

Neue Trends bei der Verwendung von Biosensoren auf der Basis evaneszierender Wellen

Thomas Weimar*

Evaneszierende Wellen und Biosensoren

In den letzten Jahren haben Biosensoren für die Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen eine zunehmende Bedeutung erlangt. Insbesondere die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz- (Surface Plasmon Resonance, SPR)^[1] und die Resonanzspiegel-Technik (Resonant Mirror, RM)^[1] werden häufig in Biosensoren eingesetzt. Dies lässt sich unter anderem an den weit mehr als eintausend Veröffentlichungen erkennen, die sich mit der Anwendung von SPR- oder RM-Biosensoren bei der Analyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen beschäftigt haben.

Als optische Methoden verwenden sowohl die RM- als auch die SPR-Technik evaneszierende Wellen,^[1] um primär den Brechungsindex einer (wässrigen) Lösung in der Nähe der Sensoroberfläche zu bestimmen. Daher sind beide Verfahren zunächst unspezifisch, durch die optische Detektion aber sehr empfindlich. Spezifität erlangen die Sensoren durch die Modifizierung der in der Lösung befindlichen Oberfläche, z.B. durch die Immobilisierung eines Proteins. Als Trägeroberflächen werden dabei dünnste Schichten von Gold, anderen Edelmetallen oder glasähnlichen Materialien verwendet. Wird nun ein Bindungspartner zu der Lösung über der Sensoroberfläche gegeben, reichert sich dieser durch die Komplexbildung an der Oberfläche an. Die dadurch hervorgerufene Änderung des Brechungsindex der Lösung über der Sensoroberfläche korreliert mit der Massenzu- oder -abnahme des Sensors während der Komplexreaktion (Abbildung 1).

Die Experimente lassen sich in kurzer Zeit (wenige Minuten) und mit sehr kleinen Probenmengen durchführen, was sie für das Wirkstoffscreening interessant macht. Für die Untersuchung von biologischen Fragestellungen sind die erhaltenen Signalverläufe aber wesentlich wertvoller, da sich aus ihnen prinzipiell die Gleichgewichtskonstante sowie die Zeitkonstanten (Assoziations- (On-rate) oder Dissoziationsgeschwindigkeit (Off-rate)) der Komplexreaktion bestimmen lassen. Aufgrund der optischen Detektion gelingen so Ein-

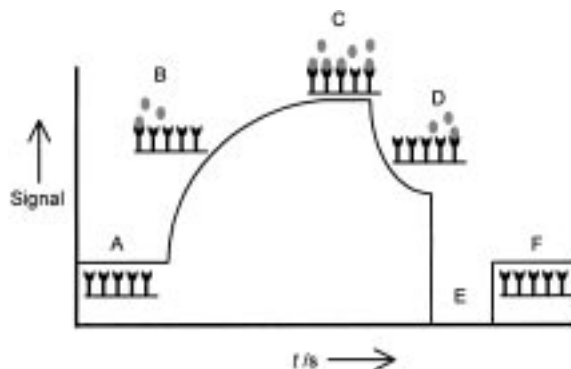


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Signalabhängigkeit von der Beschaffenheit der Oberfläche während eines Resonanzspiegel- oder Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experiments. A) Basislinie nach der Vorbereitung der Sensoroberfläche z.B. durch Immobilisierung eines Proteins. B) Während der Zugabe eines Bindungspartners zur Lösung beginnt die Komplexbildung. Dieser Vorgang ändert den Brechungsindex an der Sensoroberfläche und das Messsignal steigt an. C) Wird das Experiment bis zur Einstellung des Gleichgewichts durchgeführt, so erhält man ein Plateau. D) Nach dem Entfernen des Bindungspartners aus der Lösung, dissoziiert der Komplex und das Messsignal fällt ab. E), F) Abbruch des Experiments und Regeneration der Oberfläche ohne Deaktivierung des Proteins führen zurück zur Basislinie. Die Assoziations- und die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexbildung lassen sich aus den ansteigenden bzw. abfallenden Abschnitten der Kurve durch mathematische Verfahren ermitteln.

blicke in die zeitliche Abfolge der Komplexbildung ohne jegliche Markierung der Moleküle. Die erhaltenen kinetischen und thermodynamischen Informationen ergänzen Strukturdaten der untersuchten Systeme und sind daher für Struktur-Wirkungs-Beziehungen von biomolekularen Komplexen von großer Bedeutung.

Membransysteme auf Sensoroberflächen

Die Immobilisierung eines Moleküls an der Sensoroberfläche hat den Verlust von Translations- und Rotationsfreiheitsgraden zur Folge, was die hier beschriebenen Techniken prinzipiell von anderen biophysikalischen Methoden, bei denen alle Bindungspartner in Lösung vorliegen, unterscheidet. Allerdings finden auch viele wichtige biomolekulare Erkennungsreaktionen an Oberflächen, nämlich Zelloberflächen, statt. Daher liegt es nahe, artifizielle Membransysteme auf den Sensoroberflächen zu bilden, um so z.B. Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in einer möglichst natürlichen

[*] Dr. T. Weimar
Institut für Chemie
Medizinische Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)
Fax: (+49) 451-500-4241
E-mail: thomas.weimar@chemie.mu-luebeck.de

Umgebung untersuchen zu können. In der letzten Zeit wurden aus diesem Grund verschiedene Konzepte entwickelt, um Membranen und darin eingebettete Proteine auf Sensoroberflächen aufzubringen. Das vordergründig einfachste Konzept ist die Immobilisierung von Alkanen durch eine Thiofunktion auf einer reinen Goldoberfläche. Diese funktionalisierten Kohlenwasserstoffe bilden auf der Sensoroberfläche eine hydrophobe, sich selbst organisierende Monoschicht, auf der mit Lipiden eine immobilisierte Doppelmembran aufgebaut werden kann (Abbildung 2a). Mit solchen Membransystemen wurden z.B. die Bindung von Faktor VIII^[2] oder antibakteriellen Peptiden^[3] an Membranen, die Wechselwirkung einer Protein-Kinase mit Phospho-

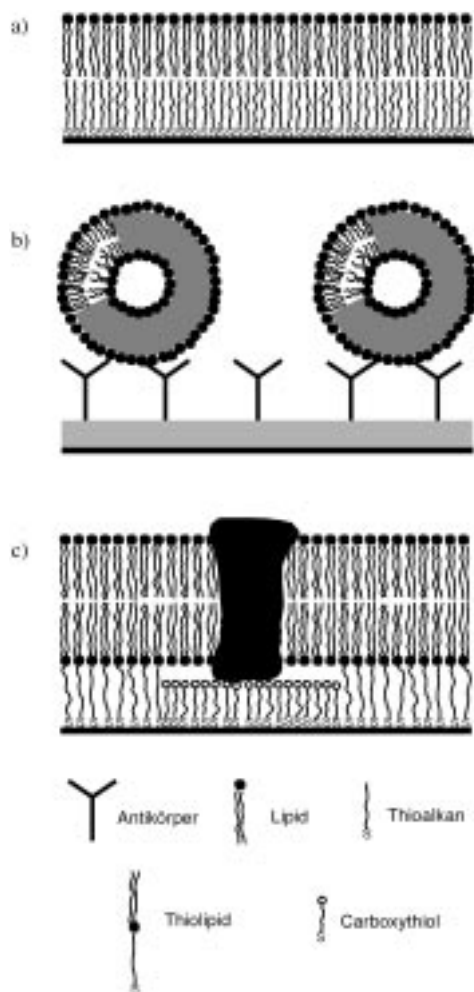


Abbildung 2. Unterschiedliche Strategien zum Aufbau von künstlichen Membransystemen auf Sensoroberflächen. a) Direkt auf der Sensoroberfläche immobilisierte Thioalkane stellen eine hydrophobe Fläche bereit, an der sich Lipide zu einer Doppelmembran anlagern können. In diese Lipiddoppelschicht können keine transmembranständigen Proteine eingelagert werden. b) An einer auf der Sensoroberfläche befindlichen modifizierten Dextranmatrix lassen sich Anti-Lipopolysaccharid-Antikörper immobilisieren. Diese Antikörper binden dann Liposomen die Lipopolysaccharide enthalten.^[10] Nach diesem Schritt kann die Bindung von Molekülen an die Liposomen oder darin eingelagerten Proteinen untersucht werden. c) Spezielle Thiolipide und Carboxythiole bilden die Basis zum Aufbau einer Doppelmembran in einem bestimmten Abstand zur Oberfläche des Biosensors.^[14] Auch mit dieser Methode lassen sich transmembranständige Proteine in eine künstliche Membran einbauen und als rezeptive Einheit verwenden.

lipiden^[4] und die Bindung von Lectinen^[5] sowie von Cholera-Toxin^[6] an Glycolipidsysteme untersucht. Es gelang auch, einen funktionell intakten nikotinischen Acetylcholinrezeptor^[7] sowie Cytochrom-C-Oxidase^[8] in solche künstlichen Membranen einzulagern. In einem ähnlich aufgebauten System konnte kürzlich sogar ein aus 28 Untereinheiten aufgebauter multikatalytischer Proteasekomplex (20-S-Proteasom) an einer Doppelmembran aufgebaut werden.^[9]

Die direkt auf der Sensoroberfläche aufgebauten Doppelmembranen haben allerdings den Nachteil, dass keine membrandurchspannenden Proteine darin eingelagert werden können. Sollen solche Proteine in den Membransystemen untersucht werden, müssen die Membranen durch Trägermoleküle in einem bestimmten Abstand über der Sensoroberfläche fixiert werden. Als ein solches Trägermolekül wird z. B. der monoklonale *anti*-Lipopolysaccharid-Antikörper SE155-4 eingesetzt, dessen Ligand als Lipopolysaccharid optimale Eigenschaften zur Verankerung von Mizellen oder Lipiddoppelschichten auf dem Biosensor aufweist (Abbildung 2b).^[10] Alternativ können auch immobilisiertes Avidin oder Streptavidin genutzt werden, um biotinylierte Lipide auf die Oberfläche aufzubringen. Auf diese Weise immobilisierte Vesikel wurden für die Bindung mitochondrialer Kreatinkinase^[11] und Recoverin^[12] verwendet.

Eine neue Entwicklung ist außerdem die direkte Modifizierung einer an Gold gekoppelten Dextranmatrix mit hydrophoben Ankern durch die Liposomen immobilisiert werden können.^[13] Weiterhin wurden spezielle Thiolipide eingesetzt, um die Doppelmembran in einem bestimmten Abstand über der Sensoroberfläche zu fixieren (Abbildung 2c). Auf diese Weise gelang es, Rhodopsin in vorbestimmte Bereiche einer Membran einzulagern und die lichtinduzierte Umsetzung von Transduzin durch Rhodopsin zu untersuchen.^[14]

Probenvolumen und Empfindlichkeit

Die Weiterentwicklung der SPR-Technologie durch die Firma Biacore AB hat mittlerweile zu entscheidenden Verbesserungen hinsichtlich des Probenverbrauchs und der Empfindlichkeit der Geräte geführt. Mit den Geräten der neuen Generation ist es möglich, Massenänderungen der Sensoroberflächen von wenigen Pikogramm zu detektieren. Dabei entspricht die Fläche der Sensoroberfläche in der Messzelle ca. 1 mm². Zusätzlich wurde das Volumen der verwendeten Flusszellen auf ca. 21 nL verkleinert, was den Verbrauch des gelösten Bindungspartners stark verringert. Mit diesen SPR-Geräten ist es nun möglich, die Bindung von niedermolekularen Verbindungen mit Molekulargewichten deutlich unter 1000 Da z. B. an immobilisierte Proteine bis in den Bereich von Dissoziationskonstanten im Millimolbereich zu untersuchen. Dies konnte am Beispiel eines gegen Oligoglucose gerichteten monoklonalen Antikörpers und kleinen (Di- bis Tetrasaccharid-) Liganden demonstriert werden.^[15] Damit eröffnen sich vollständig neue Einsatzgebiete dieser Geräte für das Wirkstoffscreening oder die Untersuchung der Bindung von kleinen und niedrigaffinen Liganden an Rezeptoren.

Kopplung von SPR und Massenspektrometrie

Verwendet man die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz zur Suche nach bioaktiven Wirkstoffen aus Substanzbibliotheken, so kann an den erhaltenen Kurven zwar abgelesen werden, ob die Bibliothek biologische Aktivität aufweist, die Identifizierung der bioaktiven Komponente aus einem komplexen Gemisch ist direkt aber nicht möglich. Als eine der empfindlichsten analytischen Methoden, mit der Aussagen hinsichtlich der Struktur und der Zusammensetzung einer Substanz möglich sind, bietet sich in diesem Fall der Einsatz der Massenspektrometrie an. Die Kopplung von SPR und matrix-unterstützter Laserdesorption/ionisations-Flugzeit-(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie ermöglicht daher die Charakterisierung von bioaktiven Substanzen direkt im Anschluss an das SPR-Experiment. Dazu werden die Sensoroberflächen nach der SPR-Untersuchung mit der für das MALDI-TOF-Experiment benötigten Matrix behandelt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Auf diese Weise können bioaktive Komponenten bis in den subfemtomolaren Bereich direkt vom Biosensor charakterisiert werden.^[16] Dazu muss der Biosensor allerdings nach jedem positiven SPR-Experiment aus dem Gerät entnommen und für die MALDI-TOF-Untersuchung vorbereitet werden. Dies ist zeit- und kostenintensiv, da der Biosensor nach der Beladung mit der MALDI-TOF-Matrix nicht mehr für weitere SPR-Experimente benutzt werden kann. Eine Weiterentwicklung der SPR-MALDI-TOF-Kopplung ermöglicht daher mittlerweile die Rückgewinnung von bioaktiven Komponenten in einem kleinen Volumen direkt vom Biosensor. Die so aufgefangene(n) Substanz(en) können dann im Anschluss der MALDI-TOF-Analyse zugeführt werden. Auch auf diese Weise ist die Analyse von Substanzmengen im Subfemtomolbereich möglich,^[17] der Biosensor bleibt aber intakt und kann sofort für weitere Messungen eingesetzt werden.

Mobile SPR-Sensoren

Einer weiten Verbreitung von Oberflächen-Plasmonen-Resonanz- oder Resonanzspiegel-Geräten zur Bestimmung von Brechungsindizes und den sich daraus ableitenden Verwendungsmöglichkeiten steht in der Praxis die Größe der Geräte und insbesondere deren hoher Preis entgegen. Als Alternative bieten sich in diesem Falle die von Texas Instruments entwickelten SPREETA-Sensoren an.^[18] Diese Geräte vereinen die Sensoroberfläche mit allen optischen und elektronischen Bauteilen, die für SPR-Untersuchungen benötigt werden, in einer kompakten (ca. $3 \times 4.2 \times 1.5$ cm) und leichten (ca. 7 g) Apparatur, die sich kostengünstig produzieren lässt (Abbildung 3). Eine ebenfalls transportable Schnittstelle handhabt die Datenaufnahme sowie die Weiterleitung der Daten an einen herkömmlichen PC, durch den die Auswertung mit einem MS-Windows-Programm erfolgt. Auch die SPREETA-Sensoren ermöglichen die Bestimmung des Brechungsindex von Lösungen und eignen sich somit für eine Vielzahl von Anwendungen, wie z.B. der Kontrolle des Zuckergehaltes von Erfrischungsgetränken. Entsprechend dem Einsatz der wesentlich größeren stationären SPR-Geräte lassen sich die Sensoren aber auch zur Untersuchung von

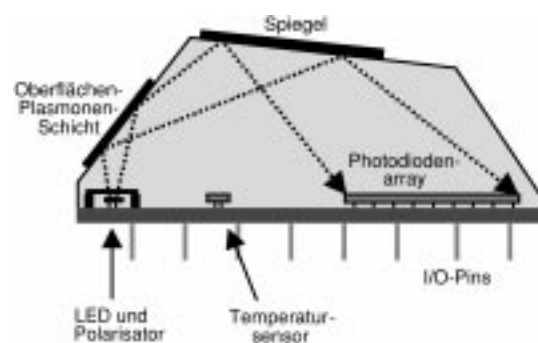


Abbildung 3. Aufbau und Strahlengang eines SPREETA-Sensors (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Texas Instruments, Dallas, TX).

biomolekularen Wechselwirkungen einsetzen. Dies konnte am Beispiel der Bindung von Kreatinkinase an einen auf der Sensoroberfläche immobilisierten *anti*-Kreatinkinase-Antikörper gezeigt werden.^[19] Auch wenn die Empfindlichkeit der modernen stationären SPR-Geräte mit den SPREETA-Sensoren nicht erreicht wird, sollte die Möglichkeit, kostengünstige und kleine SPR-Apparaturen für die verschiedensten Einsatzgebiete zu entwickeln, die Verbreitung dieser Biosensortechnologie vorantreiben.

Fazit

SPR- und RM-Biosensoren haben seit ihrer Einführung eine stete Weiterentwicklung erfahren und werden dementsprechend in den verschiedensten analytischen Bereichen eingesetzt. Für viele dieser Bereiche, wie Umweltanalytik oder Produktkontrollen in der lebensmittelproduzierenden Industrie, gibt es bereits maßgeschneiderte Lösungen, in denen Biosensoren verwendet werden. Für den biologisch orientierten Chemiker oder Biochemiker haben sich mit den hier beschriebenen Fortschritten der Biosensortechnologie neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Protein-Ligand- oder anderen biomolekularen Wechselwirkungen eröffnet, sodass diese Techniken in absehbarer Zeit zum Standardrepertoire von biologisch orientierten Laboratorien gehören werden.

- [1] Eine gut verständliche Einführung in SPR, RM sowie evaneszierende Wellen findet sich in: a) R. L. Earp, R. E. Dessy in *Commercial Biosensors: Applications to Clinical, Bioprocess and Environmental Samples* (Hrsg.: G. Ramsay), Wiley, New York, **1998**, S. 99–164; b) D. R. Purvis, D. Pollard-Knight, P. A. Lowe in *Commercial Biosensors: Applications to Clinical, Bioprocess and Environmental Samples* (Hrsg.: G. Ramsay), Wiley, New York, **1998**, S. 165–227.
- [2] E. L. Saenko, D. Scandella, A. V. Yakhyayev, N. J. Greco, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27918–27926.
- [3] W. Wang, D. K. Smith, K. Moulding, H. M. Chen, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27438–27448.
- [4] R. A. Currie, K. S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C. P. Downes, P. Cohen, D. R. Alessi, J. Lucocq, *Biochem. J.* **1999**, 337, 575–583.
- [5] D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10575–10582.
- [6] a) G. M. Kuziemko, M. Stroh, R. C. Stevens, *Biochemistry* **1996**, 35, 6375–6384; b) N. Athanassopoulou, R. J. Davies, P. R. Edwards, D. Yeung, C. H. Maule, *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, 27, 340–343.
- [7] Y.-Y. Yu, B. J. Van Wie, A. R. Koch, D. F. Moffett, W. C. Davies, *Anal. Biochem.* **1998**, 263, 158–168.

- [8] Z. Salamon, G. Tollin, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 858–867.
 [9] I. T. Dorn, R. Eschrich, E. Seemüller, R. Guckenberger, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 1027–1036.
 [10] a) C. R. MacKenzie, T. Hiram, K. K. Lee, E. Altman, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5533–5538; b) B. A. Harrison, C. R. MacKenzie, T. Hiram, K. K. Lee, E. Altman, *J. Immunol. Methods* **1998**, *212*, 29–39; c) M. J. Kaminisky, C. R. MacKenzie, M. J. Mooibroek, T. E. S. Dahms, T. Hiram, A. N. Houghton, P. B. Chapman, S. V. Evans, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5597–5604.
 [11] O. Stachowiak, M. Dolder, T. Wallimann, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15522–15528.
 [12] C. Lange, K.-W. Koch, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12019–12026.
 [13] WWW-URL: <http://www.biacore.com/new/pioneer.html>.
 [14] S. Heyse, O. P. Ernst, Z. Dienes, K. P. Hofmann, H. Vogel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 507–522.
 [15] a) S. Ohlson, M. Strandh, H. Nilshans, *J. Mol. Recognit.* **1997**, *10*, 135–138; b) M. Strandh, B. Persson, H. Roos, S. Ohlson, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 188–190.
 [16] a) J. R. Krone, R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, R. Granzow, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 124–132; b) R. W. Nelson, J. R. Krone, O. Jansson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4363–4368; c) R. W. Nelson, J. R. Krone, O. Jansson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4369–4374; d) R. W. Nelson, J. W. Jarvik, B. E. Taillon, K. A. Tubbs, *Anal. Chem.* **1997**, *71*, 2858–2865.
 [17] C. P. Sönksen, E. Nordhoff, Ö. Jansson, M. Malqvist, R. Roepstorff, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2731–2736.
 [18] a) WWW-URL: <http://www.ti.com/spreeta>; b) J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury, *Sens. Actuators B* **1996**, *35*, 1–5.
 [19] J. L. Elkind, D. I. Stimpson, A. A. Strong, B. U. Bartholomew, J. L. Melendez, *Sens. Actuators B* **1999**, *54*, 182–190.

Sequenzierung von Polysacchariden

Petra Mischnick*

Chemische Verbindungen, deren Namen mit der Vorsilbe „Oligo“ oder „Poly“ beginnen, erweitern die Fragen nach der Struktur immer noch um den Aspekt der Sequenz. Naturstoffe, die als Gerüstsubstanzen oder Energiedepots dienen, erfordern auf der konstitutionellen Ebene meist nur einfach gestrickte Baupläne, mit denen z. B. die Anforderungen nach mechanischer Festigkeit oder osmotischer Inaktivität erfüllt werden können. Beispiele hierfür sind die allein aus Glucose aufgebauten Polysaccharide Cellulose und Stärke. Anders sieht es aus, wenn Phänomene wie molekulare Erkennung und Informationsspeicherung ins Spiel kommen. Hier dienen die verschiedenen Monomere als Alphabet, mit dem durch unerschöpfliche Kombination der Buchstaben exakte Anweisungen geschrieben werden können, oder als Baukasten für differenzierte makromolekulare Strukturen, die mit hoher Spezifität Rezeptoren oder Substrate erkennen. Paradebeispiele hierfür sind die Nucleinsäuren und die Proteine, deren Sequenzierung längst etabliert ist. Dagegen erregt der Titel „Sequencing Complex Polysaccharides“ einer jüngst von Sasisekharan und Mitarbeitern in *Science* publizierten Arbeit^[1] Aufmerksamkeit. Dies hat verschiedene Gründe: Zum einen erlaubt die Polyfunktionalität der Kohlenhydrate vielfältigere Verknüpfungsmöglichkeiten als bei Nucleotiden und Aminosäuren und schließt Verzweigungen wie zusätzliche Substitutionen ein. Zum anderen hat man die biologische Bedeutung von Kohlenhydraten z. B. für die Zellerkennung und -adhäsion, Entzündungsprozesse oder die Regulation von enzymatischen Reaktionen und damit auch

die analytische Herausforderung vergleichsweise spät erkannt.

Was macht nun die Sequenzanalyse von Oligo- und Polysacchariden so schwierig? Zunächst einmal ist man fast immer mit einer strukturellen Vielfalt konfrontiert. N- und O-Glycane von Glycoproteinen unterscheiden sich je nach Spezies, Gewebe, Zelltyp und Protein. Bei der Biosynthese der Glycosaminoglycane Heparin und Heparansulfat kommt es durch polymeranaloge enzymatische Modifizierung von (D-GlcA β 1,4-D-GlcNAc α 1,4)_n zur teilweisen Isomerisierung der Wiederholungseinheiten zu (L-IdoA α 1,4-D-GlcNAc α 1,4)_n, zu N-Desacetylierung/N-Sulfatierung sowie zu unterschiedlichen O-Sulfatierungsmustern (Abbildung 1), was die Situation kompliziert.^[2] Einem schrittweisen chemischen Abbau von einem Kettenende, wie dem Edman-Abbau von Peptiden, steht die Polyfunktionalität der Kohlenhydrate ebenfalls im Wege. Auch eine Amplifizierung bestimmter Strukturen,

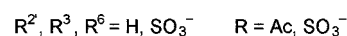
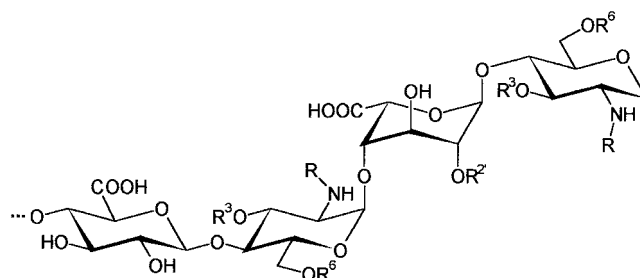


Abbildung 1. Möglicher Ausschnitt aus einem Heparin- oder einem Heparansulfatmolekül (D-GlcA β 1,4-D-GlcNAc α 1,4-L-IdoA α 1,4-D-GlcNAc α 1,4). GlcA = Glucuronsäure, GlcNH₂ = 2-Amino-2-desoxyglucose, IdoA = Iduronsäure.

[*] Prof. Dr. P. Mischnick
 Technische Universität Braunschweig
 Institut für Lebensmittelchemie
 Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig (Deutschland)
 Fax: (+49) 531-391-7230
 E-mail: p.mischnick@tu-bs.de