

# Analyse von Biomolekülen mit aktiv bewegten Nano-Oberflächen

Jens Niemax, Ralf Strasser, Paul Hampel, Ulrich Rant,  
Walter Schottky-Institut, Technische Universität München

Das ideale Messgerät für die Proteinanalytik sollte verschiedene Eigenschaften vereinen. Es sollte mit hoher Genauigkeit die Bindungsparameter möglichst vieler Proteine parallel bestimmen können und zudem Aussagen darüber machen, in welcher Form die Proteine während der Bindung vorliegen. Gängige Biosensoren vermögen zwar Bindungsereignisse auf Oberflächen zu detektieren, sie lassen aber kaum Rückschlüsse auf die Gestalt der Bindungspartner zu – ein entscheidender Nachteil in der Welt der Proteine, in der gilt: die Form bestimmt die Funktion. switchSENSE ist eine neuartige Messmethode für die Analyse molekularer Wechselwirkungen, die auf elektrisch schaltbaren DNA-Oberflächen beruht. Mit ihr können Proteine und andere Moleküle nicht nur mit bisher unerreichter Sensitivität nachgewiesen, sondern gleichzeitig auf einem Chip bezüglich ihrer Größe beziehungsweise Form analysiert werden – und zwar in Echtzeit, lautfrei und parallel.

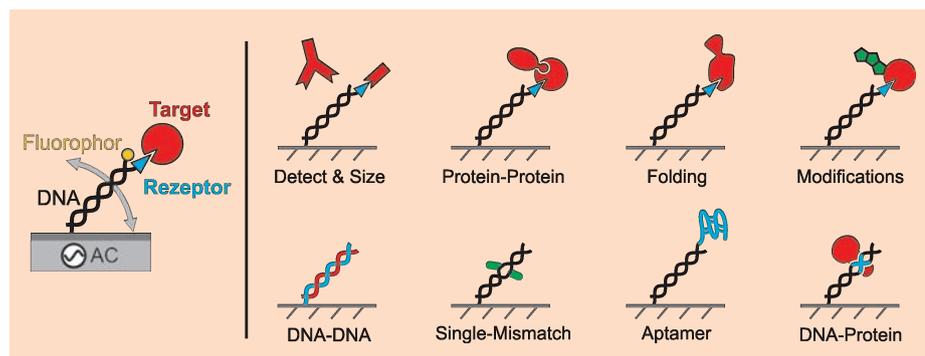


Abb. 1: Prinzip der switchSENSE-Methode (links) und Anwendungsmöglichkeiten, die sich vor allem aus der Molekuldynamikmessung der Schaltbewegung ergeben

Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bestimmen die Lebensfähigkeit eines jeden Organismus und bilden daher das zentrale Thema der modernen Life Sciences. Proteine stellen die komplexeste, aber auch vielseitigste Gruppe der Biomoleküle dar. In dem Bestreben, das Zusammenspiel vieler Proteine miteinander und mit anderen Molekülen zum Beispiel bei der Entwicklung von medizinischen Wirkstoffen zu verstehen, gilt es, so viele Parameter der Wechselwirkungen wie möglich gleichzeitig zu charakterisieren. Elementare Fragen dabei sind: Wie stark binden zwei Partner (Affinität), und wie schnell binden sie an und dissoziieren sie (Reaktionskinetik)? Geläufige Sensoren basieren auf passiven Oberflächen und ermitteln diese Information aus Änderungen makroskopischer Eigenschaften der Grenzflächen: bei Surface Plasmon Resonance-Sensoren (SPR, z. B. Biacore™) besteht das Messsignal aus einer Änderung des effektiven optischen Brechungsindex der Grenzfläche, bei Quartz Crystal Microbalances

(QCM) ist es eine mittlere Massenablagerung auf der Sensorfläche.

Bei der switchSENSE-Methode wird im Gegensatz dazu erstmals eine aktive Biogrenzfläche eingesetzt, an der Moleküle sehr schnell einige Nanometer weit hin- und herbewegt werden. Als Aktuatoren werden kurze synthetische DNA-Stränge genutzt, die auf einer Seite an Elektroden gebunden, und auf der anderen Seite mit Rezeptoren für die zu analysierenden Zielmoleküle (Targets) versehen sind (siehe Abb. 1). Die von Natur aus negativ geladene DNA wird durch geringe elektrische Wechselspannungen alternierend von der Oberfläche abgestoßen und wieder angezogen – dadurch wird ihre Konformation bzw. Orientierung elektrisch geschaltet. Die Oszillation der DNA-Stränge kann in Echtzeit verfolgt werden, weil sie an ihrem oberen Ende mit Farbstoffmolekülen (Fluorophoren) versehen sind: Stehen die DNA-Stränge auf der Oberfläche, dann fluoreszieren die Farbstoffmoleküle. Werden die DNA-Stränge aber durch eine positive

Spannung an die Oberfläche gezogen, dann bleibt der Farbstoff infolge einer effizienten Energieübertragung in die Metallelektrode dunkel (Quenching). Aus der Intensität der Fluoreszenz lässt sich somit auf die aktuelle Konformation der DNA-Schicht schließen.

## DNA als „Nanoschaukel“ für Proteine

Das elektrisch induzierte DNA-Schalten dient als universeller Messparameter für die Sensorik: ganz allgemein kann jeder Vorgang, der eine Veränderung im Schaltverhalten (Amplitude und/oder Dynamik) hervorruft, erfasst werden. Dies eröffnet völlig neue Möglichkeiten zur Analyse von Molekülen auf einem Chip, die weit über die reine Detektion eines Targets (Ja/Nein-Antwort) hinausgehen. Abbildung 1 zeigt schematisch einige Beispiele, die Protein-Rezeptor- (z. B. Antikörper-Antigen), Protein-Protein-, Protein-DNA-, DNA-DNA/RNA/PNA-Wechselwirkungen, aber ebenso Umfaltungen oder Modifikationen (Stichwort: posttranslationale Modifikationen) von Proteinen umfassen.

Besondere Bedeutung kommt hier der Dynamik der Schaltbewegung zu, aus der die Größe eines eingefangenen Targets bzw. Veränderungen in dessen äußerer Gestalt bestimmt werden können. Die Geschwindigkeit der Schaltbewegung kann aus einer frequenz aufgelösten Messung bestimmt werden, wie sie in Abbildung 2 für eine DNA-Schicht vor und nach Anbinden eines IgG-Antikörpers gezeigt ist. Während bei niedrigen Frequenzen die DNA dem angelegten elektrischen Wechselfeld noch mit maximaler Schaltamplitude folgen kann, nimmt die Modulation in einem bestimmten Frequenzbereich ab und kommt schließlich bei hohen Frequenzen vollständig zum Erliegen. Interessant dabei ist der Frequenzbereich in dem die Modulation abnimmt – er spiegelt die intrinsischen Zeitkonstanten der Schaltbewegung wider. Bindet nun ein Target an die DNA, verlangsamt sich die Schaltbewegung, und die Frequenzkurve schiebt nach links. In erster Näherung kann das Abfallen der Frequenzkurve durch eine Grenzfrequenz beschrieben werden; genauere Information liefert ein stochastisches Modell, in das die hydrodynamischen Eigenschaften der DNA und des Targets eingehen. Bemerkenswert ist, dass Massenträgheit in diesem stark gedämpften System keine Rolle spielt – es sind vielmehr die hydrodynamischen Reibungswiderstände und Ladungseffekte, die die Dynamik bestimmen. Für die Anwendung bedeutet dies, dass verschiedene Targets nach ihrem effektiven hydrodynamischen Durchmesser  $D_H$  unterschieden werden können, aber auch, dass man äußere Einflüsse, die  $D_H$  ändern (z. B. enzymatische Reaktionen), verfolgen kann. Dabei liegen die derzeit erreichten

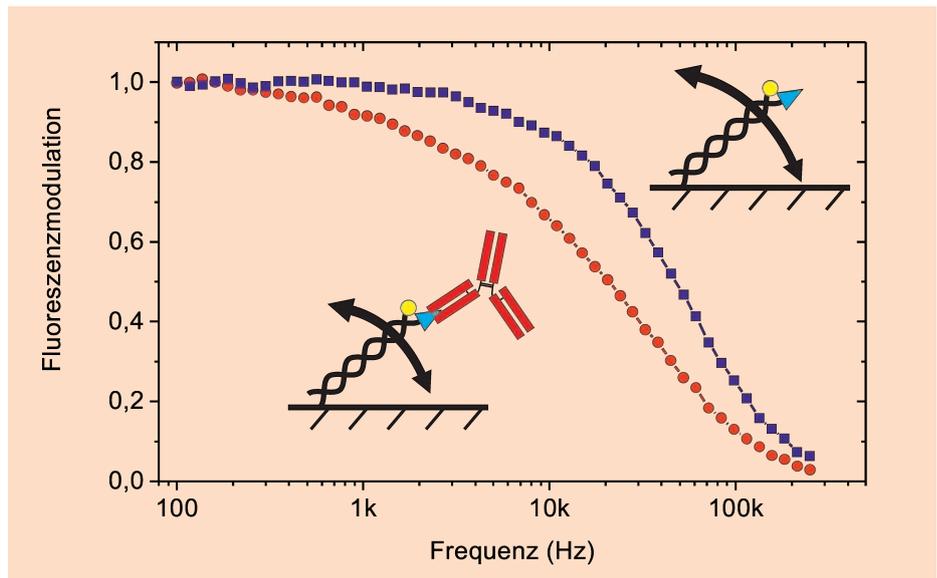
Größenaufösungen im Bereich zwischen 0,1 und 1 nm. In Massen ausgedrückt, werden bei großen Molekülen wie IgG-Antikörpern (150 kDa Masse) Frequenzverschiebungen von nahezu 100 kHz bei einer Frequenzauflösung von unter 1 kHz gemessen; selbst bei kleinen Proteinen wie Cytochrom C (12 kDa) sind es immer noch 10 kHz.

Während die Molekulardynamikmessung ‚on-chip‘ ein absolutes Novum für Oberflächen-Biosensoren darstellt, lässt sich die switchSENSE-Methode aber genauso für die Bestimmung von ‚klassischen‘ Bindungsparametern der Reaktionskinetik (Ratenkonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$ ) und Affinität (Dissoziationskonstante  $K_D$ ) einsetzen. Die dabei erreichten Detektionslimits übertreffen sogar marktübliche labelfreie Techniken deutlich. Bei Antikörperfragmenten beispielsweise reichen weniger als zehntausend angebundene Moleküle pro Spot, um eine Sensorantwort auszulösen, bei SPR-Systemen sind im Vergleich dazu mehr als tausendmal so viele notwendig. Bindungspartner mit starker Affinität können im femtomolaren Konzentrationsbereich detektiert werden, wie für das Biotin/Streptavidin-System gezeigt wurde.

Die Quantifizierung der Bindungskinetik beziehungsweise der Affinität kann je nach Bedarf bei niedrigen Frequenzen aus Veränderungen der Fluoreszenz (-Schaltamplitude) sowie bei hohen Frequenzen aus Veränderungen der Schaltdynamik ermittelt werden. Dabei sind Echtzeit-Experimente sowie Titrations (schrittweise Änderungen der Targetkonzentration) möglich, wie in Abbildung 3 am Beispiel der Affinitätsbestimmung einer Antikörperbindung mit einem  $K_D$ -Wert im 300 pM-Bereich gezeigt wird.

### Universell einsetzbare Plattformtechnologie

Indem jeweils geeignete Proteinrezeptoren an die DNA konjugiert werden, ist die switchSENSE-Technik universell auf verschiedenste biochemische Fragestellungen adaptierbar. Das Spektrum an verwendbaren Proteinrezeptoren reicht von kleinen Molekülen wie Biotin oder stark bindenden NTA-Derivaten bis zu Antikörpern (und Antikörperfragmenten), die über Standard-Kopplungsverfahren am oberen Ende der DNA angebracht werden. Natürlich kann auch die DNA selbst als Rezeptor fungieren, zum Beispiel bei der Untersuchung von DNA-bindenden Proteinen (wie etwa Transkriptionsfaktoren) oder bei Targets die selbst Nukleinsäuren sind (DNA, RNA, PNA). Die DNA-Rezeptor-Konjugate werden individuell auf verschiedenen Mikroelektroden eines Chips gebunden, wo zuvor einzelsträngige DNA in einem speziellen Verfahren mit niedriger Oberflächendichte verankert wurde. Durch diesen modularen Aufbau der aktiven Sensor-Grenzfläche wird einerseits eine einfache chemische Adressierbarkeit der Elektroden



**Abb. 2:** Frequenzanalyse der Schaltdynamik vor (blaue Quadrate) und nach (rote Kreise) Binden eines IgG-Antikörpers an einen Proteinrezeptor (hier: Biotin) am oberen Ende der DNA

(Multiplexing über DNA-DNA Hybridisierung) gewährleistet, andererseits eine ausgezeichnete Regenerierbarkeit des Chips ermöglicht. Benutzte Elektroden können mühelos durch einfache automatisierte Waschschriffe von ihren ‚gebrauchten‘ Proteinrezeptoren befreit und mit frischen belegt werden. Mit so hergestellten schaltbaren Schichten können auch Messungen in problematischen Medien wie hochviskosen Flüssigkeiten, Seren, Zelllysaten, Asziten, etc. durchgeführt werden.

Nicht zuletzt durch ihren potentiell hohen Parallelisierungsgrad (Einsatz als Microarray, derzeit mit 24 Mikroelektroden) ist die switchSENSE-Technologie ein leistungsfähiges Werkzeug für eine große Anzahl an Forschungsanwendungen. Mit der Molekulardynamikanalyse werden bisher nicht zugängliche Informationen zu den untersuchten Targets bereitgestellt und damit das Anwendungsspektrum von Oberflächenbiosensoren deutlich erweitert. Insbesondere eignet sich die Technik zur Beantwortung von Fragestel-

lungen, bei denen Informationen über die Gestalt der Bindungspartner benötigt werden. Dies ist zum Beispiel bei der Entwicklung therapeutischer Antikörper<sup>3</sup> (Antibody Engineering) der Fall, wo versucht wird durch Modifikationen deren Wirksamkeit zu erhöhen. Da diese Modifikationen in vielen Fällen sowohl mit einer Änderung der Bindungsaffinität als auch mit einer Änderung der Größe einhergehen, stellt die switchSENSE-Methode ein besonders geeignetes Werkzeug für ihre Analyse dar.

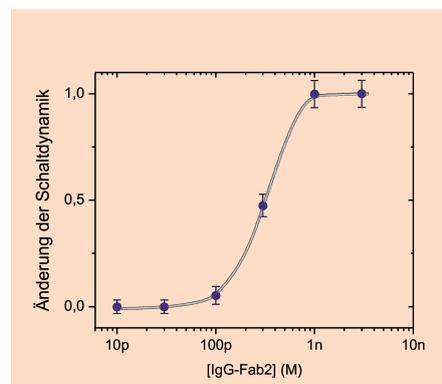
Die switchSENSE Technik wird derzeit für akademische und industrielle Kooperationen zur Verfügung gestellt, ihre Kommerzialisierung ist in Vorbereitung. Das Messgerät und der Chip werden auf der diesjährigen Biotechnica in Hannover (5-7. Oktober, Halle 9, Stand F42) vorgestellt.

### Literatur

- [1] U. Rant, E. Pringsheim, W. Kaiser, K. Arinaga, J. Knezevic, M. Tornow, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, Detection and Size Analysis of Proteins with Switchable DNA Layers, Nano Letters (2009) (4): 1290–1295
- [2] U. Rant, K. Arinaga, S. Scherer, E. Pringsheim, S. Fujita, N. Yokoyama, M. Tornow, and G. Abstreiter, Switchable DNA interfaces for the highly sensitive detection of label-free DNA targets, Proc. Nat. Acad. Sci. Am. 104, No 44, 17364–17369 (2007)
- [3] P.J. Carter, Nat Rev Immunol. (2006) 6(5): 343-57

### Korrespondenzadresse

Dr. Ulrich Rant  
Dynamic Biosensors  
c/o Walter-Schottky-Institut, TU München  
Am Coulombwall 3  
85748 Garching  
rant@dynamic-biosensors.com  
www.dynamic-biosensors.com



**Abb. 3:** Titrationskurve eines Antikörperfragmentes zur Bestimmung der Dissoziationskonstante