

Måling af pH med inhibitorer

Selvlysende molekyler sladrer om pH-værdi på mikroskopisk skala.

Af Marie Louise Gram og Mikael Bols, Kemisk Institut, Københavns Universitet

I de kulørte ugeblade kan man læse om basisk vand, og fra folkeskolen bliver vi fortalt, at mavesyren fordøjer maden. Begge eksempler relaterer sig til pH-værdien, men hvad er pH, og hvad kan

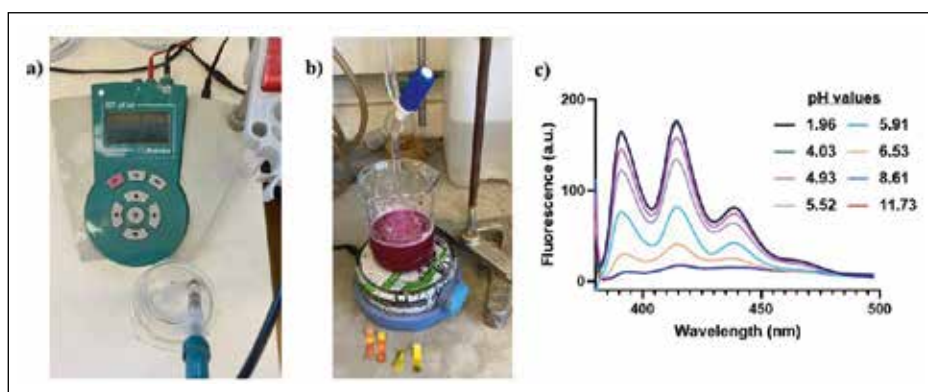
vi bruge den viden til? Vores arbejde bygger på at inkorporere en selvlysende pH-indikator i kemiske strukturer, som kan hæmme biologisk relevante proteiner.

Måling af pH

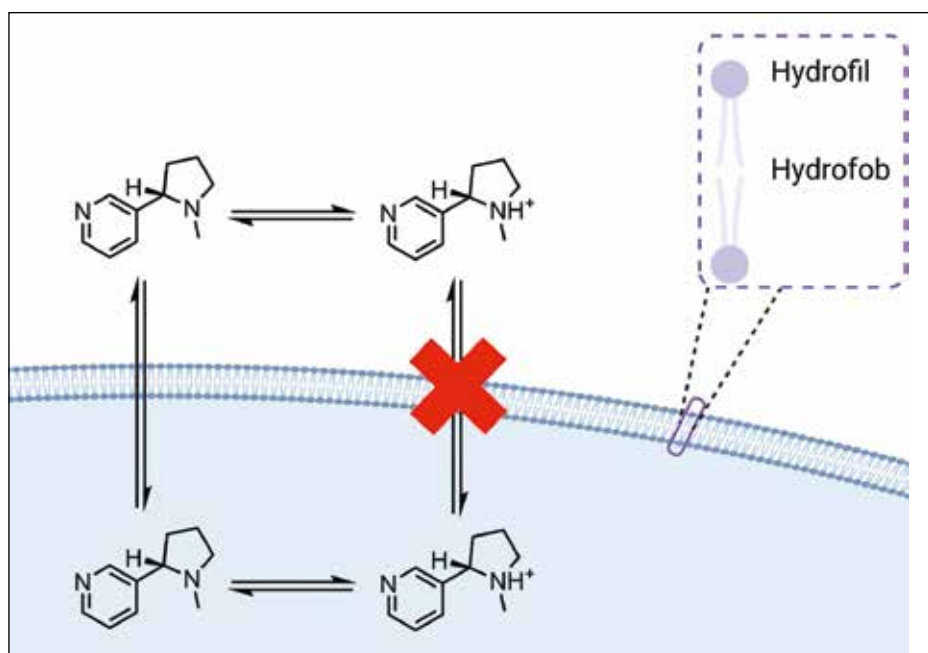
Når vi snakker om pH-værdi i vandige opløsninger, tales om et logaritmisk

forhold mellem en syre og den korresponderende base. pH-værdien af en opløsning kan enten udregnes matematisk eller bestemmes ved brug af pH-indikatorer. Kolorimetrisk pH-indikatorer, såsom pH-papir, kan eksempelvis bruges til visuelt at bestemme pH, hvor farven på indikatoren svarer til en bestemt pH (figur 1b). Ofte er de kolorimetrisk indikatorer ikke særligt nøjagtige og giver et kvalitativt skøn på en pH-værdi. Kvantitativ bestemmelse af pH kan dog udføres ved brug af et pH-meter (figur 1a), som på makroskopisk skala kan måle spændingsforskellen mellem to elektroder nedsænket i en væske og som derefter kan omregne spændingsforskellen til en præcis pH-værdi. Den største udfordring ved at bruge et pH-meter er dog dets størrelse, da elektroden skal være af en vis størrelse for at registrere spændingsforskelle. Det gør pH-meteret egnet til at måle pH af større volumener, men mindre anvendeligt i systemer med små afkroge, såsom på celleniveau i biologiske systemer.

I sådanne scenarier kan selvlysende molekyler, såkaldte fluoroforer, være en hjælp til bestemmelse af pH på mikroskopisk niveau. I modsætning til kolorimetrisk pH-indikatorer, som bygger på absorption af lys ved en bestemt bølgelængde og dermed viser komplementærfarven af det absorberede lys, bygger fluorescerende pH-indikatorer på lys som en kilde til energioverførsel. Når man lyser på en fluorofor med en bestemt bølgelængde, bliver energien fra lyset brugt til at excitere elektroner til et højere energiniveau. Når elektronerne henfalder, udsendes lys med en længere bølgelængde (og dermed lavere energi) end lyskilden brugt til at excitere elektronerne til at starte med. Dette lys med længere bølgelængde er det, vi kan måle som fluorescens. Fluoroforer har eksempelvis været brugt til at visualisere celler og cellekomponenter i væv, samt til funktionelle assays, hvor fluoroforer kan udsende lys ved en bestemt bølgelængde, når en konformationsændring sker i et protein, eksempelvis grundet binding af et lægemiddel. I dag er der



Figur 1. pH-målinger kan foregå ved brug af forskellige metoder, såsom pH-meter (a), phenolphthalein farvestof (øverst b) og pH-papir (nederst b), samt ved brug af fluorescerende molekyler, såsom aminoanthracener (c).



Figur 2. pH har betydning for lægemidlers protonisering, og dermed også om de kan passere over celled membraner, der består af et dobbeltlag af fosfolipider. På ladet form kan nikotin eksempelvis ikke passere over celled membranen (højre), mens det er muligt, når stoffet ikke er ladet (venstre).

også udviklet pH-sensitive fluoroforer til undersøgelse af pH-værdi på mikroskopisk skala (figur 1c).

pH-sensitive fluoroforer kan for eksempel opdeles i, hvorvidt fluorescensegenskaberne ændrer sig i forskellige pH-værdier grundet en brudt binding i fluoroforen (eksempelvis fluorescein) eller grundet en protonisering af en funktionel gruppe tæt på fluoroforen (eksempelvis en aminoanthracen). Fordelene ved fluorescens er blandt andet, at det er mere sensitivt at måle fremfor absorbans, som kolorimetrisk pH-indikatorer bygger på, samt at det kan måle pH-værdi på mikroskopisk skala. Dette gør fluoroforer anvendelige til undersøgelser i kemisk biologi, hvor pH spiller en rolle for både biologisk funktion og lægemiddeltransport.

Hvorfor måle pH - biologiske og kemiske implikationer

Vigtigheden af pH-værdi kan ses i biologien, hvor en ubalance i pH ofte leder til katastrofale konsekvenser. Eksempelvis kan for lav pH i blodet lede til koma eller død under koma, og en for høj pH i blodet kan lede til opkast og muskel-



Foto: Wikimedia

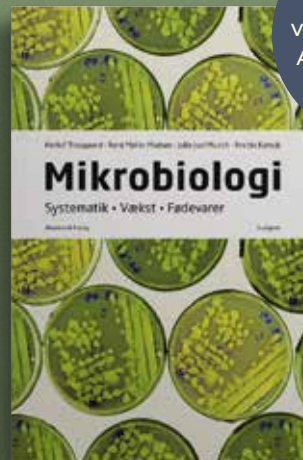
spasmer. Derfor er pH under stram kontrol i biologiske systemer og varierer typisk meget lidt. Et eksempel kan findes i den menneskelige biologi, hvor blodet har sit eget buffersystem, som holder pH-værdien stabil mellem 7,35-7,45. I vores krop har også visse cellekomponenter en bestemt pH for at optimere deres funktion, eksempelvis "cellernes maver", lysosomer, samt vores mavesæk, hvor pH-værdien holdes lav for at hjælpe på fordøjelsen. pH er også vigtigt i vandmiljøer, såsom søer, hvor alger kan vokse i lavere pH og forgifte resten af søens liv, eller i svømmehaller, hvortil

den karakteristiske lugt af klor skyldes et behov for at justere pH-værdien af vandet. I fødevarer spiller pH så vigtig en rolle, at vi bruger begrebet "sur" til at beskrive en smag, som kendetegnes ved den lave pH-værdi af eksempelvis citronsaft og lemonade.

Også i kemiske processer og syntese kan man bruge pH fordelagtigt. I mange kemiske synteser benyttes en vandig oparbejdning for at adskille kemiske biprodukter fra ens organiske ("olie") fase indeholdende synteseproduktet. pH-værdien af vandfasen kan man variere for at frasortere kemiske biprodukter med enten syre- eller basegrupper. Den kemiske struktur af et lægemiddel er også sigende for, hvordan lægemidlet interagerer med proteiner og andre makromolekyler i vores krop. Sure og basiske funktionelle grupper i lægemidler kan nemlig skabe stærke intermolekylære bindinger til deres biologiske target gennem ion-bindinger. Dog kommer evnen til at skabe disse stærke ion-bindinger også med en ulempe: Lægemidlerne kan blive overordnede ladet, enten negativt eller positivt. Denne ladning er afhængig af både pH-værdien af det vandige

Styrk dine kompetencer

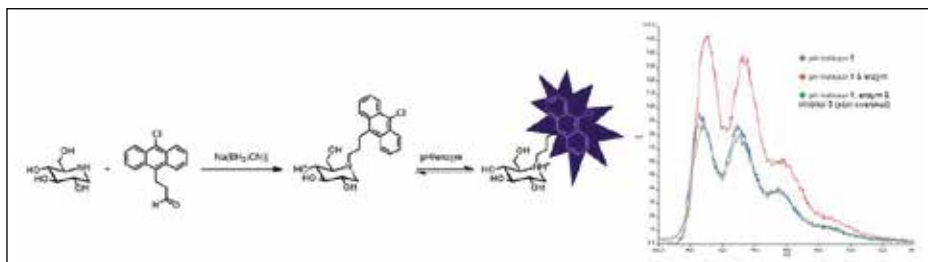
Hos Akademisk Forlag har vi en lang række bøger inden for bioteknologi, kemi og fødevarer, som giver dig mulighed for at videreudvikle dine kompetencer.



Find alle
vores bøger på
Akademisk.dk

AKADEMISK FORLAG

Vi udgiver fagbøger til dig, der gerne vil dygtiggøre dig inden for fx tekniske fag og ledelse. Du finder også velkendte titler fra PRAXIS – Nyt Teknisk Forlag, som er en del af Akademisk Forlag.



Figur 3. Undersøgelse af glucosidase inhibitorer som pH-indikatorer. En glucosidase inhibitor forbindes med en anthracen gennem reductiv aminering, og slutproduktet kan bruges som fluorescerende pH-indikator for enzymets aktive site (venstre). Ved tilsætning af enzym stiger fluorescensen (rød), relativt til pH-indikatoren selv (blå), og når man udkonkurrerer pH-indikatoren med en ikke-fluorescerende inhibitor falder fluorescensen igen (grøn). Dette indikerer et surt aktivt site, som kan protonisere aminen i pH-indikatoren.

miljø, hvori lægemidlet befinder sig, men også pK_a -værdien af lægemidlet, som påvirkes af syre-base egenskaberne og de elektrondonerende eller -tiltrækkende egenskaber fra de funktionelle grupper i lægemidlet. pK_a -værdien beskriver netop den pH, hvor lægemidlets funktionelle gruppe findes halvt på ladet og halvt på uladet form. Rent kemisk skyldes den overordnede ladning et enkelt proton, som enten er afgivet eller optaget af den sure eller basiske gruppe, men i praksis kan det ene proton betyde forskellen mellem, hvorvidt vores krop kan optage lægemidlet eller ej (figur 2, side 16).

Vores krop har et væld af forsvarsværker, som hver dag beskytter os mod potentielt skadelige organismer og kemikalier. I medicinalkemi er lægemiddeldesign dermed altafgørende. Et lægemiddel skal ikke blot kunne påvirke det biologiske target med høj selektivitet for at undgå bivirkninger. Det skal også til en vis grad kunne modstå kroppens metabolisme, nedbrydning, samt kunne passere fysiske barrierer, såsom hud, cellemembraner og blodhjernebarrieren. Mange af disse barrierer tillader ikke passage af ladede stoffer, da de cellemembraner, man finder i hud, celler og selv blodhjernebarrieren, består af et dobbeltlag af polære fosfatgrupper, som er forbundet med hydrofobe lipidkæder, der frastøder ladede molekyler (figur 2, side 16). Hvis ladede lægemidler skal over cellemembranen, skal der derfor ofte aktiv transport, og dermed energi, til. Alternativt kan man skjule grupperne med syre-base egenskaber med beskyttelsesgrupper, som først tages af, når lægemidlet har nået sit målmolekyle, eller man kan indsprøjte lægemidlet lokalt. Dermed kommer den overordnede ladning af et lægemiddel til at spille en afgørende rolle for lægemidlets formulering og struktur.

Måling af pH, eksempelvis med fluorescerende pH-indikatorer, kan dermed give os viden om biologien på mikrosko-

pisk niveau, samt hvordan lægemidler skal se ud.

Eksempel: Glucosidase inhibitorer med pH-indikatorer

Vi bruger fluorescerende pH-indikatorer til at analysere bindingsinteraktioner mellem inhibitorer og enzymer på mikroskopisk niveau: Inde i den biologiske bindingslomme.

Tidligere har vi undersøgt såkaldte glucosidase inhibitorer, der hæmmer glucosidase. Dette enzym spiller en rolle i sygdommen, der betegnes Gauchers sygdom, som er den hyppigste lysosomale sygdom med skadelig påvirkning af både lever, milt og skelet.

Vi startede vores undersøgelser med at tage udgangspunkt i de kemiske strukturer for en række kendte glucosidase inhibitorer. Gennem kemisk syntese lavede vi modificeringer på stofferne, så de indeholdt en anthracen, en fluorescerende funktionel gruppe (figur 3). Vi undersøgte herefter de fluorescerende egenskaber på et spektrofluorometer og indså, at den pH-afhængige protonisering af aminen i alle glucosidase inhibitorer kunne påvirke fluorescen-

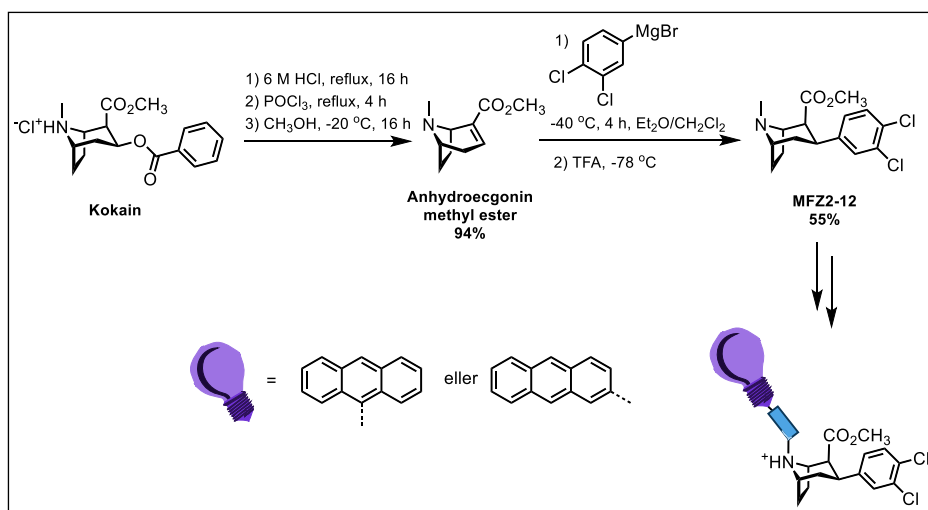
sen af anthracenen. Dermed havde vi udviklet en række fluorescerende pH-indikatorer, som vi senere fandt, kunne afsløre pH-værdien i bindingslommen på glucosidase enzymerne. I praksis undersøgte vi de fluorescerende pH-indikatorers fluorescens i fravær af eller med enzym til stede. På trods af ikke at udvise meget fluorescens i det vandige miljø alene, så vi en forøgelse af fluorescens med enzym til stede, hvilket indikerede et lav-pH mikromiljø inde i enzymets bindingslomme. Hvis vi brugte høje koncentrationer af en ikke-fluorescerende inhibitor (inhibitor 5), kunne vi udkonkurrere de fluorescerende pH-indikatorer fra bindingslommen og dermed få fluorescensen ned på tilsvarende niveau, som hvis vi ikke havde enzymet til stede (figur 3).

Gennem disse undersøgelser på en lang række af glucosidase inhibitorer som pH-indikatorer fandt vi ud af, at på trods af små forskelle i den kemiske struktur af glucosidase inhibitorer, kunne der være stor forskel på, hvorvidt inhibatoren var protoniseret eller ej, når den bandt i bindingslommen, idet nogle enzymer havde et meget surt aktivt site og andre et mere basisk aktivt site.

Her havde vi for første gang påvist en måde til at undersøge mikrodømmens pH-værdi i de opløselige enzymer, glucosidaser. Metoden er dog ikke begrænset hertil.

Eksempel: Dopamintransporteren - et transmembran protein

Fluorescerende pH-indikatorer har derved fundet anvendelse i biologiske systemer med vandopløselige proteiner. Dog findes der klasser af proteiner, som ikke er vandopløselige, men derimod



Figur 4. Kemisk syntese af fluorescerende pH-indikatorer, som virker som inhibitorer af dopamintransporteren. Ved at variere linkerens (blå rektangel) og substitution af anthracenen (lilla lampe) kunne vi få inhibitorer op til 10 gange bedre end kokain selv.

forankret i cellemembraner, eksempelvis såkaldte transmembrane proteiner. I disse proteiner findes der også mikromiljøer, hvor pH-værdien afviger væsentligt fra det omgivende miljø, hvilket kan spille en rolle i forhold til bindingsinteraktioner mellem proteinet og lægemidler. Det er ikke utænkeligt, at brugen af fluorescerende pH-indikatorer kan få en betydning for diagnosticering og lægemiddeludvikling. De vil kunne belyse lokationen af proteinet, samt hvilke syre-baseegenskaber et lægemiddel skal have for at opnå optimale bindingsinteraktioner med proteinet.

Et eksempel på et transmembran protein, som er værd at undersøge nærmere, er dopamintransporten. Dopamin er et neurotransmitter-stof, som regulerer bevægelse, læring og belønning. Dopamintransporteren er en vigtig brik til at styre dopaminbalancen i hjernen, hvortil en ubalance i dopaminsystemet ses ved ADHD, Parkinsons sygdom, samt kokainafhængighed. Dermed er dopamintransporteren også et interessant lægemiddel target, som vi er begyndt at undersøge nærmere ved brug af fluorescerende molekyler. Disse molekyler

har, ligesom glucosidase inhibitorerne, en anthracen som lampe, der udsender lys, og en såkaldt ligand-lignende struktur, der minder om kokain og dermed binder stærkt til dopamintransporteren. Som i vores tidligere projekt, startede projektet med kemisk syntese af inhibitorer (figur 4).

Her benyttede vi kokain som startmateriale til at lave et kemisk intermediat (anhydroecgonin methyl ester), som vi kunne funktionalisere til mange forskellige phenyltropan inhibitorer med varierende bindingsaffinitet til dopamintransporteren. Vi valgte at gå videre med MFZ2-12, en meget potent inhibitor af dopamintransporteren. Efterfølgende modificerede vi disse inhibitorer, så de indeholdt en kæde med varierende længde og udformning, en såkaldt ”linker”, forbundet til en anthracen. Gennem struktur-aktivitetsanalyser på resultater opnået fra bindingsforsøg på celler, som udtrykker den humane dopamintransporter, kunne vi optimere den kemiske struktur på vores fluorescerende pH-indikatorer. Dermed udviklede vi fluorescerende pH-indikatorer mod dopamintransporteren, som var op til 10

gange bedre bindere, relativt til kokain, der allerede er en stærk inhibitor.

Efterfølgende fluorescensforsøg ved forskellige pH-værdier viste, at disse kemiske strukturer kunne fungere som fluorescerende pH-indikatorer til at måle pH i dopamintransporterens bindingslomme.

Målet i fremtiden er at undersøge bindingsinteraktionerne mellem potentielle lægemidler og dopamintransporteren, så vi kan få et værktøj til at bestemme pH i dopamintransporteren og bruge den viden til udvikling af nye lægemidler.

Konklusion

pH-værdi spiller en vigtig rolle i biologien, herunder hvordan lægemidler virker, men bliver ofte overset. Fluorescerende pH-indikatorer til at måle mikrodomæners pH-værdier kan få fremtidig betydning for diagnosticering af sygdomme og lægemiddeludvikling. Vi har kun taget de første skridt på vejen, men er forventningsfyldte og afventer det væld af muligheder, som fremtiden kan byde.

E-mail:

Mikael Bols: bols@chem.ku.dk

Kemikaliekøleskab med udsug

Temperaturkontrolleret kemikalieopbevaring

Personsikkerhed på 15 sekunder

Mød os på
LabDays i Århus
13-14 September 2023

SCOTSMAN BioMedical
a part of SCOTSMAN KøleTeknik

Jernholmen 48D • 2650 Hvidovre

Kontakt os for yderligere oplysninger
Telefon **7015 3388**

E-mail: Jesper Krone • jk@scotsman.dk



www.scotsman.dk