergström, M., Ohlson, S., Isaksson, R., Johansson, G., Determination of protein-ligand affinity constants from direct migration time in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2004, 25, 1829–1836.
- [79] Zavaleta, J., Chinchilla, D. B., Ramirez, A., Pao, A., Martinez, K., Nilapwar, S., Ladbury, J. E., Mallik, S., Gomez, F. A., Partial filling multiple injection affinity capillary electrophoresis (PFMIACE) to estimate binding constants of receptors to ligands. *Talanta* 2007, 71, 192–201.
- [80] Dvořák, M., Svobodová, J., Beneš, M., Gaš, B., Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for determination of complexation constants. *Electrophoresis* 2013, 34, 761–767.

- [81] Shimura, K., Kasai, K., Capillary affinophoresis as a versatile tool for the study of biomolecular interactions: a mini-review. *J. Mol. Recognit.* 1998, 11, 134–40.
- [82] Shimura, K., Kasai, K., *Methods in Enzymology*. ACADEMIC PRESS INC, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA 2003, pp. 398–417.
- [83] Shimura, K., Kasai, K.-I., *Methods in Enzymology*. ACADEMIC PRESS INC, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 1996, pp. 203–218.
- [84] Hage, D. S., Affinity chromatography: A review of clinical applications. *Clin. Chem.* 1999, 45, 593–615.
- [85] Bertucci, C., Bartolini, M., Gotti, R., Andrisano, V., Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 797, 111–129.
- [86] Farcaş, E., Bouckaert, C., Servais, A. C., Hanson, J., Pochet, L., Fillet, M., Partial filling affinity capillary electrophoresis as a useful tool for fragment-based drug discovery: A proof of concept on thrombin. *Anal. Chim. Acta* 2017, 984, 211–222.
- [87] Amudsen, L. K., Sirén, H., Determination of association constants between steroid compounds and albumins by partial-filling ACE. *Electrophoresis* 2007, 28, 3737–3744.
- [88] Anderot, M., Nilsson, M., Végvári, Á., Moeller, E. H., van de Weert, M., Isaksson, R., Determination of dissociation constants between polyelectrolytes and proteins by affinity capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, 877, 892–896.
- [89] Cilpa-Karhu, G., Lipponen, K., Samuelsson, J., Öörni, K., Fornstedt, T., Riekkola, M. L., Three complementary techniques for the clarification of temperature effect on low-density lipoprotein-chondroitin-6-sulfate interaction. *Anal. Biochem.* 2013, 443, 139–147.
- [90] Lipponen, K., Stege, P. W., Cilpa, G., Samuelsson, J., Fornstedt, T., Riekkola, M. L., Three different approaches for the clarification of the interactions between lipoproteins and chondroitin-6-sulfate. *Anal. Chem.* 2011, 83, 6040–6046.
- [91] Almeda, S., Salinas, E., Arce, C., Moreno, A., Arce, L., Valcárcel, M., Use of multiple sequential injections of equal volumes to determine the apparent binding constant for antibody-antigen complexes by capillary electrophoresis. *Talanta* 2009, 78, 1446–1451.

- [92] Tohala, L., Oukacine, F., Ravelet, C., Peyrin, E., Sequence requirements of oligonucleotide chiral selectors for the capillary electrophoresis resolution of low-affinity DNA binders. *Electrophoresis* 2017, 38, 1383–1390.
- [93] Chu, B. L., Lin, J. M., Wang, Z., Guo, B., Enantiospecific binding of Rotigotine and its antipode to serum albumins: Investigation of binding constants and binding sites by partial-filling ACE. *Electrophoresis* 2009, 30, 2845–2852.
- [94] Martínez-Gómez, M. A., Escuder-Gilabert, L., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M. J., Enantioseparation of nuarimol by affinity electrokinetic chromatography-partial filling technique using human serum albumin as chiral selector. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3265–3271.
- [95] Martínez-Gómez, M. A., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., Medina-Hernández, M. J., Enantiomeric quality control of antihistamines in pharmaceuticals by affinity electrokinetic chromatography with human serum albumin as chiral selector. *Anal. Chim. Acta* 2007, 592, 202–209.
- [96] Yagi, Y., Kakehi, K., Hayakawa, T., Ohyama, Y., Suzuki, S., Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 2012, 431, 120–126.
- [97] Yagi, Y., Yamamoto, S., Kakehi, K., Hayakawa, T., Ohyama, Y., Suzuki, S., Application of partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody. *Electrophoresis* 2011, 32, 2979–2985.
- [98] Jensen, H., Larsen, S. W., Larsen, C., Østergaard, J., Physicochemical profiling of drug candidates using Capillary-based techniques. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2013, 23, 333–345.
- [99] Wang, F. Q., Li, Q. Q., Zhang, Q., Wang, Y. Z., Hu, Y. J., Li, P., Wan, J. B., Yang, F. Q., Xia, Z. N., Evaluation of interactions between RAW264.7 macrophages and small molecules by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2017, 38, 938–941.
- [100] Ihtshamul, H., Ladbury, J., Drug-DNA recognition: Energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* 2000, 13, 188–197.
- [101] Achyuthan, K. E., Whitten, D. G., Branch, D. W., Supramolecular self-assembling cyanine as an alternative to ethidium bromide displacement in DNA-drug model interactions during high throughput screening. *Anal. Sci.* 2010, 26, 55–61.

- [102] Liu, H.-K., Sadler, P. J., Metal complexes as DNA intercalators. *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 349–359.
- [103] Martínez, R., Chacón-García, L., The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 127–151.
- [104] Brana, M. F., Cacho, M., Gradillas, A., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A., Intercalators as Anticancer Drugs. *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7, 1745–1780.
- [105] Palchaudhuri, R., Hergenrother, P. J., DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007, 18, 497–503.
- [106] Murugan, A. K., Munirajan, A. K., Alzahrani, A. S., MicroRNAs: Modulators of the *Ras* Oncogenes in Oral Cancer. *J. Cell. Physiol.* 2015, 231, n/a-n/a.
- [107] Widodo, Djati, M. S., Rifa'i, M., Role of MicroRNAs in carcinogenesis that potential for biomarker of endometrial cancer. *Ann. Med. Surg.* 2016, 7, 9–13.
- [108] Izuhara, D., Swager, T. M., Poly(pyridinium phenylene)s: Water-soluble N-type polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17724–17725.
- [109] Smith, L. V., de la Fuente, J. M., Guthrie, K. M., Parenty, A. D. C., Cronin, L., Does it bind? An instant binding assay for DNA oligonucleotide interactive small molecules. *New J. Chem.* 2005, 29, 1118–1120.
- [110] Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F., Tajmir-Riahi, H. A., Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J. Mol. Struct.* 2007, 827, 35–43.
- [111] Červinka, O., Chiralita a pojmy s ní související. *Chem. List.* 1999, 93, 294–305.
- [112] Starý, I., Stará, I. G., Helikálně chirální aromáty. *Chem. List.* 2014, 108, 293–300.
- [113] Ali, I., Aboul-Enein, H. Y., Ghanem, A., Enantioselective Toxicity and Carcinogenesis. *Curr. Pharm. Anal.* 2005, 1, 109–125.
- [114] Vespalec, R., Boček, P., Chiral Separations in Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* 2000, 20, 2579–2591.
- [115] Koppenhoefer, B., Zhu, X., Jakob, A., Wuerthner, S., Lin, B., Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins. *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 135–161.
- [116] Lomsadze, K., Martínez-Girón, A. B., Castro-Puyana, M., Chankvetadze, L., Crego, A. L., Salgado, A., Marina, M. L., Chankvetadze, B., About the role of

- enantioselective selector-selectand interactions and the mobilities of diastereomeric associates in enantiomer separations using CE. *Electrophoresis* 2009, 30, 2803–2811.
- [117] Chankvetadze, B., Linder, W., Schriba, G. K. E., Enantiomer separations in capillary electrophoresis in the case of equal binding constants of the enantiomers with a chiral selector: Commentary on the feasibility of the concept. *Anal. Chem.* 2004, 76, 4256–4260.
- [118] Scriba, G. K. E., Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55, 688–701.
- [119] Řezanka, P., Navrátilová, K., Řezanka, M., Král, V., Sýkora, D., Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2014, 35, 2701–21.
- [120] Escuder-Gilabert, L., Martín-Biosca, Y., Medina-Hernández, M. J., Sagrado, S., Cyclodextrins in capillary electrophoresis: recent developments and new trends. *J. Chromatogr. A* 2014, 1357, 2–23.
- [121] Maier, V., Kalíková, K., Příbylka, A., Vozka, J., Smuts, J., Švidrnoch, M., Ševčík, J., Armstrong, D. W., Tesařová, E., Isopropyl derivative of cyclofructan 6 as chiral selector in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2014, 1338, 197–200.
- [122] Jiang, C., Tong, M.-Y., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., Synthesis and examination of sulfated cyclofructans as a novel class of chiral selectors for CE. *Electrophoresis* 2009, 30, 3897–909.
- [123] Hu, S.-Q., Guo, X.-M., Shi, H.-J., Luo, R.-J., Separation mechanisms for palonosetron stereoisomers at different chiral selector concentrations in MEKC. *Electrophoresis* 2015, 36, 825–829.
- [124] Scriba, G. K. E., Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. *Chromatographia* 2012, 75, 815–838.
- [125] Tsioupi, D. A., Stefan-van Staden, R.-I., Kapnissi-Christodoulou, C. P., Chiral selectors in CE: recent developments and applications. *Electrophoresis* 2013, 34, 178–204.
- [126] Stavrou, I. J., Mavroudi, M. C., Kapnissi-Christodoulou, C. P., Chiral selectors in CE: Recent developments and applications (2012-mid 2014). *Electrophoresis* 2015, 36, 101–123.

- [127] Stavrou, I. J., Agathokleous, E. A., Kapnissi-Christodoulou, C. P., Chiral selectors in CE: Recent development and applications (mid-2014 to mid-2016). *Electrophoresis* 2017, 38, 786–819.
- [128] Gingras, M., One hundred years of helicene chemistry. Part 3: applications and properties of carbohelicenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 1051–1095.
- [129] Shen, Y., Chen, C.-F., Helicenes: synthesis and applications. *Chem. Rev.* 2012, 112, 1463–535.
- [130] Stará, I. G., Starý, I., in: Siegel, J. S., Tobe, Y. (Eds.), *Science of Synthesis*. Thieme, Stuttgart 2010, pp. 885–953.
- [131] Šámal, M., Chercheja, S., Rybáček, J., Vacek Chocholoušová, J., Vacek, J., Bednářová, L., Šaman, D., Stará, I. G., Starý, I., An Ultimate Stereocontrol in Asymmetric Synthesis of Optically Pure Fully Aromatic Helicenes. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 8469–74.
- [132] Monk, P. M. S., *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis, and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine*. Wiley 1998.
- [133] Adriaenssens, L., Severa, L., Sállová, T., Císařová, I., Pohl, R., Saman, D., Rocha, S. V., Finney, N. S., Pospíšil, L., Slavíček, P., Teplý, F., Helquats: A facile, modular, scalable route to novel helical dicationic species. *Chem. - A Eur. J.* 2009, 15, 1072–1076.
- [134] Pospíšil, L., Teplý, F., Gál, M., Adriaenssens, L., Horáček, M., Severa, L., Helquats, helical extended diquats, as fast electron transfer systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 1550–1556.
- [135] Severa, L., Koval, D., Novotná, P., Ončák, M., Sázelová, P., Šaman, D., Slavíček, P., Urbanová, M., Kašička, V., Teplý, F., Resolution of a configurationally stable [5]helquat: enantiocomposition analysis of a helicene congener by capillary electrophoresis. *New J. Chem.* 2010, 34, 1063.
- [136] Reyes-Gutiérrez, P. E., Jirásek, M., Severa, L., Novotná, P., Koval, D., Sázelová, P., Vávra, J., Meyer, A., Císařová, I., Šaman, D., Pohl, R., Štěpánek, P., Slavíček, P., Coe, B. J., Hájek, M., Kašička, V., Urbanová, M., Teplý, F., Functional helquats: helical cationic dyes with marked, switchable chiroptical properties in the visible region. *Chem. Commun. (Camb)*. 2015, 51, 1583–6.
- [137] Koval, D., Severa, L., Adriaenssens, L., Vávra, J., Teplý, F., Kašička, V., Chiral analysis of helquats by capillary electrophoresis: resolution of helical N-heteroaromatic dicationic species using randomly sulfated cyclodextrins. *Electrophoresis* 2011, 32, 2683–92.

- [138] Vávra, J., Severa, L., Švec, P., Císařová, I., Koval, D., Sázelová, P., Kašička, V., Teplý, F., Preferential Crystallization of a Helicene-Viologen Hybrid - An Efficient Method to Resolve [5]Helquat Enantiomers on a 20 g Scale. *European J. Org. Chem.* 2012, 2012, 489–499.
- [139] Vávra, J., Severa, L., Císařová, I., Klepetářová, B., Šaman, D., Koval, D., Kašička, V., Teplý, F., Search for conglomerate in set of [7]helquat salts: multigram resolution of helicene-viologen hybrid by preferential crystallization. *J. Org. Chem.* 2013, 78, 1329–42.
- [140] Ha, Y., Akiyama, Y., Xue, Y., Structure and mechanism of rhomboid protease. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 15430–15436.
- [141] Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L., Lemberg, M. K., Ubiquitin-Dependent Intramembrane Rhomboid Protease Promotes ERAD of Membrane Proteins. *Mol. Cell* 2012, 47, 558–569.
- [142] Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., Freeman, M., Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 2001, 107, 161–171.
- [143] Urban, S., Lee, J. R., Freeman, M., A family of rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J.* 2002, 21, 4277–4286.
- [144] McQuibban, G. A., Saurya, S., Freeman, M., Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 2003, 423, 537–541.
- [145] O'Donnell, R. A., Hackett, F., Howell, S. A., Treeck, M., Struck, N., Krnajski, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T. W., Blackman, M. J., Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J. Cell Biol.* 2006, 174, 1023–1033.
- [146] Etheridge, S. L., Brooke, M. A., Kelsell, D. P., Blaydon, D. C., Rhomboid proteins: A role in keratinocyte proliferation and cancer. *Cell Tissue Res.* 2013, 351, 301–307.
- [147] Song, W., Liu, W., Zhao, H., Li, S., Guan, X., Ying, J., Zhang, Y., Miao, F., Zhang, M., Ren, X., Li, X., Wu, F., Zhao, Y., Tian, Y., Wu, W. W., Fu, J., Liang, J., Wu, W. W., Liu, C., Yu, J., Zong, S., Miao, S., Zhang, X., Wang, L., Rhomboid domain containing 1 promotes colorectal cancer growth through activation of the EGFR signalling pathway. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8022.

- [148] Chan, E. Y. L., McQuibban, G. A., The mitochondrial rhomboid protease: Its rise from obscurity to the pinnacle of disease-relevant genes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2013, 1828, 2916–2925.
- [149] Luo, W. W., Shu, H. B., Emerging roles of rhomboid-like pseudoproteases in inflammatory and innate immune responses. *FEBS Lett.* 2017, 591, 3182–3189.
- [150] Düsterhöft, S., Künzel, U., Freeman, M., Rhomboid proteases in human disease: Mechanisms and future prospects. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2017, 1864, 2200–2209.
- [151] Riestra, A. M., Gandhi, S., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., Urban, S., Johnson, P. J., A *Trichomonas vaginalis* Rhomboid Protease and Its Substrate Modulate Parasite Attachment and Cytolysis of Host Cells. *PLoS Pathog.* 2015, 11, e1005294.
- [152] Wolf, E. V., Verhelst, S. H. L., Inhibitors of rhomboid proteases. *Biochimie* 2016, 122, 38–47.
- [153] Tichá, A., Stanchev, S., Škerle, J., Began, J., Ingr, M., Švehlová, K., Polovinkin, L., Růžička, M., Bednářová, L., Hadravová, R., Poláchová, E., Rampířová, P., Březinová, J., Kašička, V., Majer, P., Stříšovský, K., Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid intramembrane proteases. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 2703–2713.
- [154] Kibbe, W. A., OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, W43–W46.
- [155] Miroux, B., Walker, J. E., Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 1996, 260, 289–298.
- [156] Shen, Y. F., Smith, R. D., High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries. *J. Microcolumn Sep.* 2000, 12, 135–141.
- [157] Mohanty, U., Stellwagen, N. C., Free solution mobility of oligomeric DNA. *Biopolymers* 1999, 49, 209–214.
- [158] Klepárník, K., Boček, P., DNA diagnostics by capillary electrophoresis. *Chem. Rev.* 2007, 107, 5279–5317.
- [159] Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., Dickerson, R. E., Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981, 78, 2179–2183.

- [160] Bates, R. G., Vega, C. A., White, D. R., Standards for Ph Measurements in Isotonic Saline Media of Ionic-Strength $I=0.16$. *Anal. Chem.* 1978, 50, 1295–1300.
- [161] Rehman, S. U., Sarwar, T., Husain, M. A., Ishqi, H. M., Tabish, M., Studying non-covalent drug–DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015, 576, 49–60.
- [162] Tang, T.-C. C., Huang, H.-J. J., Electrochemical studies of the intercalation of ethidium bromide to DNA. *Electroanalysis* 1999, 11, 1185–1190.
- [163] Bugs, M. R., Cornelio, M. L., Analysis of the ethidium bromide bound to DNA by photoacoustic and FTIR spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 2001, 74, 512–520.
- [164] Seksek, O., Bolard, J., Nuclear pH gradient in mammalian cells revealed by laser microspectrofluorimetry. *J. Cell Sci.* 1996, 109, 257–262.
- [165] Gaš, B., Jaroš, M., Hruska, V., Zusková, I., Stedry, M., PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. *Lc Gc Eur.* 2005, 18, 282–288.
- [166] Evenhuis, C. J., Musheev, M. U., Krylov, S. N., Universal method for determining electrolyte temperatures in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 2011, 83, 1808–1814.
- [167] Williams, B. A., Vigh, G., Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174–1180.

8 Přílohy

Seznam příloh:

Publikace I:

Růžička, M., Čížková, M., Jirásek, M., Teplý, F., Koval, D., Kašička, V.,

Study of deoxyribonucleic acid-ligand interactions by partial filling affinity capillary electrophoresis.

J. Chromatogr. A 2014, 1349, 116–121.

Publikace II:

Růžička, M., Koval, D., Vávra, J., Reyes-Gutiérrez, P. E., Teplý, F., Kašička, V.,

Interactions of helquats with chiral acidic aromatic analytes investigated by partial-filling affinity capillary electrophoresis.

J. Chromatogr. A 2016, 1467, 417–426.

Publikace III:

Tichá, A., Stanchev, S., Škerle, J., Began, J., Ingr, M., Švehlová, K., Polovinkin, L.,
Růžička, M., Bednářová, L., Hadravová, R., Poláchová, E., Rampířová, P., Březinová,
J., Kašička, V., Majer, P., Stříšovský, K.,

Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid intramembrane proteases.

J. Biol. Chem. 2017, 292, 2703–2713.

Životopis

Seznam publikací