Základy studia kinetiky biointerakcí pomocí biosensorů

Afinitní interakce

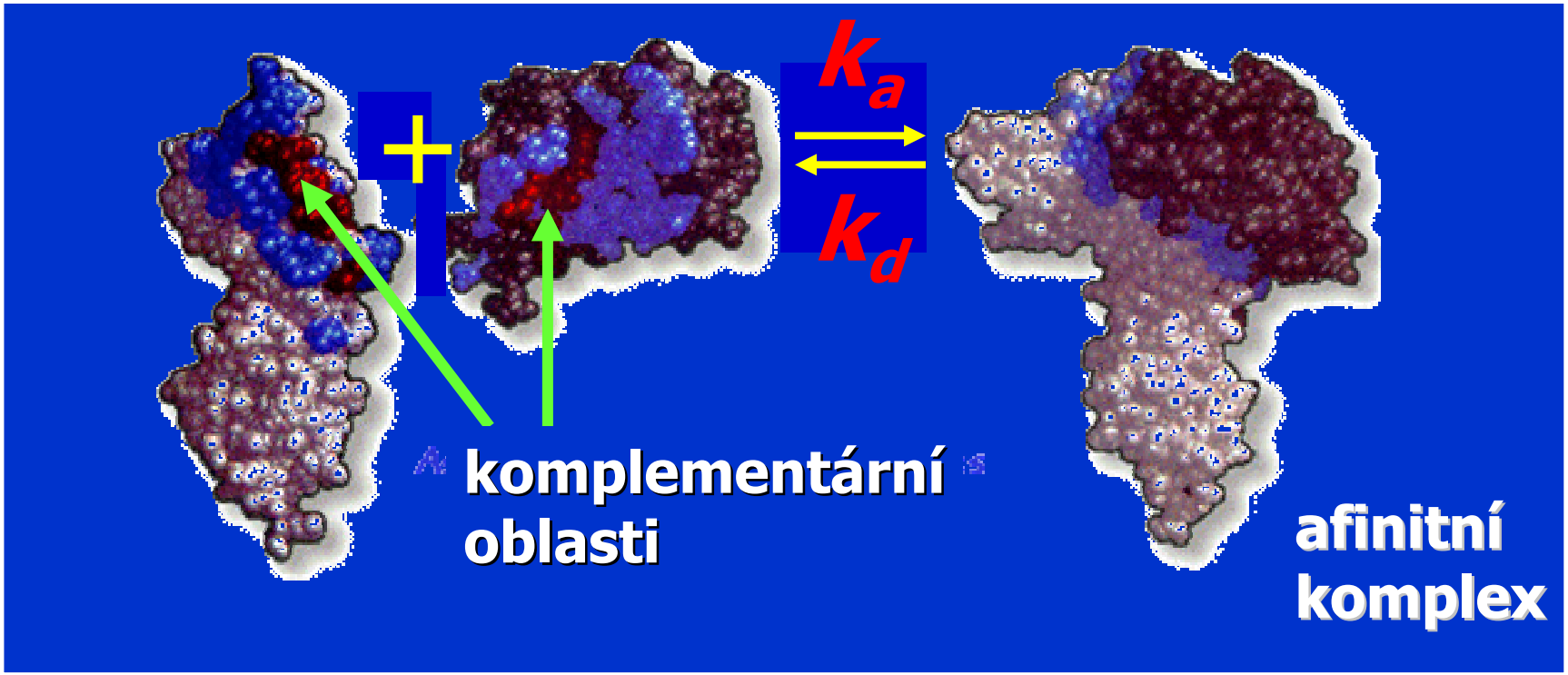
- vznik afinitního komplexu na základě specifické interakce dvou biomolekul s komplementárními vazebnými doménami je základem všech procesů v živých systémech
- experimentální studium interakcí mezi biomolekulami pomáhá objasnit vzájemné vztahy v biologických systémech
- mimo klasické procesy studia afinitních interakcí jsou nyní v biochemii a biologii stále častěji využívány moderní metodiky na bázi biosensorů
- přínosem biosensorů je rychlost, pohodlnost a možnost přímého sledování interakce v reálném čase bez nutnosti značení

Typy afinitních interakcí

molekulární reakce mezi partnery:

antigen	protilátka
hormon	receptor
léčiva	receptor
enzym	kofaktor / substrát / inhibitor
receptor	mikroorganismus / buňka
nukleová kyselina	vazebná bílkovina
nukleová kyselina	komplementární řetězec

Afinitní interakce



Kinetické konstanty:

k_a ... asociační rychlostní konstanta

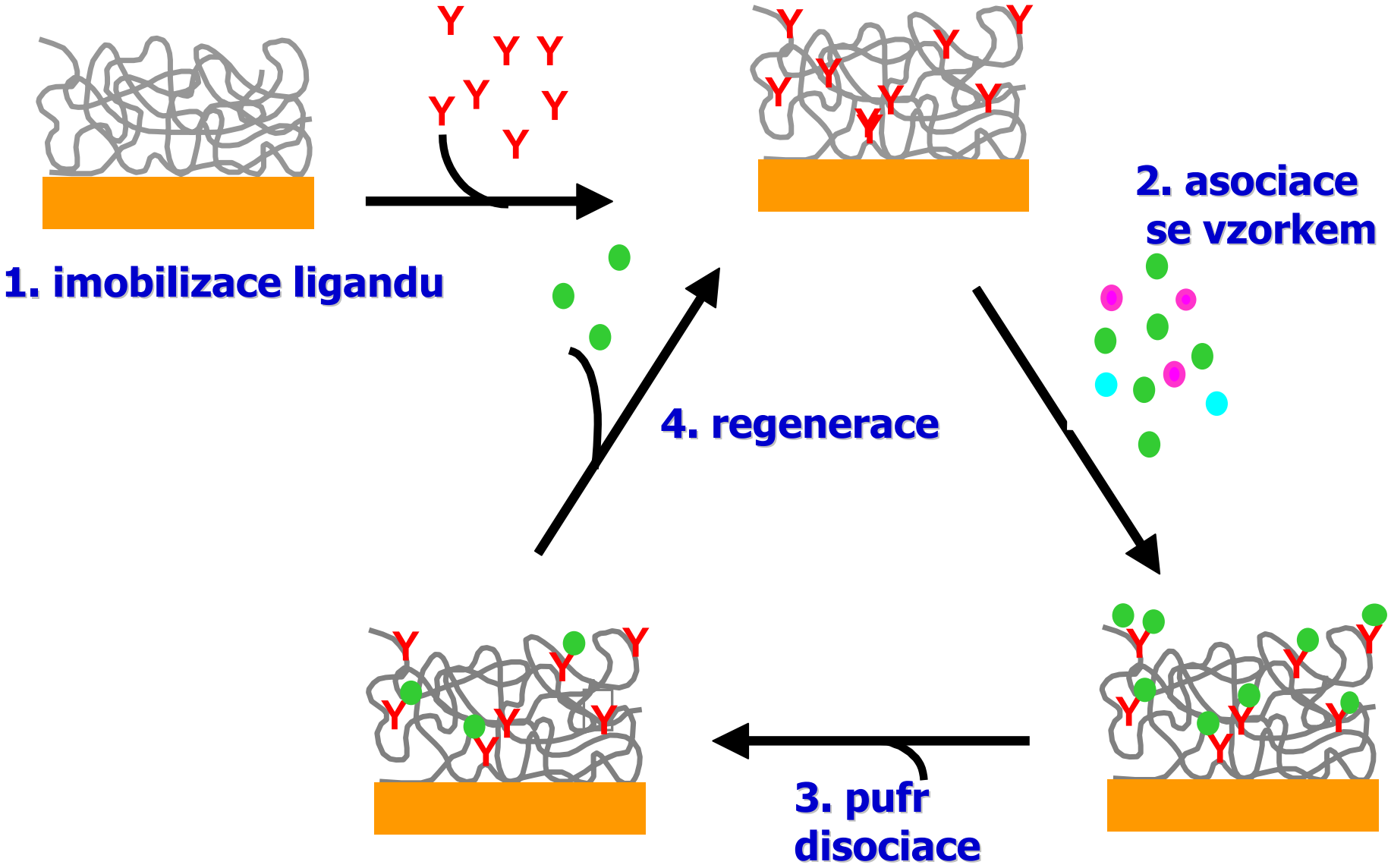
k_d ... disociační rychlostní konstanta

$K_A = k_a/k_d$ asociační rovnovážná konstanta

Rozdělení afinitních sensorů

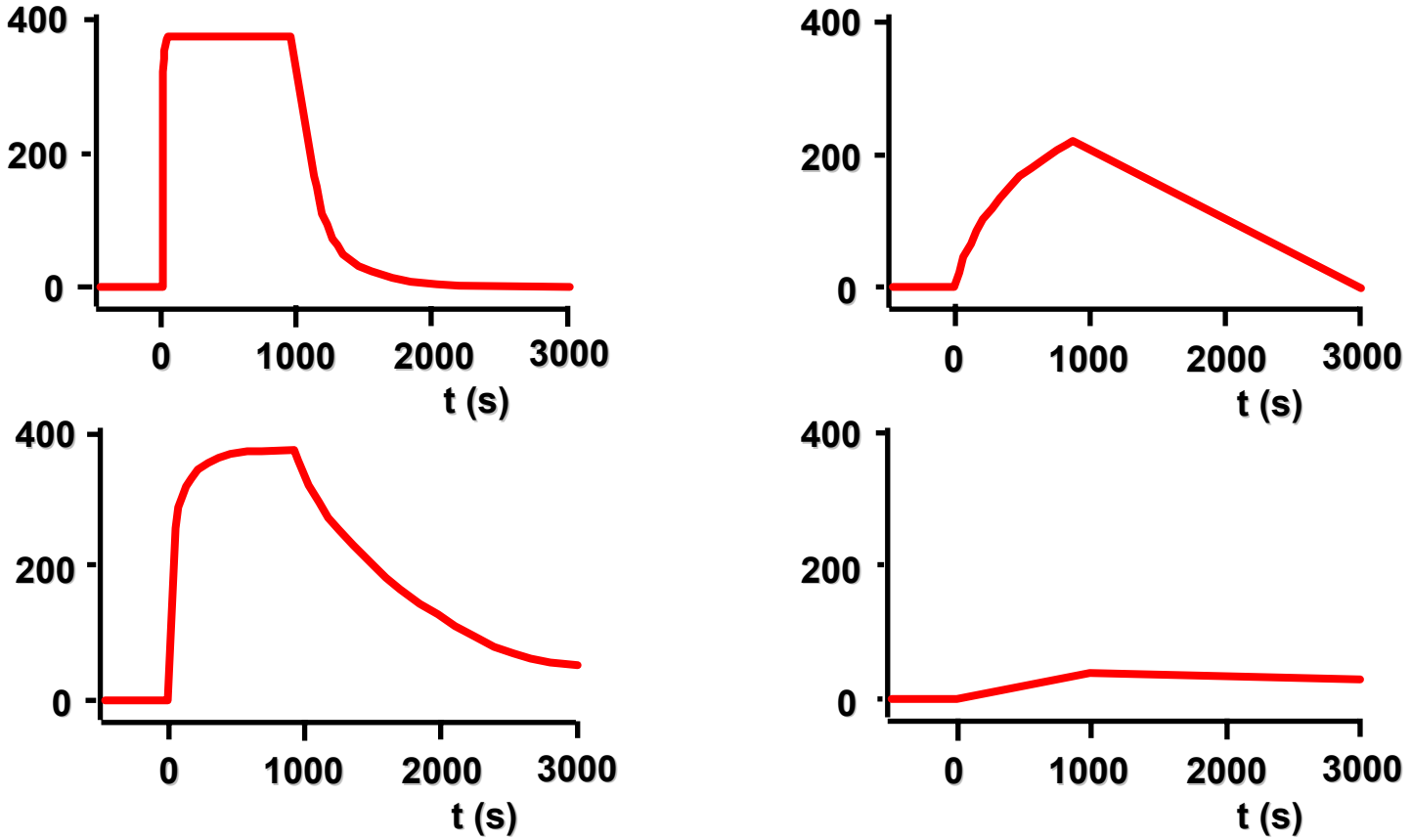
- vždy je jeden z afinitních partnerů imobilizován na povrchu převodníku; podle generování signálu se pak rozlišují:
- přímé afinitní biosensory
  - vznik biokomplexu je možné sledovat přímo v průběhu afinitní interakce (v reálném čase)
  - jako převodníky slouží speciální optické světlovodné systémy, piezosensory nebo impedimetrická zařízení
- nepřímé afinitní biosensory
  - jeden z afinitních partnerů je vhodně označen, na konci interakce se pak stanoví množství značky navázané na povrchu sensoru
  - podle typu značky (enzym nebo fluorofor) se použije převodník vhodný pro měření enzymové aktivity nebo fluorescence

Schéma měření s biosensorem



Charakterizace afinitních reakcí

proč měřit rychlostní kinetické konstanty?



všechny tyto interakce mají stejnou rovnovážnou konstantu, liší se rychlostními konstantami

Kinetická analýza

- kvantitativní charakterizace afinitních interakcí má základní význam pro řadu oblastí biochemie, biotechnologie i biologie
- klasické metody pro měření afinity jsou obvykle založeny na smísení interagujících partnerů, dosažení rovnovážného stavu, separaci volných a vázaných molekul a kvantifikaci jednoho z partnerů
- užívají se vhodné detekční značky - radioaktivita, fluorescence, enzymy
- nezískají se kompletní kinetická data a navíc může dojít ke změnám nativní molekuly

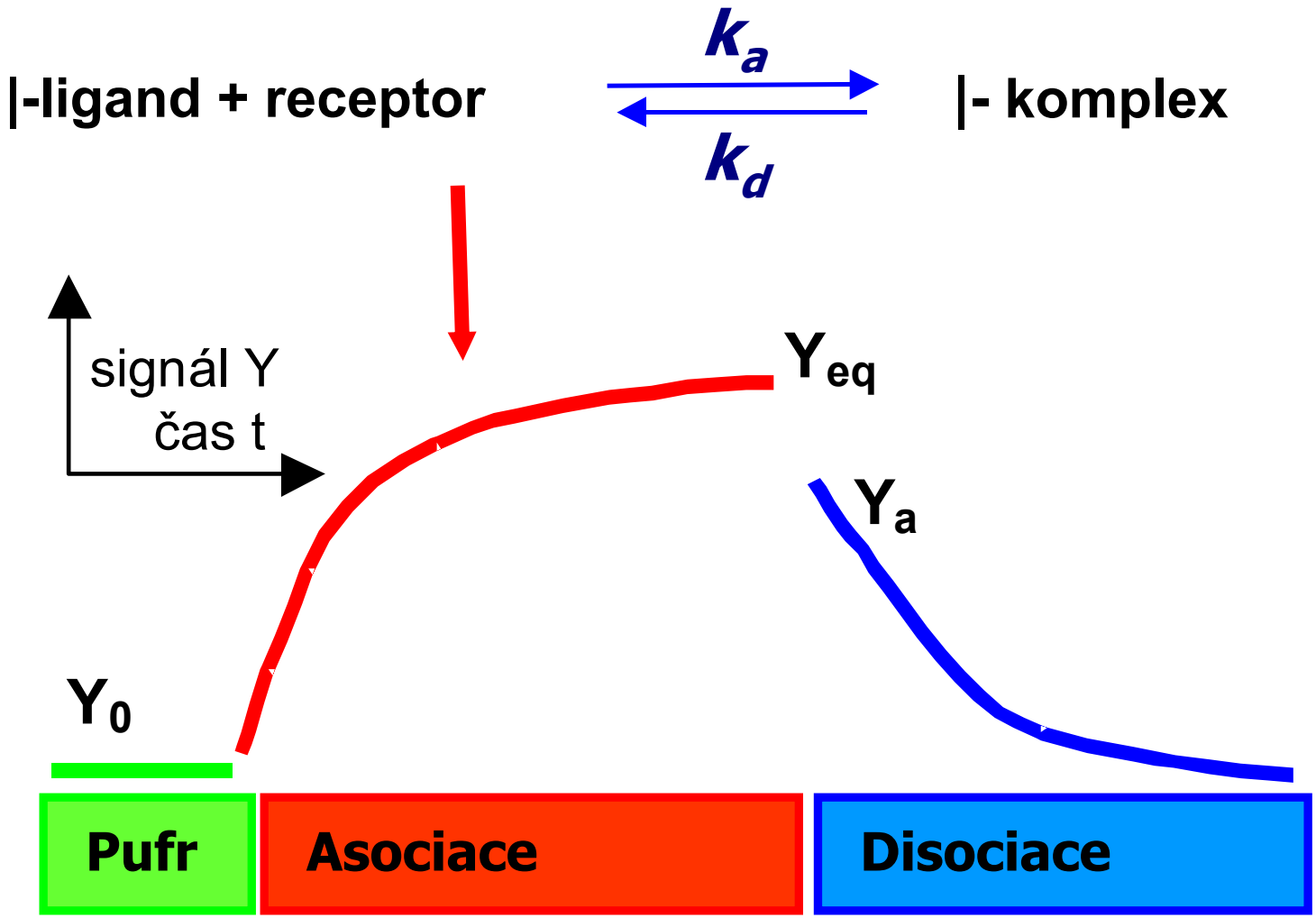
- nejvíce informací lze vždy získat při průběžném sledování vazebného děje pomocí biosensorů
- jedna z interagujících látek – ligand - je navázána na povrchu citlivé oblasti vhodného fyzikálního sensoru
- při specifické vazbě druhé látky se změní fyzikální charakteristiky citlivého povrchu, na které sensor reaguje změnou signálu
- vazebnou interakci tak lze sledovat v reálném čase a přímo bez nutnosti používat značení.

Uspořádání experimentu

- nejčastěji používaná metoda studia bioafinitních interakcí je schématicky znázorněna na obrázku
- jedna z reagujících látek (ligand L) je imobilizována na citlivém povrchu sensoru (|—)
- druhá (receptor R) je přítomná v roztoku v koncentraci *c*, ta je obvykle během měření prakticky neměnná, např. při průtočném uspořádání
- sleduje se tvorba komplexu RL:

$$|\text{—L} + \text{R} \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} |\text{—LR}$$

- interakci popisují kinetické rychlostní konstanty k_a (asociační) a k_d (disociační).
- rychlost tvorby komplexu je: $d[\mathrm{RL}]/dt = k_a\,[\mathrm{R}][\mathrm{L}] - k_d\,[\mathrm{RL}]$
- Po ustavení rovnováhy (d[RL]/dt = 0) jsou koncentrace všech forem dány rovnovážnými konstantami K_A resp. K_D; platí pro ně vztahy K_A = [RL]/([R][L] = k_a/k_d, $K_D = 1/K_A$.



- **měřený signál je úměrný množství vznikajícího komplexu**
- **u všech typů sensorů signál závisí na hmotnosti molekul navázaných na citlivý povrch**

Výpočet kinetických konstant

- výchozí signál Y_0 se bere nulový
- vazebná kapacita Y_{max} povrchu je úměrná celkové změně signálu po obsazení všech přítomných molekul ligandu L
- v průběhu vazby bude zbývající množství volného neobsazeného ligandu L přímo úměrné rozdílu $Y_{max} - Y$
- množství navázaného partnera R je přímo úměrné Y:

$$d[RL]/dt = dY/dt = k_a c(Y - Y_{max}) - k_d Y$$

- a další úpravou získat:

$$dY/dt = k_a c Y_{max} - (k_a c + k_d) Y$$

- k určení kinetických parametrů z experimentálních závislostí Y na čase t lze použít dva odlišné postupy, linearizaci transformací nebo nelineární regresi

Linearizace

- experimentální závislost $Y = f(t)$ se numerickou transformací (derivace) převede na tvar $dY/dt = f(Y)$
- nově získaná závislost by měla být lineární tvaru $dY/dt = a + bY$
- pro absolutní člen (úsek na ose y) platí $a = k_a c Y_{max}$,
- pro směrnici $b = -k_a c - k_d$.
- pokud se provedou vazebná měření pro řadu koncentrací c volného partnera L, lze kinetické rychlostní konstanty k_a, k_d jednoduše zjistit vynesením závislostí a, b na koncentraci c
- na základě grafu směrnic se určí velikosti konstant a z grafu úseků vazebná kapacita Y_{max}

- lineární transformace primárních naměřených dat bohužel vede také k transformaci chyb počítaných parametrů, a tak jsou kvalitní naměřené údaje částečně znehodnoceny...
- v současnosti používána zřídka

Ukázka použití

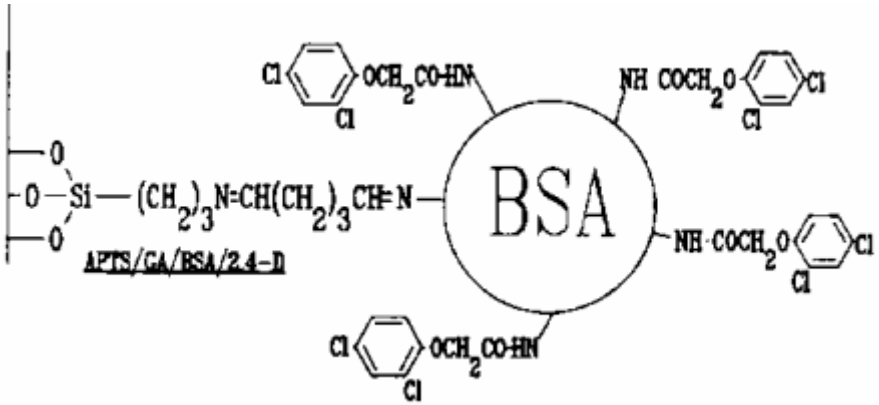
ELSEVIER

Journal of Immunological Methods 176 (1994) 117–125

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS

Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution

Petr Skládal [a,b,*], Maria Minunni [a], Marco Mascini [a], Vladimír Kolář [c], Milan Fránek [c]



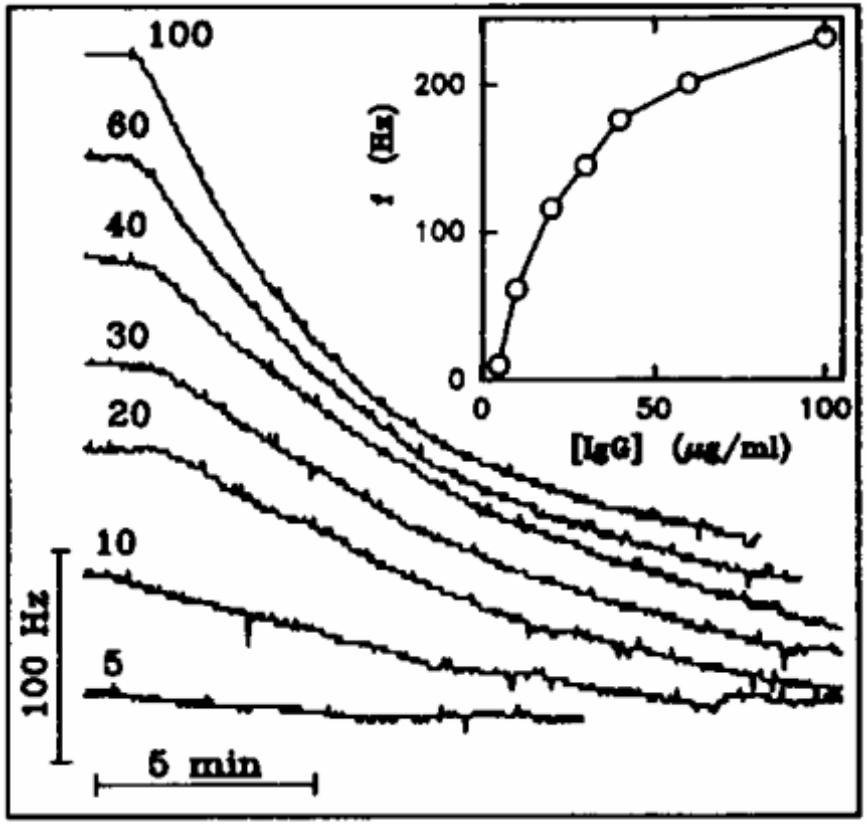


Fig. 2. Experimental tracings obtained during the flow of solutions of the monoclonal antibody E2/G2 through the cell with the APTS/GA/BSA/2,4-D modified piezoelectric crystal. The individual curves were shifted vertically for better resolution and the concentrations of IgG solutions (μg/ml) are indicated above the curves. In the inset graph, the frequency changes at the end of the 15 min binding period are plotted vs. corresponding IgG concentrations.

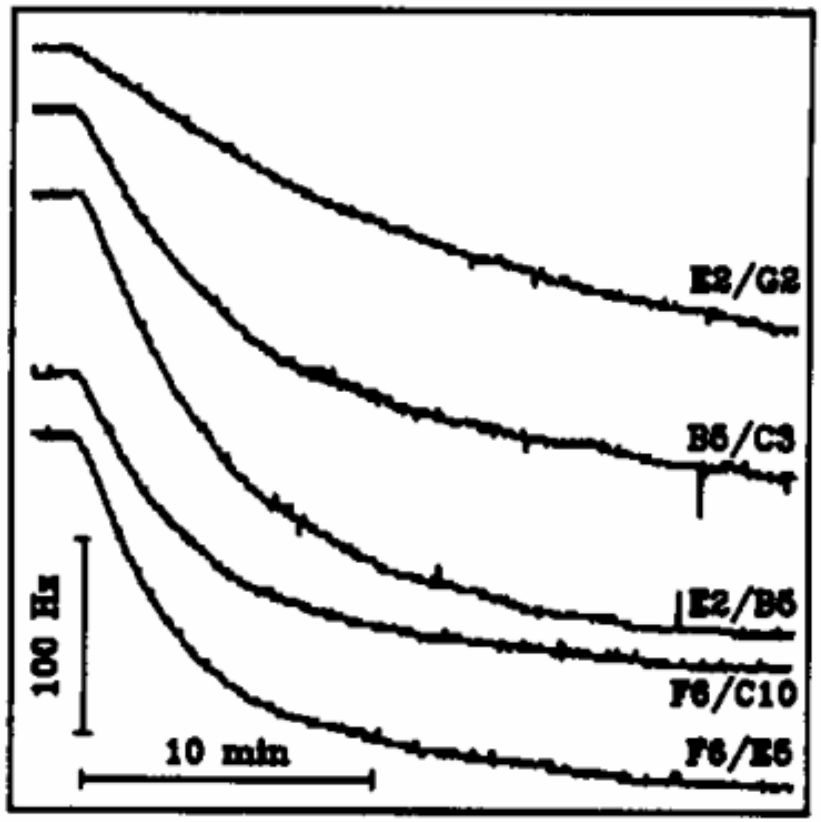


Fig. 5. Experimental binding curves obtained from flow of the individual MAb solutions (30 μg/ml) through the cell containing the APTS/GA/BSA/2,4-D modified piezoelectric crystal.

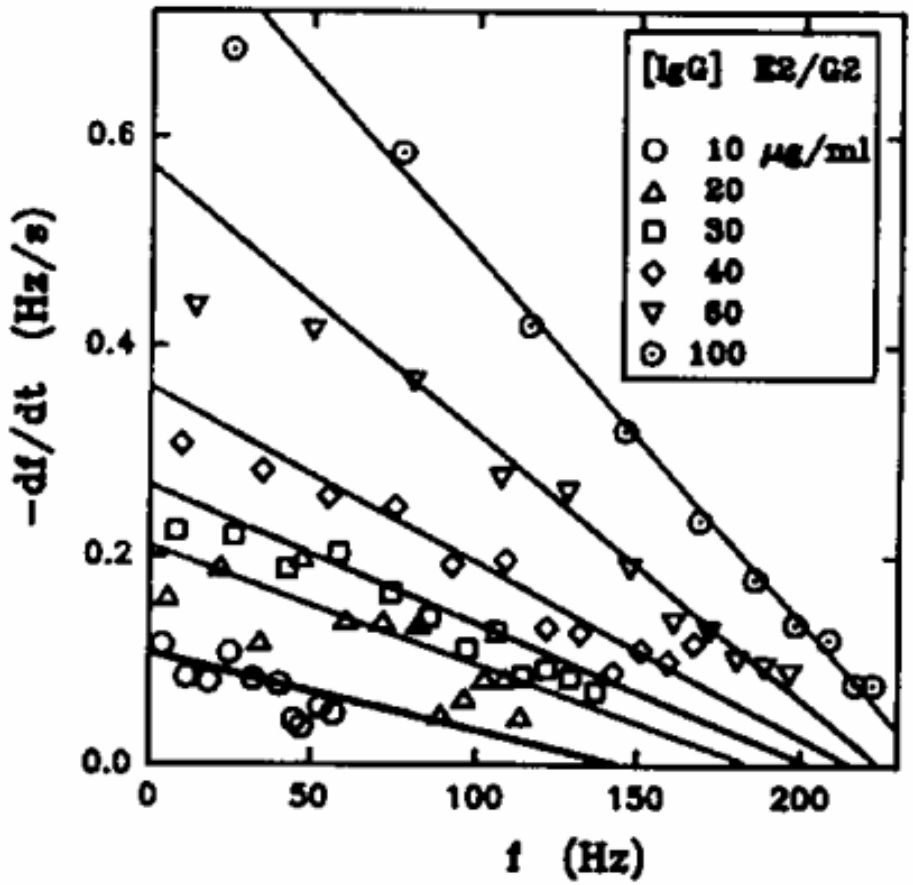


Fig. 3. The results of transformations of the $f-t$ curves (Fig. 2) to the dependencies of $(\mathrm{d}f/\mathrm{d}t)$ on f (details are explained in the text). The concentrations of IgG E2/G2 corresponding to the individual curves (symbols) are shown in the figure.

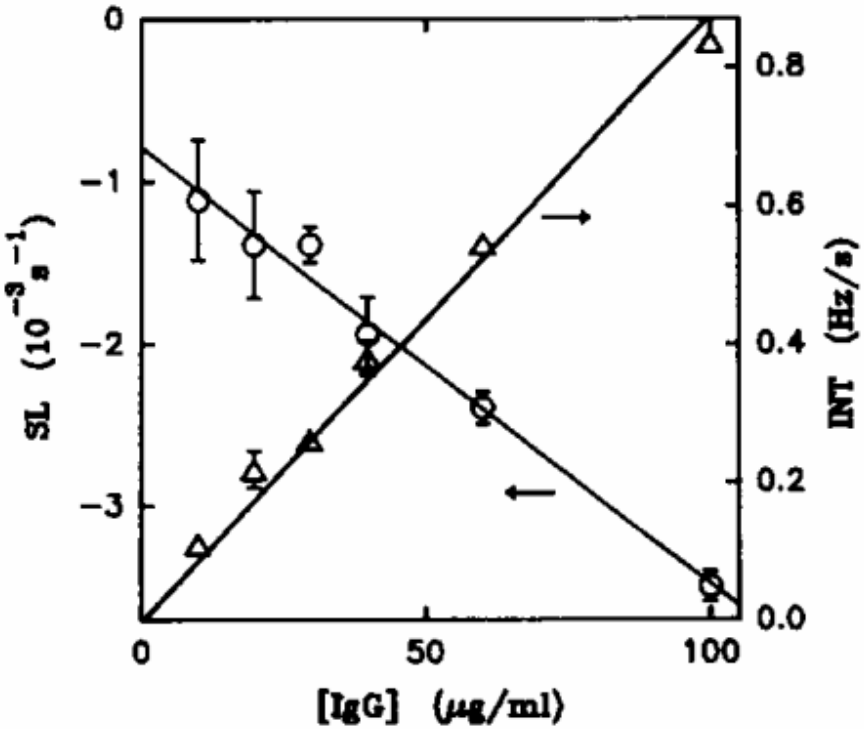


Fig. 4. The dependence of slopes SL (○) and intercepts INT (△) (parameters characterizing the straight lines $(\mathrm{d}f/\mathrm{d}t)$ vs. f from Fig. 3) on concentrations of the monoclonal antibody E2/G2. The error bars represent the calculated standard deviations.

$$k_a = 4540 \pm 270 \text{ mol}^{-1}\text{l s}^{-1}$$

$$k_d = 7.89 \times 10^{-4} \pm 8.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

Nelineární regrese

- **je exaktnější postup vycházející z integrace rovnice výchozí podle času, to přímo vede k výrazu závislosti velikosti signálu *Y* na čase *t*:**

$$Y=\frac{k_a c Y_{\max}\{1-\exp[-(k_a c+k_d)t]\}}{k_a c+k_d}$$

- **z jediného experimentu tak je možné určit přímo žádané kinetické konstanty (takto se používá zřídka)**
- **pro usnadnění numerického výpočtu lze zavést Y_{eq}, tj. velikost signálu při dosažení rovnovážného stavu:**

$$Y_{eq}=k_a c Y_{\max}/(k_a c+k_d)=c Y_{\max}/(c+K_D)=K_A c Y_{\max}/(c+K_A)$$

- **rovnice pak přejde na tvar:**

$$Y=Y_{eq}\{1-\exp[-(k_a c+k_d)t]\}$$

- dalšího zjednodušení výpočtu lze dosáhnout zavedením

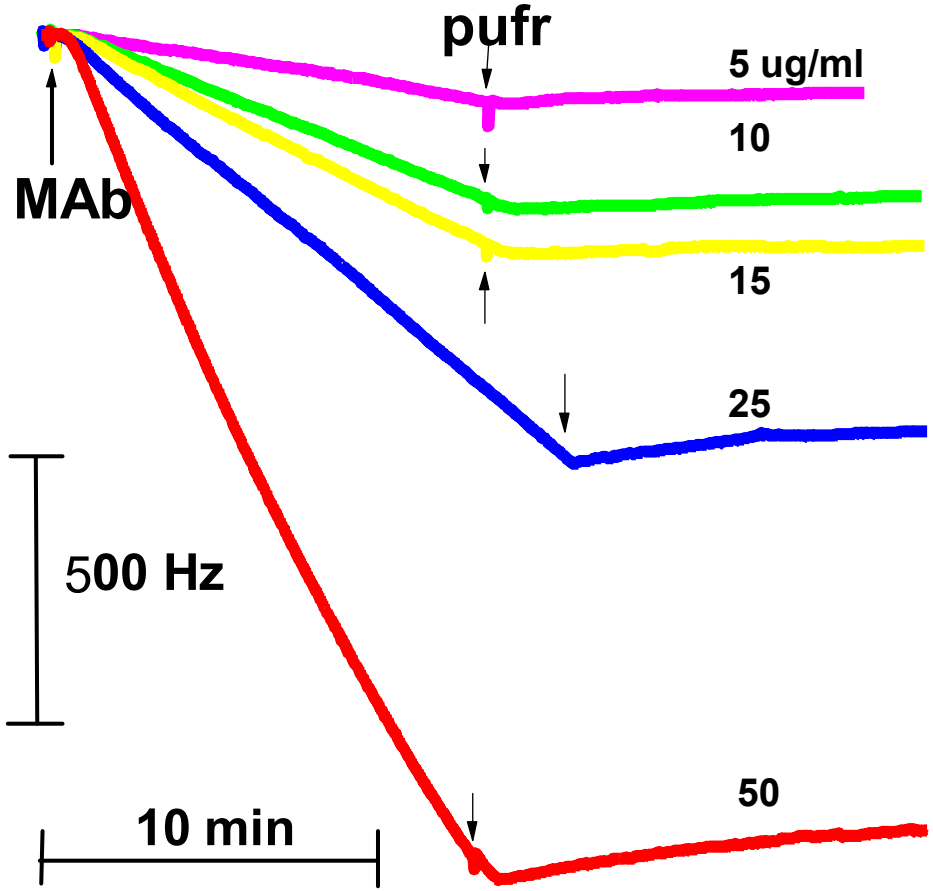
$$k_{obs} = k_a c + k_d$$

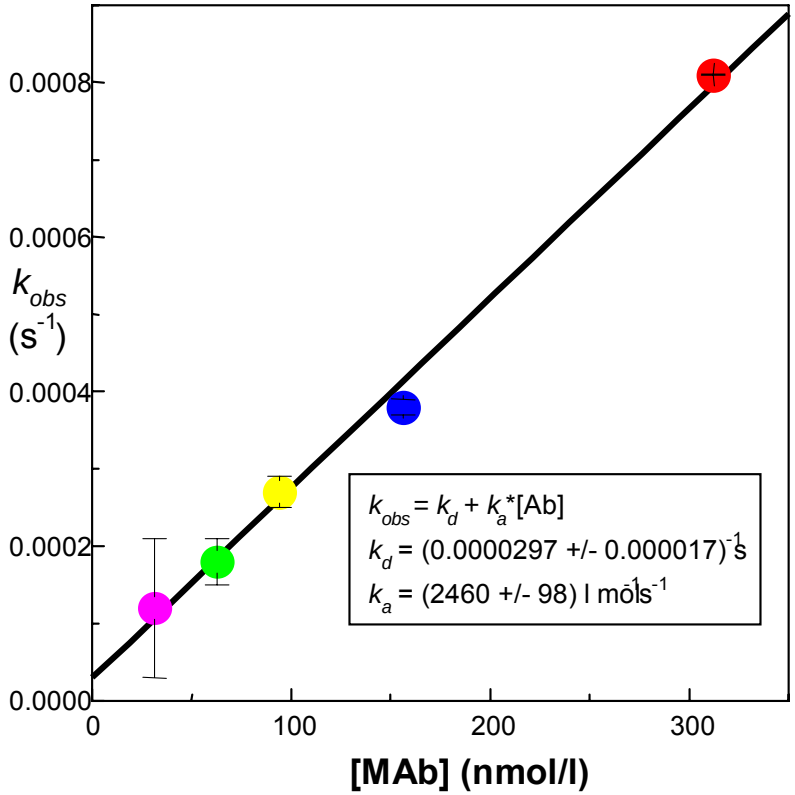
$$Y = Y_{eq}\{[1 - \exp(-k_{obs} t)]$$

- hodnoty kinetických rychlostních konstant pak lze určit vynesením k_{obs} proti koncentraci volného vazebného partnera

- nelineární regrese umožňuje vyhodnotit vazebné křivky tvořené ze dvou nezávislých kinetických interakcí (např. nespecifická adsorpce ligandu), je možné uvažovat vliv nestability základní linie, lze korigovat změny signálu vyvolané výměnou pracovního roztoku
- po nástřiku vzorku dochází obvykle k výrazné změně indexu lomu okolního prostředí, které se projeví jako prudká změna signálu u optických sensorů, stejně působí změny viskozity u piezoelektrických sensorů
- nelineární regerese je univerzální, lze použít i tam, kde linearizace selhává nebo není principiálně použitelná vůbec

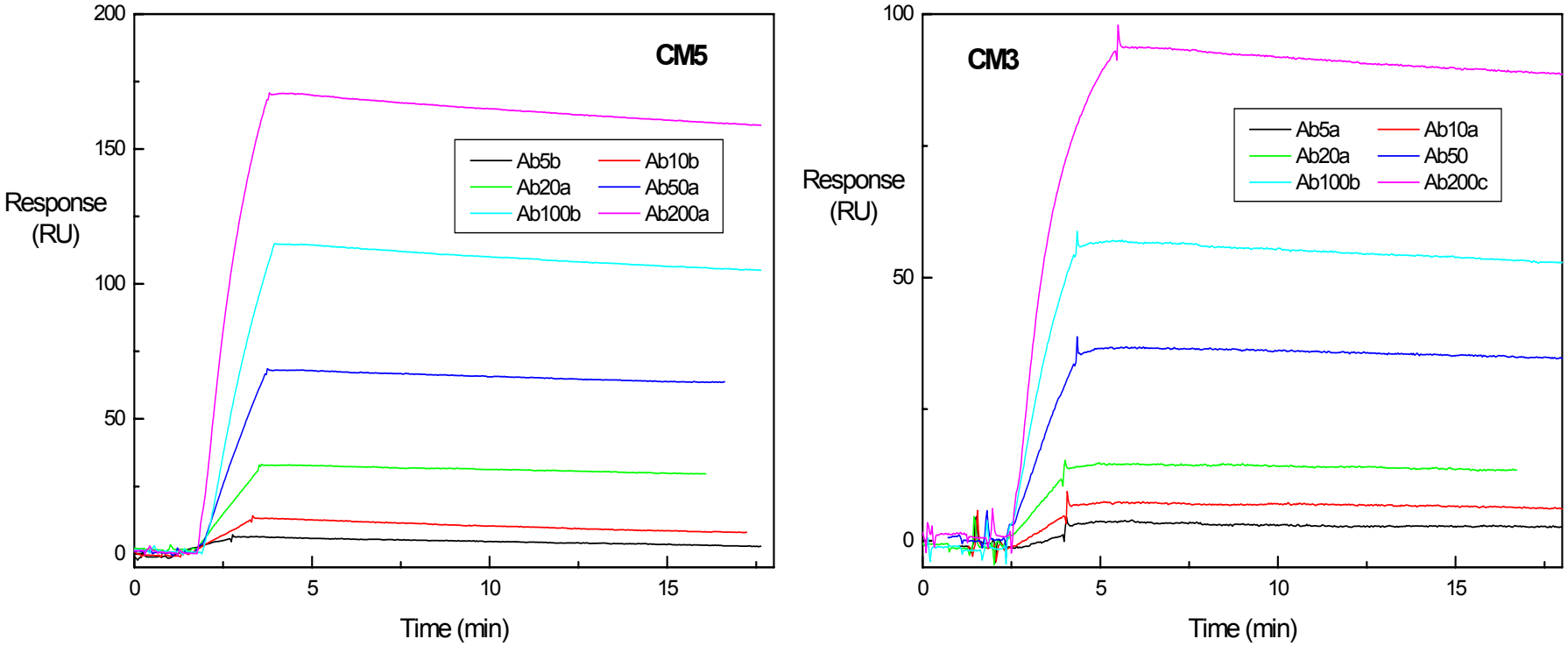
Ukázka kinetické analýzy





Studium interakce protilátky s imobilizovaným haptenem pomocí píezoelektrického biosensoru

Interakce antigenu (imobiliz.) s fragmentem protilátky (scFv)



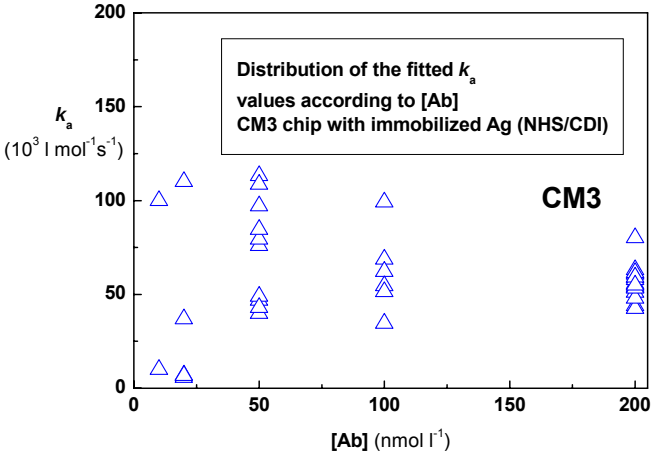
Biacore 3000, Ag imobilizován na čipy CM5 a CM3, interakční závislosti pro různé koncentrace protilátek

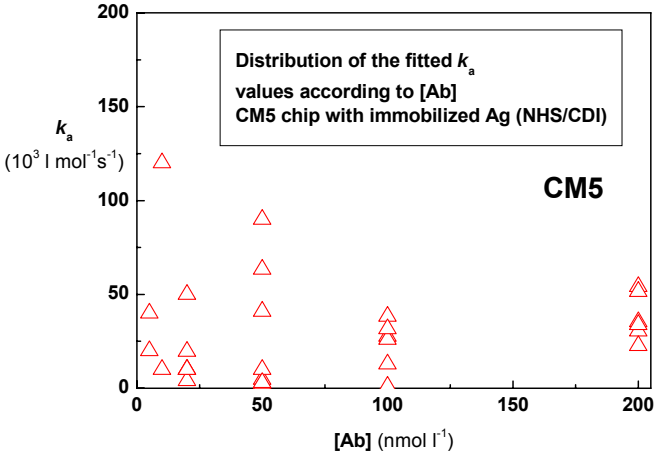
ukázky průběhu interakčních křivek pro různé koncentrace protilátky (nM)

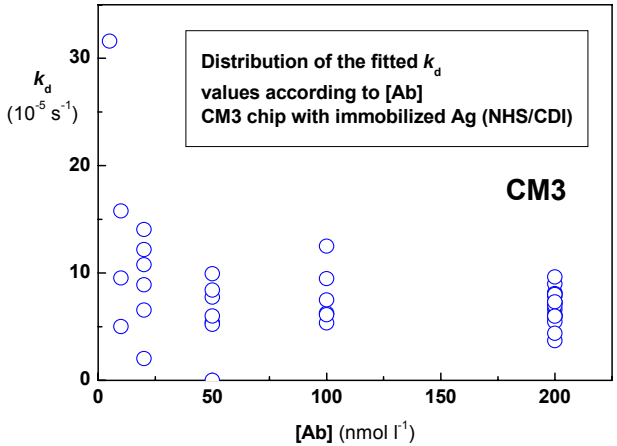
Vyhodnocení

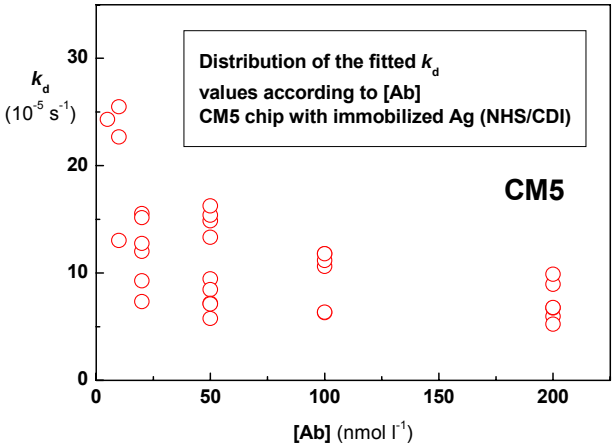
ref. kanál 1 – BSA, povrchové hustoty antigenů (RU, v kanálu č.) :
CM3: 2 – 264, 3 – 920, 4 – 647; CM5: 2 – 1206, 3 – 513, 4 – 2550)
průtočná rychlost 25 ul/min (bez vlivu)

Ukázky nalezených kinetických konstant – v závislosti na použité konc. Ab
(nezávislá regrese každé křivky použitím Scrubber2, Biaevaluate použit pro extrakci dat)









Výsledky:

CM3:
k_a = 56300. ± 8300 l mol^{-1} s^{-1}
k_d = (6.9 ± 1.5)·10^{-5} s^{-1}

CM5:
k_a = 38000 ± 12000 l mol^{-1} s^{-1}
k_d = (7.3 ± 1.8)·10^{-5} s^{-1}

Disociační fáze interakce

- po vytvoření komplexu LR na povrchu sensoru se z okolí odstraní volný receptor R a lze pozorovat zpětný rozpad (disociaci) komplexu na výchozí složky
- kineticky tento proces odpovídá dříve uvedené rovnici

$$dY/dt = k_a c Y_{max} - (k_a c + k_d) Y$$

- kde se položí [R] = c = 0, odtud pak plyne:

$$dY/dt = -k_d Y$$

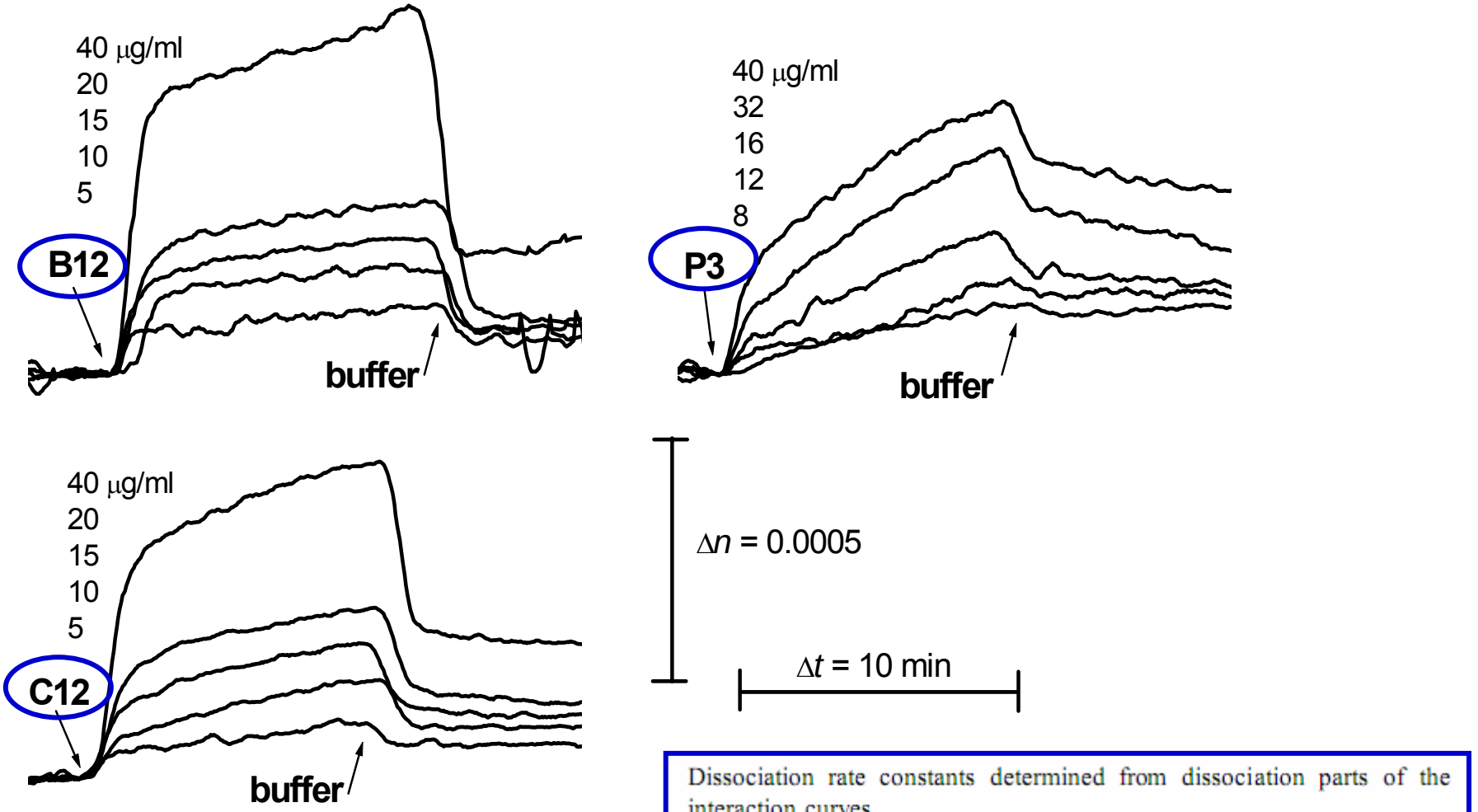
- je-li výchozí množství komplexu LR na povrchu sensoru dáno signálem *Ya*, integrace vede ke vztahu:

$$Y = Y_a \exp(-k_d t)$$

- z experimentální disociační křivky lze pak parametry *kd* a *Ya* určit nelineární regresí, případně po úpravě na rovnici přímky lineární regresí:

$$\ln Y = \ln Y_a - k_d t$$

Interakce proteinu GP41 (imob.) a scFv protilátek (Spreeta)

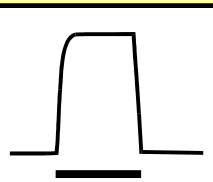
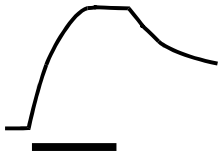
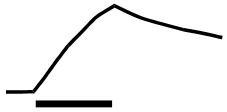
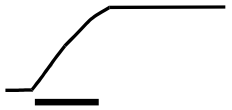
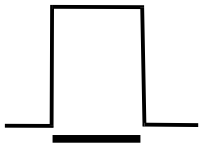
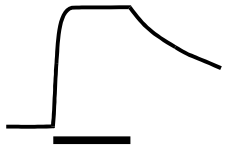
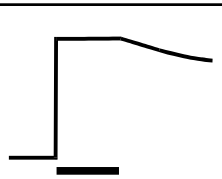


Dissociation rate constants determined from dissociation parts of the interaction curves		
Antibody	B12	C12
k_d (s^{-1})	0.0015 ± 0.0020	0.00039 ± 0.00048

biotinylovaný protein gp41 byl imobilizován na Au sensor přes cystamin, glutaraldehyd a avidin

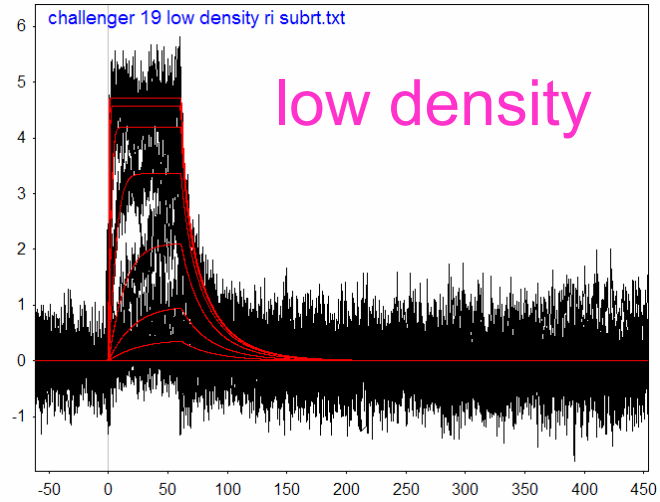
Kinetika u Biacore

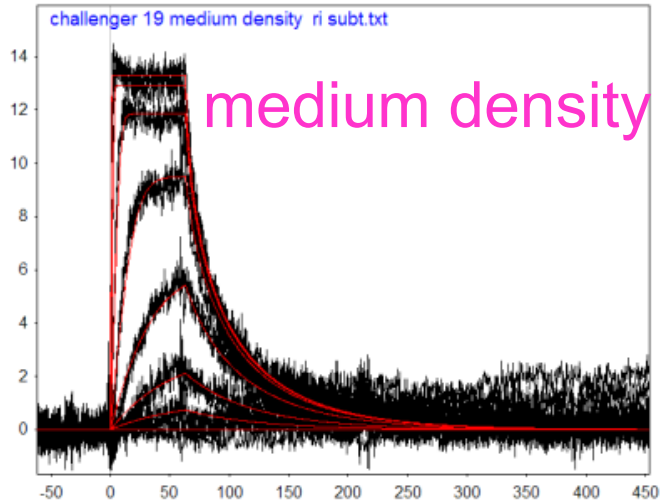
ukázky průběhu interakčních křivek pro různé kombinace hodnot rychlostních konstant

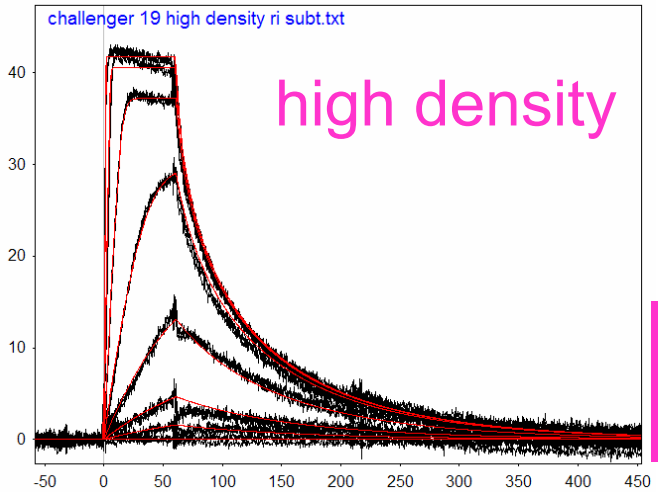
Asociace k_a ($mol^{-1} l\ s^{-1}$)	Disociace k_d (s^{-1})	Tvar závislosti	Způsoby určení konstant
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace ⇒ k_a rovnováhy ⇒ K_A disociace příliš rychlá
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace ⇒ k_a rovnováha ⇒ K_A disociace ⇒ k_d
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	středně rychlá 10^{-5} až 0.001		asociace ⇒ k_a rovnováha nenastává disociace ⇒ k_d
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	pomalá < 10^{-5}		asociace ⇒ k_a rovnováha nenastává disociace příliš pomalá
rychlá > $5 \cdot 10^{-5}$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha ⇒ K_A disociace příliš rychlá
rychlá > $5 \cdot 10^{-5}$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha ⇒ K_A disociace ⇒ k_d
rychlá > $5 \cdot 10^{-5}$	středně rychlá 10^{-5} až 0.001		asociace příliš rychlá disociace ⇒ k_d

Kinetika u BIACORE

interakce imobilizované karbonátanhydrasy II (30 kDa) a acetozolamidu (222 Da)







response RU

time/s

$$A_0 \underset{k_m}{\overset{k_m}{\rightleftarrows}} A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftarrows}} AB$$

$$k_m = 1.282\left(\frac{\nu D^2}{hl}\right)^{1/3}$$

$k_a = 1.141 \times 10^7$ l.mol^{-1}.s^{-1}

$k_d = 0.178$ s^{-1}

Evaluation software: SCRUBBER – data layout CLAMP – kinetic calculation

V praxi to bývá komplikovanější ...

- při disociaci ligandu z povrchu sensoru se může někdy vyskytovat tzv. "rebinding„ - partner R se sice uvolní z komplexu LR, ale než se stačí dostat do volného roztoku, je zachycen jinými neobsazenými ligandy L na povrchu
  - nastává pokud je povrchová hustota ligandu L vysoká (L je nízkomolekulární)
  - nebo pokud biovrstva není monovrstvou a má větší tloušťku (imobilizace v dextranové matrici)
  - projevem bývají velmi nízké hodnoty k_d oproti očekávání
- při analýze interakcí protilátek (IgG) s imobilizovanými antigeny se obvykle uvažuje stechiometrie interakce 1 : 1, nicméně při interakci s imobilizovanými hapteny (R) je možná i bivalentní vazba
- různé orientace (nehomogenita) ligandu
- transport látek z roztoku k sensoru
- obvykle existuje na povrchu sensoru nemíchaná vrstva - mimo vlastní afinitní interakce je tedy nutné uvažovat difúzní transport partnera R
  - bude diskutováno v další části