

SHORTLIST 2007

Kategorie: Wissenschaft / RWS

FACHZEITSCHRIFT DES JAHRES –
PREIS DER
DEUTSCHEN FACHPRESSE



D 13808 F · ISSN 0947-0867

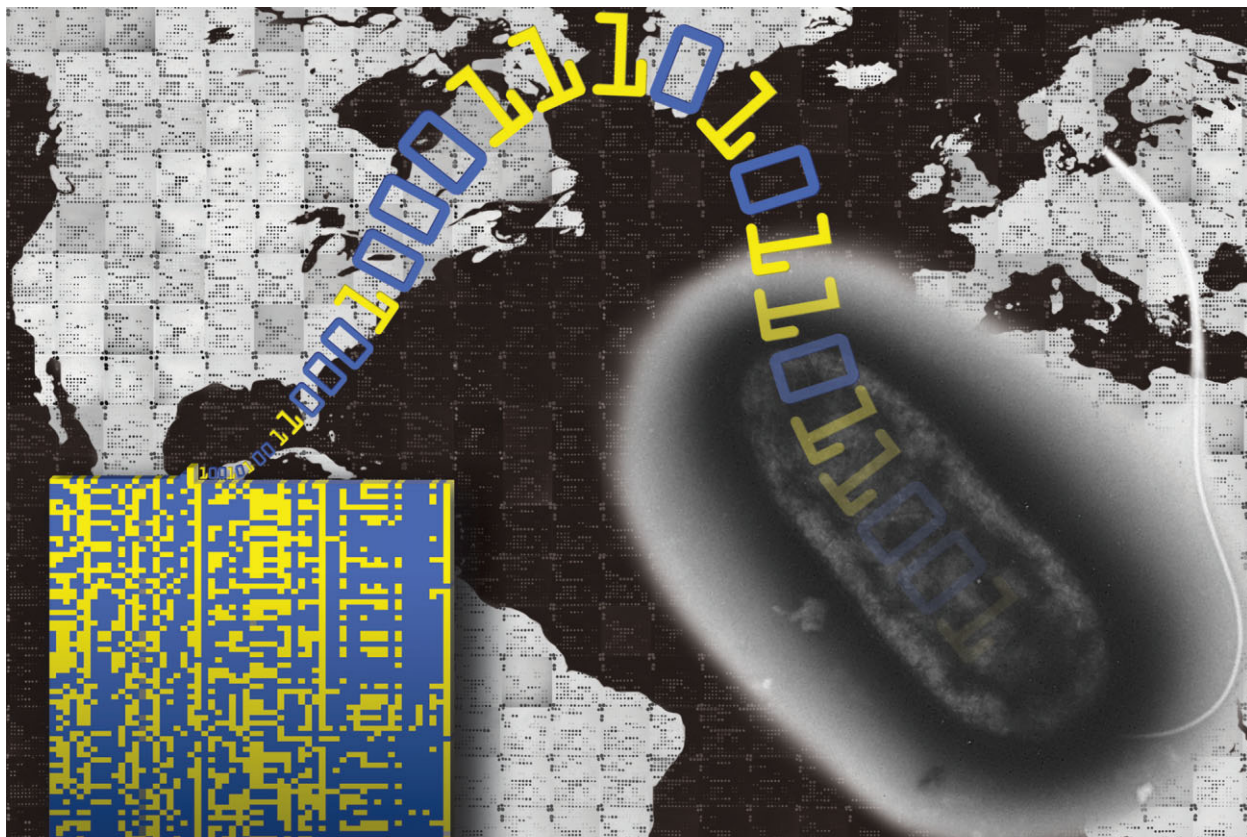
www.biospektrum.de

BIO *spektrum*

Das Magazin für Biowissenschaften

06

Oktober 2007
13. Jahrgang



Sonderdruck aus Methoden & Anwendungen

Schnelle Multi-Schritt-Kinetik mit Affinitäts-Biosensoren

HANS-H. TRUTNAU¹, STEPHAN DREWIANKA², BASTIAN ZIMMERMANN²

¹KINOMICS GMBH, ELTVILLE

²BIAFFIN GMBH & CO KG, KASSEL

Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG



VBio
Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

Interaktionsanalytik

Schnelle Multi-Schritt-Kinetik mit Affinitäts-Biosensoren

HANS-H. TRUTNAU¹, STEPHAN DREWIANKA², BASTIAN ZIMMERMANN²

¹KINOMICS GMBH, ELTVILLE

²BIAFFIN GMBH & CO KG, KASSEL

Affinitätsbasierte Biosensorik ist heute als Standardtechnik in quantitativer biomolekularer Interaktionsanalytik etabliert, bietet jedoch oft nur geringen Probendurchsatz und u. U. keinen Zugang zur Kinetik. Hier wird eine neue Methodik vorgestellt, die bei verbesserter Ergebnissicherheit die Messzeit deutlich reduziert. Der auf dem Sensorchip immobilisierte Ligand wird ohne Zwischenregeneration mit schnell wechselnden Konzentrationen des Analyten kontaktiert. Das Muster der Bindungskurve wird mit neuen Fitting-Algorithmus ausgewertet; diese ergeben detaillierte Kinetik-Konstanten. Diese Multi-Schritt-Kinetik liefert praktisch identische Ergebnisse – bei markanten Ersparnissen in Zeit und Material.

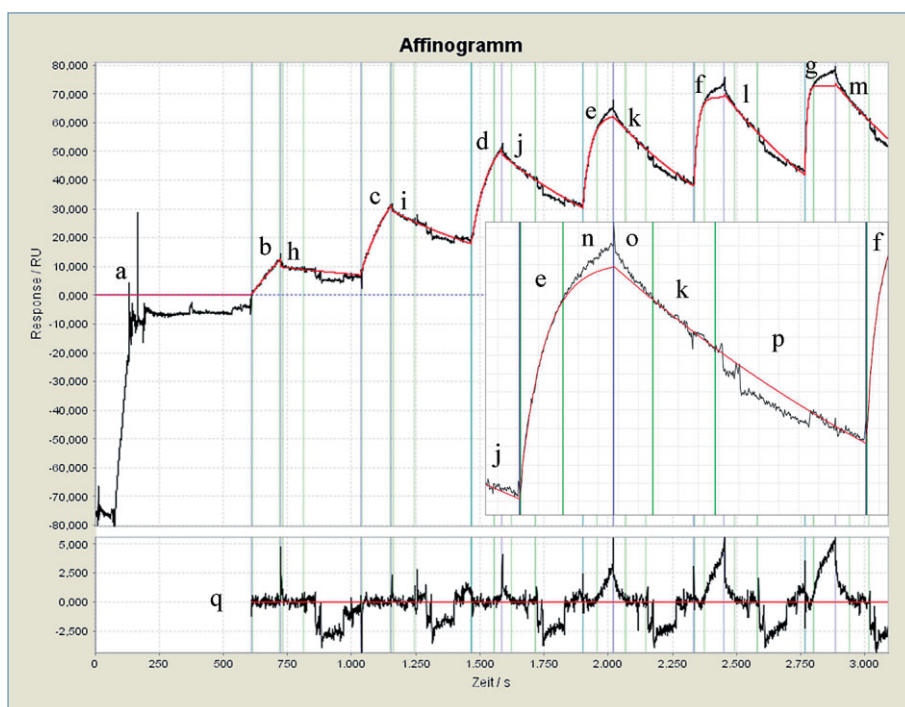
■ Affinitätsbasierte Biosensoren (wie von Biacore AB, jetzt GE Healthcare, Uppsala) haben sich besonders in Kinetik- und Konzentrations-Assays bewährt. Die Hauptvorteile dieser Technik sind die markierungsfreie und zeitaufgelöste (kinetische) Detektion von biologisch aktiven Substanzen, und

zwar mittels Messung der Bindung eines in Lösung befindlichen Analyten an einen auf dem Sensorchip immobilisierten Liganden. Der übliche sequenzielle (SEQ) Assay ist allerdings bezüglich Zeit/Material oft aufwändig: Die Analyt-Injektionen verschiedener Konzentrationen werden durch Regene-

rationsphasen unterbrochen, um vor der nächsten Injektion zur Basislinie zurückzukehren – im SEQ-Ansatz *notwendig* für eine Kinetik-Analyse. Aber nicht nur die Anwendung der Regeneration ist zeitaufwändig, sondern je nach Assay besonders deren Optimierung. In *capture assays* entfernt die Regeneration zudem üblicherweise auch den zielgerichtet eingefangenen Liganden, der vor jeder neuen Analyt-Injektion erneut (und reproduzierbar) auf den Sensor aufgegeben werden muss – ein zusätzlicher Zeit- und besonders Materialfaktor, der zudem die Kinetikqualität beeinflussen kann. Alternativ (bei unmöglicher Regeneration) empfohlene Langzeit-Titrationen des Analyten, jeweils bis zum Erreichen der einzelnen Gleichgewichte, haben noch mehr Zeit und Material benötigt, aber keinen Zugang zu kinetischen Konstanten erlaubt^[1].

Neue Multi-Schritt-Kinetik

Die Multi-Schritt-Kinetik (MSK) benötigt weder Regeneration noch Langzeit-Titration. Vielmehr werden die Analyt-Lösungen in rascher Folge abwechselnd mit Puffer auf den Sensor aufgegeben und die kinetischen Bindungskurven aufgenommen. Die Assoziations- (und Dissoziations-)Teilkurven können, obwohl sie *nicht* an der Basislinie beginnen, mit neu definierten Fittingoptionen hinsichtlich der gewünschten Kinetik-Konstanten ausgewertet werden. Die Assoziations-



◀ **Abb. 1:** Affinogramm des MSK-Laufs mit einmaligem Ligand *capture* (a), abwechselnd gefolgt von sechs Analyt-Injektionen steigender Konzentration (vgl. Text) über je 120 s (Assoziationen b–g) und Puffer-Injektionen über je ca. 100 s (Dissoziationen h–m, jeweils gefolgt von einer Autosampler-Spülphase mit Signalschwankungen durch Druckänderungen). Der eingefügte Ausschnitt zeigt Schritt 4 vergrößert (Fitbereiche e und k innerhalb der grünen Linien; rot = Fitkurve). Die unspezifischen Signalanteile unbekanntes Ursprungs (n, o) sind hier individuell, ebenso wie die Signalschwankungen (p), vom Fitting ausgeschlossen. Die Fit-Residuen (q) sind in den Fitbereichen akzeptabel gering.

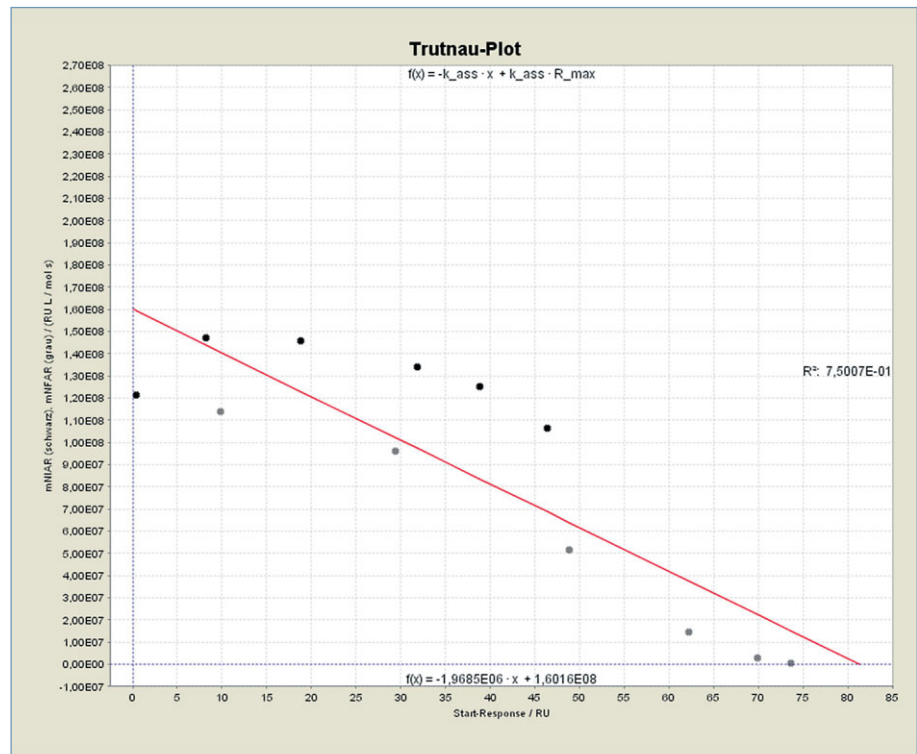
Geschwindigkeitskonstante (k_{ass}) und die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante (k_{diss}) ergeben dann die Dissoziations-Gleichgewichtskonstante (K_D):

$$k_{\text{diss}} \times k_{\text{ass}}^{-1} = K_D \quad (1)$$

In Praxis liefern die abwechselnden Analyt-/Puffer-Injektionen ein ansteigendes „Zick-Zack“-Signal/Zeit-Profil (hier „Affinogramm“ genannt). Das Affinogramm wird in die MSK-Software (Kinomics GmbH) importiert und mit deren spezifischen Fitting-Algorithmen automatisch kreuzüberprüft ausgewertet. Diese Auswertung kombiniert die neuartig bestimmten Ratenänderungen an den Übergängen der Teilkurven mit anderen Parametern (z. B. Exponenten oder Gleichgewichtswerten) des Fittings und erzeugt sechs unterschiedlich konstruierte Kinetik-Grafiken. Alle diese Plots basieren auf Geradengleichungen und interpretieren das Affinogramm anschaulich aus verschiedenen Blickwinkeln. Dies gewährleistet einerseits eine vollständige und möglichst transparente Kinetik-Berechnung und erlaubt andererseits eine Kreuzüberprüfung bezüglich der internen Übereinstimmung (*self-consistency*) der Ergebnisse^[1]. Letztere werden zudem nicht nur numerisch dargestellt, sondern auch farblich visualisiert und bewertet. Dass der MSK-Ansatz grundsätzlich (d. h. ohne Regeneration) erfolgreich anwendbar ist, haben vielfältige Tests^[2] gezeigt; dort beschriebene Limitationen (nur fünf, jeweils gleich lange Injektionen ohne Ausschluss von Ausreißern) hat die Kinomics-Software jedoch nicht.

Ergebnisse und Diskussion

Ein traditioneller SEQ *capture assay* (Protein-Protein-Interaktion^[3]) wurde hier unter MSK-Bedingungen wiederholt, d. h. nach nur einmaligem *capture* des Liganden, während im SEQ-Ansatz der wiederholte *re-capture* des Liganden vor jeder Analyt-Injektion zusätzlich ca. 6 min benötigte. Anti-GST-Antikörper, kovalent auf dem Sensorchip immobilisiert, diente dem *capture* (a in **Abb. 1**) des Liganden (GST-PKI, ein GST-fusionierter hitzestabiler Proteinkinase-Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase). Die Bindung des Analyten (PKA-C_α, die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA) an den Liganden wurde in sukzessiven Injektionen steigender Analyt-Konzentration (1, 2, 4, 8, 16 und 32 nmol l⁻¹, b–g in **Abb. 1**), jeweils gefolgt von einer Puffer-Injektion für die Dissoziation (h–m in **Abb. 1**), verfolgt,



▲ **Abb. 2:** Trutnau-Plot mit *mNIAR* (schwarz) und *mNFAR* (grau) gegen R_{start} aufgetragen. Durch MTL reduzierte Raten (links im Plot) ergeben eine zu niedrige negative Steigung ($= k_{\text{ass}}$) der Regression. Die meisten *mNFAR*-Werte sind zudem (wahrscheinlich durch den „Rebinding“-Effekt) zusätzlich reduziert.

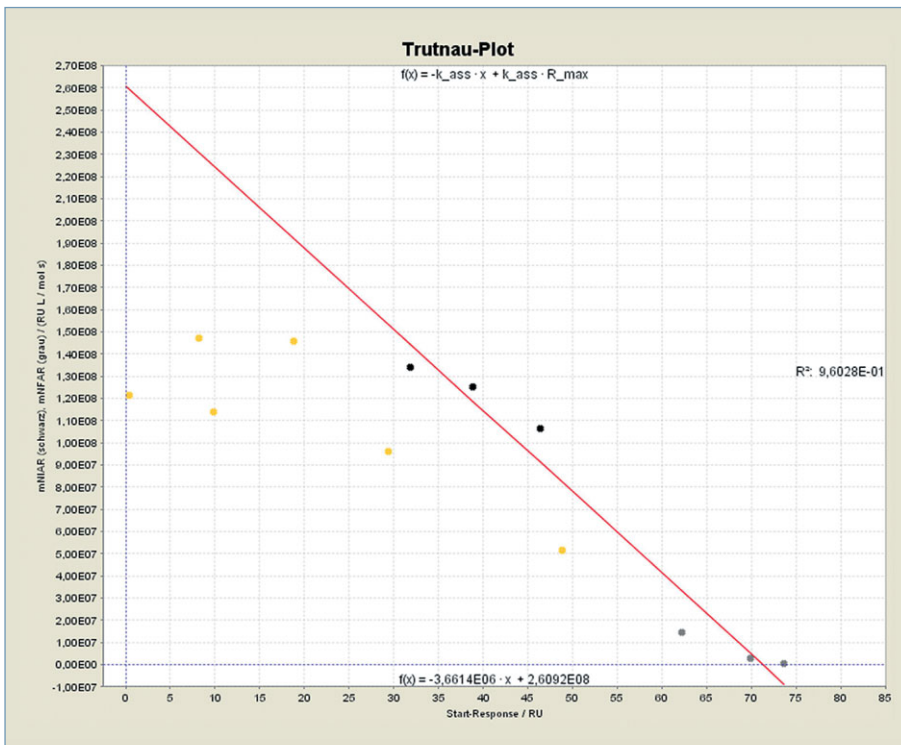
wobei die eigentlichen Interaktionen nur ca. 40 min benötigten. Das aufgenommene Affinogramm wurde mit der MSK-Software ausgewertet. Die kreuzüberprüften Kinetik-Ergebnisse der sechs Grafiken können hier aus Platzgründen nur für den wichtigsten Plot bezüglich k_{ass} näher erläutert werden.

Der neu entwickelte (auf Empfehlung früher MSK-Anwender so genannte) Trutnau-Plot liefert erstmals k_{ass} und R_{max} (die maximale Sensor-Bindungskapazität) individuell aus einer Grafik. Diese zeigt zudem sehr sensitiv Massentransport-Limitationen (MTL) an – einen unerwünschten Effekt in der Biosensorik, der z. B. bei hohem k_{ass} und/oder niedriger Analytkonzentration auftreten kann und zu abgeflachten Assoziationskurven führt, was die Kinetik-Ergebnisse verfälscht. Solche MTL-bedingten Effekte sind in Kurvenfits und anderen Plots häufig verborgen, werden aber im Trutnau-Plot sichtbar und so eindeutig identifiziert. Hierzu werden die ermittelten Ratenänderungen an den Übergängen (blau in **Abb. 1**) der Teilkurven auf die dort jeweils erfolgte Analyt-Konzentrationsänderung normalisiert; daraus ergeben sich die molare Netto-initiale Assoziations-

rate (*mNIAR*) am Start einer Assoziationsphase und die molare Netto-finale Assoziationsrate (*mNFAR*) am Start einer Dissoziationsphase. Diese beiden Raten hängen ausschließlich von k_{ass} und $R_{\text{max}} - R_{\text{start}}$ (dem Anteil der noch freien Ligandmoleküle) ab und folgen daher der Geradengleichung:

$$\begin{aligned} mNIAR \text{ (oder } mNFAR) \\ = -k_{\text{ass}} \times R_{\text{start}} + k_{\text{ass}} \times R_{\text{max}} \end{aligned} \quad (2)$$

Ein Plot der Raten gegen R_{start} ergibt nach Regression k_{ass} als die (negative) Steigung der Geraden und R_{max} als x-Achsenabschnitt. Aus **Abbildung 2** wird ersichtlich, dass die ersten drei Assoziationsschritte aufgrund ihrer reduzierten Rate unter MTL verlaufen und einen zu kleinen k_{ass} -Wert ergeben. Diese Ausreißer können, weil sie Gleichung (2) nicht gehorchen, im MSK-Programm jedoch von der Auswertung ausgeschlossen werden, was ein weit besseres Ergebnis (**Abb. 3**) liefert. Insgesamt ergibt sich bezüglich k_{ass} eine gute Übereinstimmung des MSK-Ergebnisses ($k_{\text{ass}} = 3,7 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mit dem SEQ-Lauf ($k_{\text{ass}} = 1,5 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[1,3] unter der Maßgabe, dass hier die aktuelle MSK-Software



▲ **Abb. 3:** Trutnau-Plot (wie in **Abb. 2** beschrieben) mit weit besserer Regression nach Ausschluss der Schritte mit MTL-reduzierten Raten (gelb).

(Version 1.2) mit optimierten Fitbereichen eingesetzt wurde. Mit $k_{diss} = 6,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ergibt sich $K_D = 1,8 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ gemäß Gleichung (1).

Zusammenfassung

Im Vergleich mit bisherigen Ansätzen eröffnet der MSK-Ansatz in Affinitäts-Biosensorik

erhebliche Zeit- und Material-Ersparnisse bei vergleichbaren, aber transparenteren Ergebnissen. Zudem erlaubt die MSK-Software eine unlimitierte Anzahl von unterschiedlich langen Konzentrationswechseln (und einen individuellen Ausschluss von der Auswertung). Unter www.kinomics.com ist eine Testlizenz erhältlich. ■

Literatur

[1] Trutnau, H.-H. (2006): New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *J. Biotechnol.* 124: 191–195.
 [2] Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E., Myszk, D. G. (2006): Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal. Biochem.* 349: 136–147.
 [3] Zimmermann, B., Chiorini, J. A., Ma, Y., Kotin, R. M., Herberg, F. W. (1999): PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J. Biol. Chem.* 274: 5370–5378.

Korrespondenzadressen:



Hans-H. Trutnau¹
 Kinomics GmbH
 Eberbacher Straße 102
 D-65346 Eltville
 Tel.: 06123-795280
 info@kinomics.com
 www.kinomics.com



Stephan Drewianka²
 Bastian Zimmermann³
 Biaffin GmbH & Co KG
 Heinrich-Plett-Straße 40
 D-34132 Kassel
 Tel.: 0561-804 4661
 Fax: 0561-804 4665
 info@biaffin.de
 www.biaffin.de

