

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Neue Ansätze zur Aufnahme und Auswertung von Biosensor-Signalen

Hans-H. Trutnau

Bertelestr. 77, D-81479 München

Tel. 089-79199317

Hans-H.Trutnau@t-online.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 190

Poster

Dieser Vortrag beschäftigt sich im engeren Sinne mit neuen Methodologien der Daten-Aufnahme und –Auswertung in der Affinitäts-Biosensorik (ABS). Diese Sensoren, kommerziell zumeist mit optischer *solid-phase* Messtechnik, haben sich in den letzten zehn Jahren als sehr wirksame Werkzeuge in der biomolekularen Interaktionsanalytik (BIA) etabliert, sei es zum qualitativen Bindungsnachweis, zur Kinetikberechnung eines Bindungsgleichgewichtes oder zur Analyt-Konzentrationsbestimmung. In vielen Fällen sind diese Systeme nicht als Konkurrenz, sondern als Ergänzung zu traditionellen Tests zu sehen. Als verbreitetste Anbieter sind Biacore mit Fluss-Systemen und Affinity Sensors mit Küvetten-Systemen zu nennen.

Trotz der unbestreitbaren Vorteile der ABS (z.B. lautfreie Echtzeit-Aufnahmen) sind bestimmte Limitationen bisher jedoch nicht überwunden worden. Als wesentliche Auswertungsgrundlage ist z.B. lange die Konzentrationskonstanz des gelösten Analyten an der Sensoroberfläche vorausgesetzt worden, verbunden mit der Annahme, dass die sequentiell aufgenommenen Assoziationskurven (d.h. die Bildungsraten des Komplexes aus Ligand und Analyt) einer relativ einfachen Mathematik so genannter pseudo-1. Ordnung folgen. Dies ist mehrfach für die o.g. Anbieter in Frage gestellt worden (vgl. z.B. ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾).

So zeigen einerseits Fluss-Systeme besonders zu Beginn der Assoziationsphasen statt der erwarteten Kurvatur häufig mehr oder weniger linear geprägte Bereiche (⁽⁴⁾ mit extremen Beispielen), die nicht nur von der Affinität der beteiligten Bindungspartner, sondern auch von der Flussrate und der Liganden-Immobilisierungsdichte abhängen; insgesamt sind mit diesen Faktoren weit mehr als fünf Gründe für die Abweichungen von dem Idealverhalten ausgemacht worden (⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾). Es sind hier von Anbieterseite erfolgversprechende Strategien vorgeschlagen worden. Zum gegenwärtigen Stand bedarf es jedoch noch weiterer Tests, ob die hier vorgestellten Ansätze z.B. auf Mess-Systeme mit extremen Massentransportlimitationen anwendbar sind.

Andererseits können in Küvetten-Systemen durch Analytverarmung im Überstand Abweichungen von der erwarteten Idealform beobachtet werden, die offenbar früher (und gemäß Massenwirkungsgesetz) zu einer geringeren Komplex-Gleichgewichtskonzentration führen. Da entsprechende Assoziationen ganz offensichtlich unter Variation beider Anfangskonzentrationen verlaufen, folgen sie gemeinhin einer Kinetik 2. Ordnung. Als Ausweg wird hier ein entsprechender Fit nach 2. Ordnung angeboten. Jedoch führt die Integration einer quadratischen Gleichung⁽⁷⁾ zu einem Ergebnis, das in Praxis schwer handzuhaben ist. Gleichwohl bieten diese offenen Systeme den Vorteil sehr sparsamer Proben-Titrations. Alle Titrations-Applikationen sind jedoch mit einem Stigma behaftet: Jede Stufe muss bis ins Gleichgewicht aufgenommen werden, die Gleichgewichtskonstante K_D ist erhältlich, Kinetik ist unmöglich (ausdrücklich, z.B. für die Assoziationsphasen⁽⁸⁾).

Es stellt sich die Frage: Lässt sich der Vorteil der Titrations mit einer einfachen Auswertung kombinieren? Zunächst: Lassen sich Einschnitt-Experimente alternativ kinetisch auswerten? Und: Lassen sich Titrations kinetisch auswerten? Die Antwort lautet: Ja.

Der verblüffend einfache Ansatz verläuft nach dem Schema, dass verschiedene Fits der Kurven zu den initialen Raten führen – sei es die der Assoziation oder Dissoziation. Die initiale Assoziationsrate, z.B., enthält *intrinsisch und unverfälscht* die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{ass} gemäß der Beziehung (R_{max} = Sensorsättigungssignal; $c_0(A)$ = Analytstartkonzentration):

$$(dR_{ass}/dt)_{t=0} = k_{ass} \cdot R_{max} \cdot c_0(A)$$

Die Gültigkeit dieses Ansatzes für Einschnitt-Zyklen kann ebenfalls für Assoziationen gezeigt werden, die in Mehrschritt-Kinetiken (Titrations) unter Analytverarmung verlaufen; desgleichen für Mehrschritt-Kinetiken, deren Einzelschritte nicht äquilibriert sind. Von dort ist es zu 'up-and-down' Titrations, schrittweisen Dissoziationen, den Verhältnissen in idealen Fluss-Systemen und zu Kreuzüberprüfungen nur noch ein kleiner Schritt.

Das Resultat: Erheblich schnellere, abgesicherte Kinetik-Messungen ohne Zwischenregenerationen.

Literatur

-
- ⁽¹⁾ Hall, D. R. et al. (1996) *Anal. Biochem.*, **235**, 175-184
 - ⁽²⁾ Hall, D. R. and Winzor, D. J. (1997) *Anal Biochem.*, **244**, 152-160
 - ⁽³⁾ Hall, D R. et al. (1997) *Anal Biochem.*, **253**, 145-155
 - ⁽⁴⁾ Sebald, W. et al. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **240**, 252-261
 - ⁽⁵⁾ O'Shannessy, D. J. (1994) *Current opinions in Biotechnology*, **5**, 65-71
 - ⁽⁶⁾ O'Shannessy, D. J. and Winzor, D. J. (1996) *Anal. Biochem.*, **236**, 275-283
 - ⁽⁷⁾ Edwards, P. et al. (1998) *Anal Biochem.*, **263**, 1-12
 - ⁽⁸⁾ Schuck, P. et al. (1998) *Anal Biochem.*, **265**, 79-91