

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Etablierung von Immobilisierungsmethoden zur SPR-
gestützten Interaktionsanalyse der bakteriellen
Resistenzproteine AcrA und TolC**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Waldemar Schäfer
Matrikelnummer 2097454

Hamburg-Bergedorf

am 26. Aug. 2015

Gutachter:
Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich
Dr. Bernhard Ellinger

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME ScreeningPort

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Surface Plasmon Resonance (SPR)	1
1.1.1 Der Effekt und seine Anwendung	1
1.1.2 MASS1 – Das Messinstrument.....	3
1.2 Immobilisierungsschemie.....	5
1.2.1 Sensorchemie.....	5
1.2.2 Aminokopplung	6
1.2.3 Thiolkopplung	7
1.2.4 Weitere Sensoren und Immobilisierungsmethoden	8
1.3 Bindungskinetik und kinetische Kurvenanpassung	9
1.4 Rolle von AcrA und TolC	12
1.5 Ziel der Arbeit.....	13
2 Methoden und Tests	14
2.1 Aminokopplung	15
2.1.1 Immobilisierung.....	16
2.2 Thiolkopplung.....	18
2.2.1 Immobilisierung.....	18
2.3 Molekülinteraktion - groß mit groß.....	21
2.4 Molekülinteraktion - groß mit klein.....	22

2.4.1	Sulfanilamid auf immobilisierten CAII	23
2.4.2	Indometacin auf immobilisierten HSA	24
3	Ergebnisse und Diskussion.....	25
3.1	Aminokopplung	25
3.1.1	Immobilisierung von BSA und HSA	25
3.1.2	Immobilisierung von CAII.....	28
3.2	Thiolkopplung.....	31
3.2.1	Immobilisierung von CAII.....	31
3.2.2	Immobilisierung von HSA	32
3.3	Molekülinteraktion - groß mit groß.....	35
3.4	Molekülinteraktion - groß mit klein.....	40
3.5	Immobilisierung von AcrA.....	43
	Literaturverzeichnis	49
	Anhang.....	I
	In ControlR2 erstellte Methoden	I
	Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	III
	Abbildungen	V

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
Arg	L-Arginin
Asn	L-Asparagin
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	California
CAII	Carbonic Anhydrase II
Ch.	Chanel
Corp.	Corporation
Cys	Cystein
DDM	n-Dodecyl β-D-maltosid
DE	Deutschland
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Gln	L-Glutamin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkten Haftung
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	Histidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
Inj.	Injection
IME-SP	Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, ScreeningPort
Inc.	Incorporated
kDa	Kilodalton
KG	Kommanditgesellschaft

Kin.	kinetisch
LKL	Lösungsmittelkorrekturlösung
LLC	Limited Liability Company
Lys	L-Lysin
MA	Massachusetts
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOE	Molecular Operating Environment
NY	New York
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OH	Ohio
PBS	phosphate buffered saline
PDEA	2-(2-pyridinyldithio)ethanamin
PDB	Protein Data Bank
RT	Raumtemperatur
RU	Resonance Units
SAM	Self Assembling Monolayer
SPR	Surface Plasmon Resonance
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TPP	Techno Plastic Products
USA	United States of America
VH	Vernon Hills
WI	Wisconsin
HO	Houston

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung des Totvolumens einer Injektion	15
Tabelle 2: Lösungen für die Aminokopplung	16
Tabelle 3: Lösungen für die Thiolkopplung.....	18
Tabelle 4: Lösungen für die Sulfanilamiduntersuchung auf CAII	23
Tabelle 5: Verdünnungsreihen für Sulfanilamid und LKL für den Bindungstest auf Immobilisierten CAII	23
Tabelle 6: Verdünnungsreihen für Indometacin und LKL für den Bindungstest auf Immobilisierten HSA	24
Tabelle 7: Methode zur Konditionierung der Sensoroberfläche vor der Immobilisierung	I
Tabelle 8: Methode zur Immobilisierung der Liganden über Aminokopplung	I
Tabelle 9: Methode zur Immobilisierung der Liganden über Thiolkopplung	I
Tabelle 10: Methode zum Testen von Acetacolamid und Sulfanilamid auf immobilisierten CAII	II
Tabelle 11: Methode zum Testen von Indomethacin auf immobilisierten HSA.....	II
Tabelle 12: Reagenzien, Chemikalien und Kits	III
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien.....	IV
Tabelle 14: Geräte.....	IV
Tabelle 15: Software	IV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Aufbau der Sensoren.....	2
Abbildung 2: High Capacity Amin Sensor für Aminokopplung des MASS1	4
Abbildung 3: Zyklusbedingte Zunahme der Masse auf dem Sensor bei direkter Immobilisierung	5
Abbildung 4: Querschnitt eines Sensors	6
Abbildung 5: Immobilisierungsschemie der Aminokopplung	7
Abbildung 6: Bildung der transenvelope multidrug efflux Pumpe	12
Abbildung 7: Allgemeines Layout der 96-Well Platte für Immobilisierung mit Aminokopplung.....	17
Abbildung 8: Allgemeines Layout der 96-Well Platte für Immobilisierung mit Thiolkopplung.....	21
Abbildung 9: Layout der 96-Well Platte für den Antikörpertest auf Immobilisierten HSA.....	22
Abbildung 10: Immobilisierung von BSA und HSA	25
Abbildung 11: Immobilisierungsverlauf der ersten Immobilisierung von BSA.....	26
Abbildung 12: Immobilisierung von HSA	27
Abbildung 13: Immobilisierung von CAII.....	28
Abbildung 14: Verlauf der Immobilisierung von CAII	29
Abbildung 15: Beladung der jeweiligen Kanäle nach der Immobilisierung von CAII mit Thiolkopplung.....	31
Abbildung 16: CAII Struktur mit hervorgehobenen Cystein	32
Abbildung 17: Beladung der jeweiligen Kanäle nach der Immobilisierung von HSA ..	32
Abbildung 18: Verlauf der Immobilisierung von HSA.....	33
Abbildung 19: HSA Struktur und Sequenz	34
Abbildung 20: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Bindungschemie: Aminokopplung	36
Abbildung 21: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Bindungschemie: Thiolkopplung	37
Abbildung 22: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Detailansicht; Bindungschemie: Aminokopplung.....	38

Abbildung 23: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Kin. Kurvenanpassung ohne Berücksichtigung der 4000 nM Kurve; Bindungschemie: Aminokopplung.....	39
Abbildung 24: Kin. Untersuchung der Bindung von Sulfanilamid auf CAII.....	40
Abbildung 25: Kin. Untersuchung der Bindung von Indometacin auf HSA	41
Abbildung 26: Kin. Untersuchung der Bindung von Indometacin auf HSA	42
Abbildung 27: Erste Immobilisierung von AcrA.....	43
Abbildung 28: Zweite Immobilisierung von AcrA	44
Abbildung 29: Verlauf der ersten Immobilisierung von AcrA	45
Abbildung 30: Verlauf der zweiten Immobilisierung von AcrA	45
Abbildung 31: Vergleich von zwei Sensoren nach der Immobilisierung von HSA und AcrA	46
Abbildung 32: Gesamtverlauf der Immobilisierung von HSA mit Aminokopplung.....	V
Abbildung 33: Gesamtverlauf der zweiten Immobilisierung von BSA	VI
Abbildung 34: Gesamtverlauf der Immobilisierung von CAII mit Aminokopplung	VII
Abbildung 35: Gesamtverlauf der Immobilisierung von CAII mit Thiolkopplung	VIII
Abbildung 36: Gesamtverlauf der Immobilisierung von HSA mit Thiolkopplung	IX
Abbildung 37: Gesamtverlauf der ersten Immobilisierung von AcrA.....	X
Abbildung 38: Gesamtverlauf der zweiten Immobilisierung von AcrA	XI
Abbildung 39: Visual Basic Script in Excel zum Sortieren der im AnalyserR2 aufbereiteten Daten.....	XII

Zusammenfassung

Im Rahmen einer Doktorarbeit am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME ScreeningPort, soll die Interaktion der bakteriellen Transportproteine AcrA und TolC untersucht werden. Zusammen mit AcrB bilden diese Proteine einen transmembranen, energieabhängigen Transporter für niedermolekulare Verbindungen bei gramnegativen Bakterien. Dadurch sind die Bakterien in der Lage die intrazelluläre Konzentration verschiedener Antibiotika zu verringern, was einen effizienten Resistenzmechanismus darstellt.

Am Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME ScreeningPort wurde ein Messgerät angeschafft, dass auf Basis der Plasmonenresonanzspektroskopie funktioniert. Mit seiner Hilfe soll im Rahmen dieser Doktorarbeit die Interaktion von AcrA und TolC mit möglichen Wirkstoffen, die die Interaktion beeinträchtigen, untersucht werden.

Damit die Arbeit an diesem Messgerät, MASS1, Reibungslos verlaufen kann, wurden im Rahmen diese Bachelorarbeit die zwei Immobilisierungsmethoden, Thiol- und Aminokopplung, mit BSA, HSA, CAII und AcrA erfolgreich getestet. Des Weiteren wurde die Interaktion von großen Molekülen unter einander und von großen Molekülen mit kleinen untersucht. Die gewonnen Daten wurden mit Literaturwerten verglichen. Im Fokus standen dabei die erzeugte Datenqualität und die kinetische Kurvenanpassung. Hierbei werden zwei Analyseprogramme, Prism von GraphPad und AnalyserR2 vom Gerätehersteller SierraSensors GmbH, mit einander verglichen.

1 Einleitung

1.1 Surface Plasmon Resonance (SPR)

1.1.1 *Der Effekt und seine Anwendung*

Reiner Metalle zeichnen sich durch delokalisierte Elektronen aus, die man sich wie ein See vorstellen kann. Eine Anregung der Oberfläche führt zu Wellen, die sich transversal ausbreiten. Da Elektronen negativ geladen sind und als Wellen relativ zu den positiv geladenen Atomkernen schwingen, lösen sie eine Schwankung der Ladungsträgerdichte aus. Die Quantifizierung des Schwingens der Elektronen an der Oberfläche wird als Oberflächenplasmon bezeichnet. Was bei Lichtwellen bspw. ein Photon ist, ist bei Metallen ein Plasmon.

Surface Plasmon Resonance (SPR), oder auch die Oberflächenplasmonenresonanz, ist ein physikalischer Effekt, der auftritt, wenn Licht aus einem Medium mit höherem Brechungsindex in ein Medium mit geringerem Brechungsindex trifft und aufgrund der Überschreitung des kritischen Winkels totalreflektiert wird. Dabei entsteht in der Metallschicht lokal ein starkes elektrisches Feld, das evaneszente Feld, das bis zu 300 nm durch das Metall hindurchgehen kann (Patching, 2014).

Wenn die Frequenz und die Wellenzahl der Photonen im evaneszenten Feld mit der Frequenz und der Wellenzahl der Plasmonen im Metall übereinstimmen, interagieren Photonen des evaneszenten Feldes mit den Plasmonen und es kommt zur Absorption des Lichts und damit zu einem Intensitätsverlust des reflektierten Strahls im Resonanzwinkel (Abbildung 1 A). In dem Messgerät wird ein Prisma verwendet um die Übereinstimmung der Frequenzen und Wellenzahlen zu erreichen. Zusätzlich wird monochromatisches und parallel zur Einfallsebene polarisiert Licht genutzt.

Die Lichtabsorption im Resonanzwinkel ist abhängig vom Brechungsindex, der seinerseits von der Schichtdicke der auf dem Metall gebundenen Substanzen und damit von der gebundenen Masse in der Nähe der Grenzfläche abhängt. Die Abhängigkeit äußert sich in der Verschiebung des Resonanzwinkels bei einer

Änderung der Masse auf der Metalloberfläche. Dieses Phänomen kann unter anderem für markerfreie Echtzeitmessungen von Bindungskinetiken genutzt werden (Kooyman, 2008).

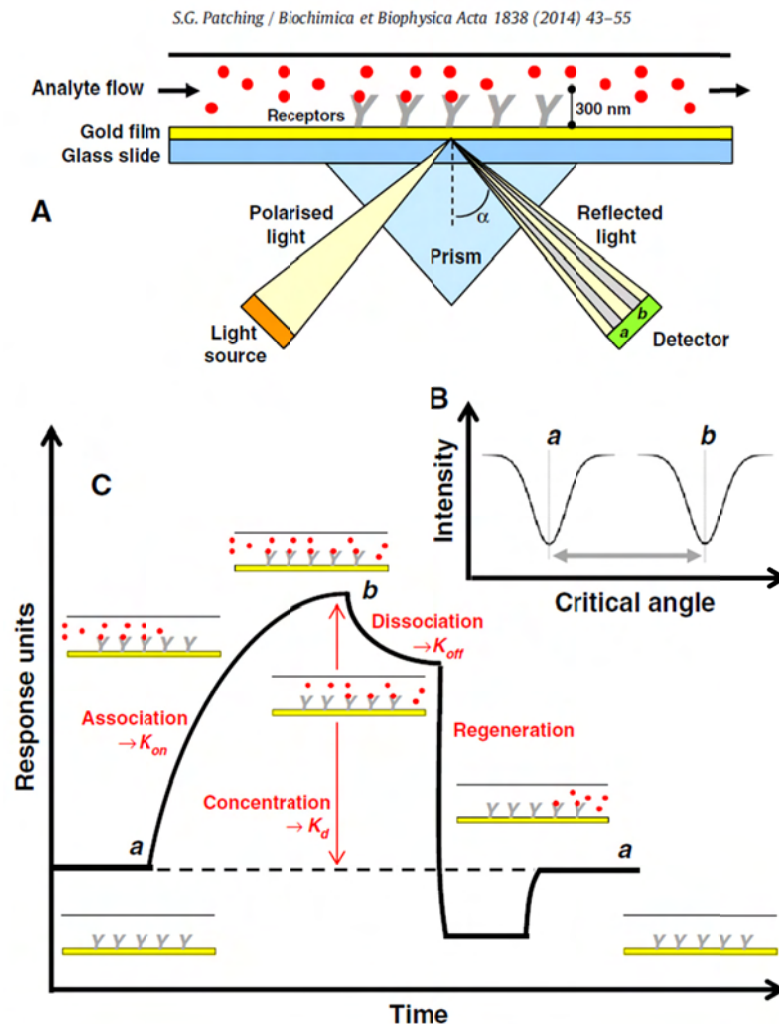


Abbildung 1: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Aufbau der Sensoren; Bild A: Prinzipieller Aufbau eines Sensors. Auf dem Goldfilm sind Moleküle immobilisiert und von einem Fluss von Analyten beschickt; Bild B: Abschwächung des reflektierten Lichts im Resonanzwinkel und die Verschiebung des Resonanzwinkels durch Erhöhung der Masse auf dem Sensor von *a* nach *b*; Bild C: Klassische Verlauf eines Diagramms bei der Messung von Antikörperbindung mit Assoziation und Dissoziation des Analyten und Regeneration der Sensoroberfläche (Kooyman, 2008).

Abbildung 1 zeigt das Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Licht, passiert das Medium 3 (Prisma) und das Medium 2 (Glas) und wird an der Grenzfläche zum Medium 1 (meistens Gold oder Silber) unter dem Grenzwinkel totalreflektiert. Das reflektierte Licht wird nach dem Austreten aus dem Prisma mithilfe eines Diodenarrays detektiert und in ein entsprechendes Signal übersetzt, das in der Abbildung 1 B zu sehen ist. Dabei ist die Intensitätsabschwächung im

Bereich a die im Resonanzwinkel stattfindende Absorption der Photonen im evaneszenten Feld durch die Plasmonen.

Auf der gegenüberliegenden Seite der Goldschicht befindet sich der Ligand, der über eine chemische Reaktion an der Oberfläche gebunden (immobilisiert) ist. Ein kontinuierlicher Strom eines Analyten über eine bestimmte Zeit wird auf den Liganden gegeben und das Signal mit der Zeit aufgezeichnet (Echtzeitmessung). Wenn auf der gegenüberliegenden Seite der Metallschicht die Masse des am Liganden bindenden Analyten mit der Zeit wächst, verändert sich der Brechungsindex und damit der Resonanzwinkel von a nach b (Abbildung 1 B). Die zeitliche Auflösung des Vorgangs ist in Abbildung 1 C im Bereich der Assoziation dargestellt. Es wird die Entwicklung der Resonanzeinheiten (RU) mit der Zeit aufgezeichnet. Dieser Schritt kann zum Ermitteln der Assoziationskonstanten k_a genutzt werden. Auf Biacore Messinstrumenten von GE Healthcare gilt für die gebundene Masse bspw. $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$.

Im darauffolgenden Schritt wird der Analytenpuffer ohne Analyten mit konstanter Flussrate auf die Oberfläche gegeben und die Dissoziation beginnt. Mit abnehmender Masse auf dem Sensor sinkt der RU-Wert und die Dissoziationskonstante k_d kann bestimmt werden.

Da einige Ligand-Analyt-Systeme sehr affin sind und die Elution des Analyten sehr lange dauern würde, wird die Regeneration der Oberfläche durch die Injektion einer weiteren Lösung, nach der Bestimmung von k_d , beschleunigt. Beispielsweise wird zur Regeneration von Liganden, die Antikörper gebunden haben, HCl verwendet. Ähnlich der Elution der gebundenen Stoffe von der Säule bei einer HPLC können abhängig vom Analyten auch Hochsalzlösungen oder auch Puffer mit organischen Lösungsmitteln verwendet werden.

1.1.2 MASS1 – Das Messinstrument

Das erste kommerziell vertriebene Instrument dieser Art wurde 1990 von Biosensors Pharmacia AB (später BIAcoreTM) auf den Markt gebracht. Heute existieren über 20 Firmen, die Messgeräte beruhend auf dem SPR-Effekt vertreiben, darunter SierraSensors GmbH, ansässig in Hamburg. Von ihrem Produkt, dem MASS1, wurden bisher weltweit über dreißig Exemplare verkauft.

Das Messinstrument besitzt ein 8-Kanal-System, was acht Messungen zur gleichen Zeit ermöglicht. Pro Kanal gibt es zwei Messstellen, die sogenannten Spots (Abbildung 2).

Das System erlaubt es entweder die Spots A oder die Spots B oder auch Spots A und B aller Kanäle gleichzeitig zu adressieren und die entsprechenden Proben auf die gewünschten Spots zu geben. Beispielsweise werden während der Immobilisierung eines Proteins alle Spots gleichbehandelt, allerdings wird die Proteinlösung, nach der Aktivierung der Oberfläche, nur über die Spots B injiziert. Dies führt zur Immobilisierung des Liganden auf den Spots B und zu einer dauerhaften Änderung der Brechungsindizes um und auf den Spots B. Die Abbildung 2 zeigt einen deutlich helleren Bereich um die Spots B nach der Immobilisierung. Bei der Analyse dienen die Signale von A als Hintergrund und werden von Signalen der Spots B abgezogen.

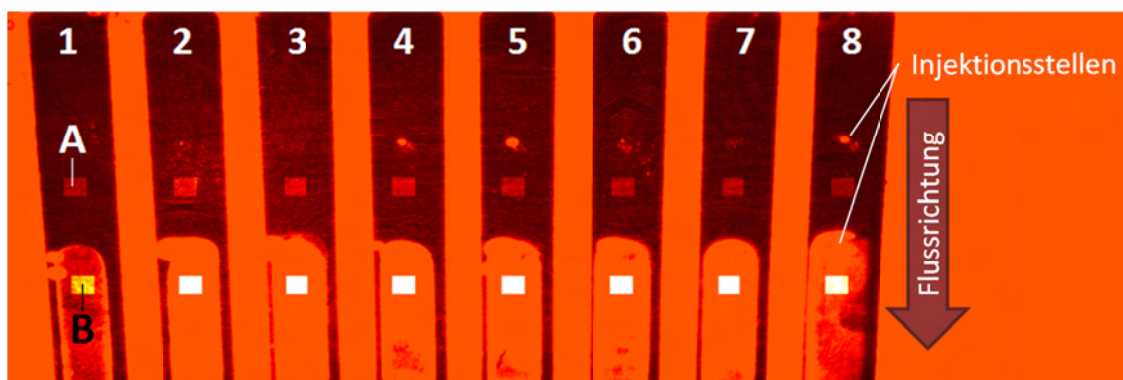


Abbildung 2: High Capacity Amin Sensor für Aminokopplung des MASS1; 8-Kanal-System mit Kanal 1 bis 8 und Spots A und B; Auf dem Spot B und auf dem umliegenden Bereich ist BSA über Aminokopplung immobilisiert (hellrote Felder); Über die Injektionsstellen werden die Proben auf die Messstellen gegeben.

Eine individuelle Adressierung der Kanäle und der Spots ist nicht möglich.

Die Analyten werden während eines Versuchs in der Regel über beide Spots der Kanäle gegeben, wobei die RU für alle Kanäle und alle Spots in Echtzeit gemessen und anschließend gespeichert werden. Nach weiteren Bereinigungen der Daten entsteht im Idealfall das typische nach der Zeit aufgelöste Diagramm der RU (Abbildung 1 C).

Ohne Erweiterungen, so wie das Gerät geliefert wurde, kann es mit zwei 96-Well Platten während einer Methode operieren. Erweiterungen, wie ein Roboter, der Platten während einer Methode auswechselt aber auch ein spezieller Nadelsatz, der die Arbeit mit 384-Well Platten ermöglicht, können erworben werden.

1.2 Immobilisierungschemie

1.2.1 Sensorchemie

Auf den Metallschichten der Sensoren werden (meistens vom Hersteller) Abstandhalter immobilisiert, die die Liganden binden. Oft handelt es sich dabei um Thiol gebundene Alkylderivate mit einer C-Länge von über zehn Atomen wie z.B. 16-hydroxy-hexadecan-1-thiol (Nuzzo & Allara, 1983) (Kausaite et al., 2007). Während die Thiolgruppe des Moleküls eine Verbindung mit dem Edelmetall eingeht, dient die Carboxylseite für weitere Modifikationen. Das Binden der Alkylderivate auf dem Edelmetall resultiert in der Bildung selbstorganisierende Monoschichten (SAMs).

Die Immobilisierung der Liganden auf dem Sensor wird aus zwei Gründen nicht direkt auf der Metallschicht durchgeführt. Zum einen können Liganden durch den Kontakt mit Metallen bis zu 90% ihrer Aktivität verlieren. Zum anderen binden die Liganden, aber auch die Analyten, teilweise irreversibel sodass eine vollständige Regeneration der Oberfläche, vor der nächsten Injektion des Analyten, unmöglich wird.

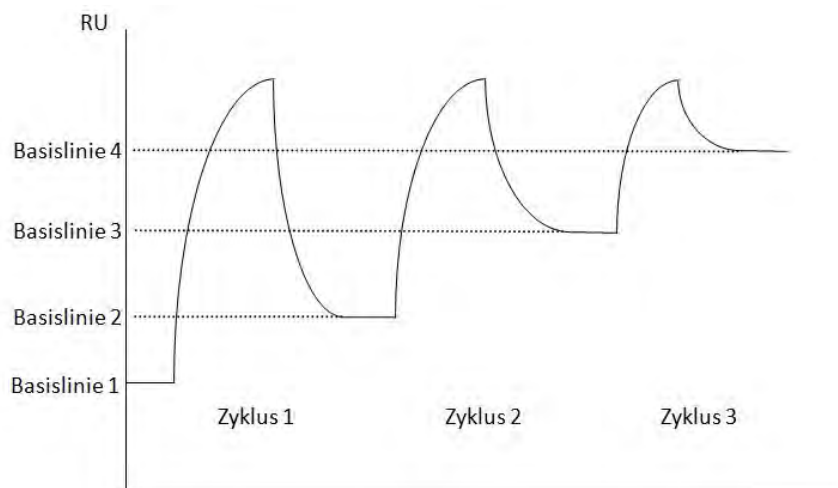


Abbildung 3: Zyklusbedingte Zunahme der Masse auf dem Sensor bei direkter Immobilisierung des Liganden auf der Metallschicht. Aufgrund irreversibler Bindung der injizierten Liganden verändert sich die Basislinie.

Die ursprüngliche Basislinie wird in diesem Fall nicht erreicht (Gedig, 2008). Es kommt zur Immobilisierung des Analyten auf dem Sensor, wodurch die Basislinie nach der Regeneration von Zyklus zu Zyklus wächst (Abbildung 3). Nach der Sättigung des

Sensors mit Analyten sind keine weiteren Zyklen mehr möglich und der Sensor unbrauchbar.

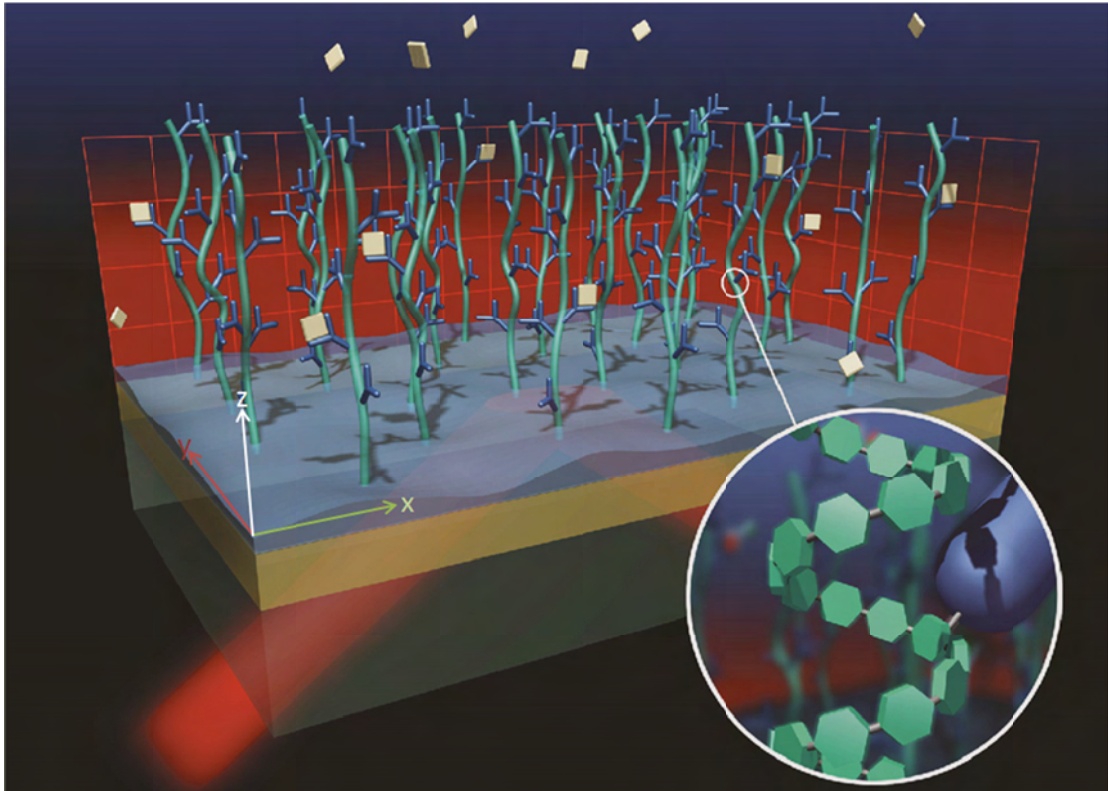


Abbildung 4: Querschnitt eines Sensors mit einem mechanischen Träger (z.B. Glas), einer Metallschicht (z.B. Gold), einer Verbindungsschicht zwischen dem Gold und der Immobilisierungsmatrix (blaue Schicht auf dem Metall), Immobilisierungsmatrix (z.B. Carboxydextran) und den darauf immobilisierten Liganden (blaue Y-Formen). Quelle: (Gedig, 2008). Folgendes wurde an der Originalabbildung verändert: Skalierung, Einfügen von x-, y-, z-Achsen.

Die immobilisierten Abstandhalter, die dieser Entwicklung entgegenwirken sollen, werden in vielen Fällen zusätzlich mit Polymeren wie carboxyliertes Dextran erweitert. Diese verhindern die unspezifische Bindung von Proteinen. Gleichzeitig erweitern sie den Bindungsbereich für Liganden von 2 dimensional (x, y) auf 3 dimensional (x, y, z), wie in Abbildung 4 dargestellt (Monolayers & Bergström, 2009).

1.2.2 Aminokopplung

Die am häufigsten verwendete Immobilisierungsmethode ist die Aminokopplung. Sie ist eine Methode, die sich durch Flexibilität gegenüber dem Ligandentyp, das einfachen Verfahren, Robustheit und durch eine hohe Immobilisierungsausbeute auszeichnet (Gedig, 2008). Es ist ein chemisches Verfahren, bei dem sich der Ligand, ähnlich der Knüpfung einer Peptidbindung durch Aminosäuren, über eine freie Aminogruppe mit einer Carboxylgruppe der Sensoroberfläche verbindet. Dafür

werden zuerst die Carboxylgruppen der Sensoroberfläche mit einer EDC/NHS-Lösung aktiviert. Anschließend wird der Ligand injiziert.

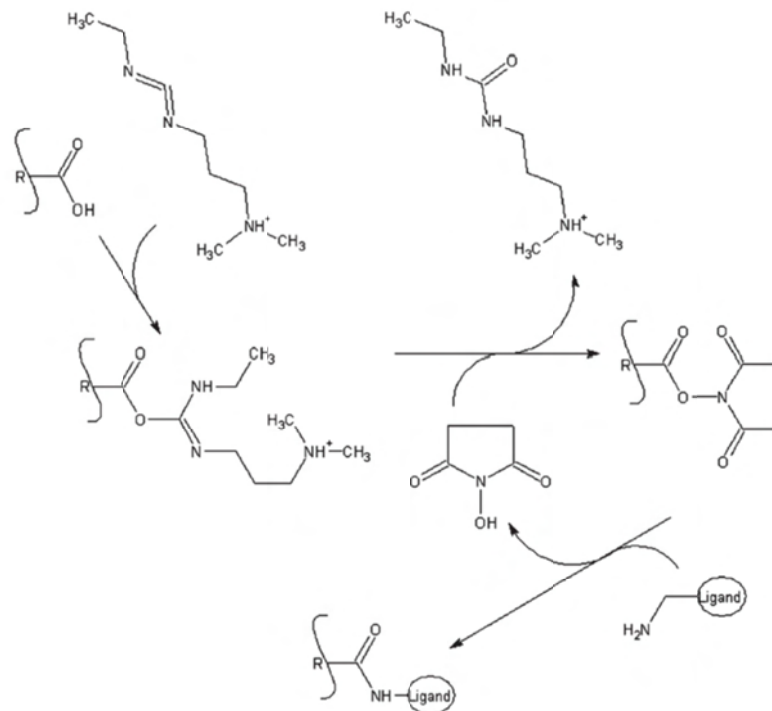


Abbildung 5: Immobilisierungsschemie der Aminokopplung. Die Carboxylgruppe der Sensoroberfläche wird mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und anschließend mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert um danach über eine Substitution die Aminogruppe des Liganden zu binden. Quelle: (Gedig, 2008)

Dank einiger unbesetzten negativen Carboxylgruppen, ist die Sensoroberfläche nach der Aktivierung leicht negativ geladen. Die richtige Wahl des pH-Wertes des Immobilisierungspuffers ($\text{pH} < \text{pI}$), führt zu einer positiven Ladung des Liganden und damit zu einer gegenseitigen elektrostatischen Anziehung (Präkonzentrierung) (Gedig, 2008). Im letzten Schritt der Aminokopplung wird mit einer Lösung gewaschen, die Aminogruppen enthält (bspw. Ethanolamin-HCL), damit nicht gebundene Carboxylgruppen abreagieren.

1.2.3 Thiolkopplung

Die Thiolkopplung basiert auf der Interaktion von Thiolgruppen auf der Sensoroberfläche mit bspw. Cysteinen des zu immobilisierenden Proteins. In der Regel werden die bestehenden Disulfidbrücken des Liganden vor der Immobilisierung durch Reduktion gelöst. Es folgt ein Aufreinigungsschritt durch Größenausschlusschromatographie um den reduzierten Liganden vom

Reduktionsmittel (z.B. Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol) zu trennen. Prinzipiell können die gleichen Sensoren verwendet werden, wie bei der Aminokopplung, allerdings werden sie dafür zuerst mit einem schwefelhaltigen Adaptermolekül wie 2-(2-pyridinyldithio)ethanamin (PDEA) modifiziert. Die Injektion des reduzierten Liganden über den modifizierten Sensor führt unter oxidativen Bedingungen zur Disulfidbrückenbildung. Injizieren einer Cysteinlösung sättigt im letzten Arbeitsschritt die restlichen reaktiven Schwefelverbindungen ab.

Mit Hilfe der Thiolkopplung können Proteine in einer bestimmten räumlichen Ausrichtung immobilisiert werden. Wenn das Protein des Weiteren nur ein freies Cystein hat, das weit genug vom aktiven Zentrum entfernt ist, kann eine höhere Aktivität des Proteins erreicht werden als bei der Aminokopplung (Gedig, 2008). Dieses hängt damit zusammen, dass bei der Aminokopplung die Proteine ungerichtet mit einer zufälligen NH_2 -Gruppe immobilisiert werden, die statistisch häufiger vorkommen als SH-Gruppen. Bei wenigen oder im Idealfall nur einen SH-Gruppe gibt es nur wenige Ausrichtungen für ein Protein immobilisiert zu werden. Herstellen von Mutanten mit reduzierten Cystein-Anteil und/oder einem Cystein an der richtigen Stelle lässt Immobilisierungen von z.B. Membranproteinen in einer natürlicherweise vorliegenden Ausrichtung zu (Tikhonova, Dastidar, Rybenkov, & Zgurskaya, 2009) (Tikhonova, Yamada, & Zgurskaya, 2012). Ein weiterer Vorteil der Thiolkopplung ist das verbesserte Recycling der Sensoren: Eine Disulfidbrücke kann mit entsprechenden Reduktionsmittel, wie DTT wieder gelöst und ein neuer Ligand gebunden werden.

Das Protokoll der Thiolkopplung ist aufwändiger und die Immobilisierungsausbeute ist geringer als bei der Aminokopplung, zudem kann durch auflösen von strukturell relevanten Disulfidbrücken, bei dem Reduktionsschritt, der Ligand denaturieren. Zusätzlich muss der Ligand über freie und reaktive Cysteinreste verfügen.

1.2.4 Weitere Sensoren und Immobilisierungsmethoden

Für die unterschiedlichsten Zwecke gibt es auf dem Markt passende Sensoren. Biacore hat bspw. ein breites Angebot an Aminokopplungssensoren, die sich in der Länge der Matrix und in der Bindungskapazität unterscheiden, von matrixlosen/niedrigkapazitären bis hin zu langmatrix/hochkapazitären Sensoren. Es

werden Sensoren oder Kits zur Modifikation dieser angeboten, die Poly-His-Tags, analog der Nickel-Chelatchromatographie, binden können. Auch für die Immobilisierung von Lipiden oder Liposomen sind Produkte auf dem Markt. Selbst für das Binden von biotinylierten Liganden auf Streptavidin- oder Neutravidin sind entsprechende ready-to-use Sensoren bzw. Reagenzien und Protokolle vorhanden.

1.3 Bindungskinetik und kinetische Kurvenanpassung

Die SPR-gestützte Analyse der 1:1 Bindungskinetik von zwei Molekülen lässt sich in zwei Schritte unterteilen. Während der Assoziation wird über den immobilisierten Liganden (B) der Analyt (A) injiziert. Durch die Bindung der beiden Moleküle ändert sich die Masse auf dem Sensor mit der Zeit. Bei diesem Schritt wird die Assoziationskonstante k_a bestimmt. Injektion des Laufpuffers führt zur Dissoziation, wobei die Dissoziationskonstante k_d bestimmt wird.



Ausgehend davon, dass die Assoziation für jeden Reaktanten und die Dissoziation für den Komplex Reaktionen erster Ordnung darstellen, kann die Änderung der Komplexkonzentration wie folgt dargestellt werden:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (2)$$

Während einer Injektion (Assoziationsphase) ist die Analytkonzentration konstant und es gilt $[A] = [A]_0$, wobei sich $[A]_0$ mit jeder Injektion durch die Variation der Analytkonzentration ändert. B ist der auf dem Sensor gebundene Ligand und seine höchste Konzentration $[B]_0$ liegt unmittelbar vor der Injektion des Analyten vor. Es gilt:

$$[B]_0 = [B] + [AB] \quad (3)$$

und aufgelöst nach $[AB]$:

$$[AB] = [B]_0 - [B] \quad (4)$$

wobei [B] die Konzentration von nicht gebundenen Liganden ist.

Einfügen von (4) in (2) ergibt:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A]_0[B] - k_d([B]_0 - [B]) \quad (5)$$

Nach dem Zusammenfassen nach [B] ergibt sich:

$$\frac{d[AB]}{dt} = (k_a [A]_0 + k_d) [B] - k_d[B]_0 \quad (6)$$

Betrachtend der zeitlichen Änderung, wird aus (4)

$$\frac{d[AB]}{dt} = \frac{d([B]_0 - [B])}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \quad (7)$$

da die Konzentrationen von [AB] und [B] sich antiproportional zu einander ändern.

Nun kann (7) in (6) eingefügt werden und es folgt:

$$-\frac{d[B]}{dt} = (k_a [A]_0 + k_d) [B] - k_d[B]_0 \quad (8)$$

Für den nächsten Schritt muss der Fall konkretisiert werden um das Verhältnis von k_a zu k_d fest zu legen. Ausgehend von beispielsweise einer Bindung von Antikörpern auf einem Protein ist $k_a \gg k_d$, da die Bindung hoch-affin ist. In diesem Fall kann k_d vernachlässigt werden und aus (8) wird:

$$-\frac{d[B]}{dt} = (k_a [A]_0 + k_d) [B] \quad (9)$$

da der Term $(k_a [A]_0 + k_d)$ eine Konstante darstellt, kann er zu einer gemessenen oder beobachteten Konstante k_{on} zusammengefasst werden:

$$k_{on} = k_a [A]_0 + k_d \quad (10)$$

Unter diesen Voraussetzungen wird aus (8) ein Zerfall erster Ordnung:

$$-\frac{d[B]}{dt} = k_{on}[B] \quad (11)$$

Die Integration des Terms ergibt:

$$[B] = [B]_0 e^{-k_{on}t} \quad (12)$$

Analog dem Zerfall, kann die Gleichung für das Wachstum erster Ordnung bzw. begrenztes Wachstum wie folgt dargestellt werden:

$$[AB] = [B]_0(1 - e^{-k_{on}t}) \quad (13)$$

Für die Dissoziationsphase gilt $[A] \equiv 0$ und (11) wird vereinfacht zu (14) wobei k_{off} gleich k_d ist:

$$\frac{d[AB]}{dt} = -k_{off}[AB] \quad (14)$$

und integriert:

$$[AB] = [AB]_0 e^{-k_{off}t} \quad (15)$$

wobei $[AB]_0$ die Konzentration am Ende der Assoziationsphase ist.

Das Verhältnis von k_{off} zu k_{on} ist K_D . Umgekehrt gilt $K_A = k_{on}/k_{off}$ (Mol & Fischer, 2008).

Entsprechend den theoretischen Verläufen der Assoziation und Dissoziation einer 1:1 Bindung können Analyseprogramme die k_{off} - und k_{on} -Werte bestimmen, woraus dann K_D berechnet wird.

Die dargestellte Bindungskinetik setzt eine 1:1 Bindung voraus und das 1:1 Langmuir Bindungsmodell wird im Allgemeinen für den Anfang zur kinetischen Kurvenanpassung empfohlen. Zum Schritt, andere Modellen zu benutzen, wird erst nach Prüfung der Versuchsbedingungen geraten. Es gibt viele Faktoren, die kinetische Kurvenanpassung beeinflussen können, da es sich um einen theoretischen Verlauf der real gemessenen Kurve handelt. So wird bei diesem Modell davon ausgegangen, dass die Bindung in einer Ebene stattfindet, die keine Unebenheiten aufweist und bei der alle Adsorptionsplätze gleichwertig sind. Außerdem wird unterstellt, dass die Bindungsfähigkeit des Analyten an den Liganden nicht von dem Beladungsgrad der benachbarten Liganden mit dem Analyten abhängig ist (Knoll et al., 2008).

Einen Einfluss auf den beobachteten Kurvenverlauf kann beispielsweise eine zu geringe Flussrate des Analyten haben, wobei es zur Massentransportlimitierung kommen kann. Auch unreine Analyten, Liganden, Puffer oder auch Messinstrumente beeinflussen den Kurvenverlauf, wodurch theoretische Voraussagen der

Kurvenverläufe mittels kinetischer Kurvenanpassung ungenauer werden. Des Weiteren sollte sowohl der Assoziation als auch der Dissoziation eine gewisse Zeit gegeben werden um genügend Werte zur Kurvenanpassung zu erfassen. Alle diese und weitere Punkte sollten zuerst betrachtet werden, bevor man ein anderes mathematisches Modell benutzt, um die gemessenen Kurvenverläufe zu beschreiben.

1.4 Rolle von AcrA und TolC

AcrA und TolC sind zwei Proteine der sogenannten transenvelope-multidrug-efflux-pump bei gramnegativen Bakterien wie *E. coli*. Während TolC in der äußeren Membran und AcrB, das dritte Glied der Pumpe, in der inneren Membran lokalisiert ist, bildet AcrA als periplasmatischer Adapter das Bindeglied der beiden Membranproteine, sodass eine Pumpe über den gesamten periplasmatischen Spalt entsteht, die, bspw. angetrieben durch einen H^+ -Gradienten, Wirkstoffe aus dem Zellinneren nach außen pumpt (Abbildung 6) (Ge, Yamadah, & Zgurskaya, 2009).

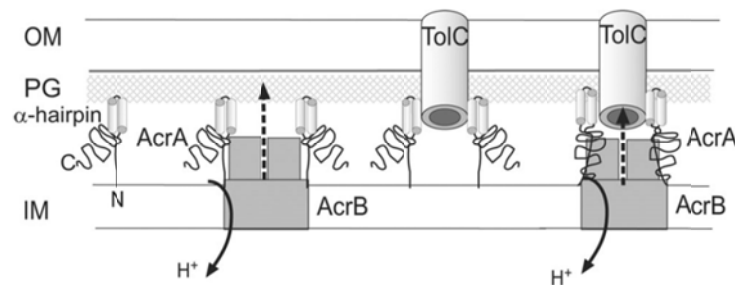


Abbildung 6: Bildung der transenvelope multidrug efflux Pumpe aus dem AcrAB-TolC Dreierproteinkomplex mit AcrA als wesentlicher Bestandteil für die Verbindung der Membranproteine AcrB und TolC.

Es wird vermutet, dass AcrA zu einer Art Kranz im Periplasma oligomerisiert, wobei es N-terminal mit der inneren Membran verbunden ist. Die genaue Stöchiometrie des Proteinkomplexes ist noch nicht bekannt. Es existieren jedoch SPR-gestützte Untersuchungen, die Hinweise auf eine Stöchiometrie von AcrA zu AcrB von 6:3 geben (Hincliffe, Symmons, Hughes, & Koronakis, 2013). Das Molekulargewicht von AcrA ist 40,6 kDa, AcrB 114 kDa (Tikhonova et al., 2009) und das von TolC 52 kDa (Morona, Manning, & Reeves, 1983).

1.5 Ziel der Arbeit

Die SPR-gestützte Interaktionsanalyse von Molekülen mithilfe des Messinstruments MASS1 von SierraSensors GmbH am Fraunhofer IME ScreeningPort wird mit dieser Bachelorarbeit zum ersten Mal durchgeführt. Es gibt laut dem Gerätehersteller bis dato keine Fachartikel, die mit diesem Messgerät generierte Daten enthalten. Das erste Ziel ist deshalb die zwei Methoden der Immobilisierung zu testen, die für die Interaktionstest von AcrA mit TolC bzw. mit Wirkstoffen infrage kommen.

Im Rahmen einer Doktorarbeit soll der MASS1 unter Anderem dazu dienen die Interaktion der Resistenzproteine AcrA und TolC miteinander aber auch ihre Interaktion mit kleinen Molekülen zu testen. Für diesen Zweck wird in dieser Bachelorarbeit stellvertretend für die AcrA-TolC-Interaktion, die Interaktion von humanen Serumalbumin (HSA) und Anti-HSA Antikörper getestet. Die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen wird durch die Bindung von niedermolekularen Verbindungen auf dem Enzym α -Carboanhydrase (CAII) und HSA getestet.

Wenn alle Tests erfolgreich abgeschlossen sind, soll AcrA für die Untersuchung einer Substanz-Bibliothek immobilisiert werden. Welche Immobilisierungsmethode dabei zum Einsatz kommt, wird während der Arbeit entschieden.

2 Methoden und Tests

Alle Immobilisierungen und alle Versuche werden auf den High Capacity Amine Sensoren der SierraSensors GmbH durchgeführt. Diese Sensoren bestehen, wie in der Abbildung 4 dargestellt, aus einer carboxylierten Dextranmatrix, auf der die Liganden immobilisiert werden. Außerdem kommen bei allen Versuchen die U-Boden 96-Well Platten von Greiner Bio-One International GmbH zum Einsatz. Bei allen Immobilisierungsversuchen werden nur die Spots B der jeweiligen Kanäle mit Protein beladen.

Der MASS1 wird durch die ControlR2 Software von SierraSensors gesteuert. In dieser Software wird vor jedem Versuch zuerst ein Platten-Layout in der Software erstellt, indem für jedes Well der 96-Well Platte der Analyt oder das Reagenz mit Bezeichnung, Konzentration und Molekulargewicht der darin enthaltenen Substanz eingetragen wird. Als nächster Schritt wird eine Methode definiert. Hierbei handelt es sich um eine Befehlskette, deren Reihenfolge zuerst festgelegt und danach vom MASS1 automatisch ausgeführt wird.

Die Befehle werden nun im dritten Arbeitsschritt im Einzelnen präzisiert. So werden für eine Injektion das injizierte Volumen in μl , die Injektionsgeschwindigkeit (Flussrate) in $\mu\text{l}/\text{min}$ und die Waschzeit des Sensors mit dem Laufpuffer (Dissoziationszeit) angegeben. Die Details, wie die injizierten Volumina und die Flussraten, befinden sich für jede Methode im Anhang unter "In ControlR2 erstellte Methoden".

Nach dem Erzeugen einer Methode wird diese in eine Methodenliste integriert und gestartet. Auf diese Weise werden alle Methoden dieser Liste automatisch nacheinander ausgeführt.

Das Messinstrument besitzt eine automatische Probeninjektion mit acht Nadeln. Pro Nadel wird dementsprechend ein Kanal auf dem Sensor bedient. Zwischen den Injektionen werden die Nadeln und Schläuche automatisch in der Reinigungslösung gewaschen.

Um die Lösungen auf die Kanäle des Sensors injizieren zu können, werden sie zuerst in eine 96-Well Platte pipettiert. Wenn von den acht Kanälen bspw. nur die ersten vier benutzt werden sollen, wird die Lösung in der Wellplatte in eine beliebige Spalte in die Reihen A bis D gegeben und die Reihen E bis H mit Laufpuffer gefüllt.

Nach der Lieferung des MASS1 wurden die Injektionsnadeln neu ausgerichtet und das Totvolumen, bedingt durch die neu eingestellte Eintauchtiefe der Nadeln in die Wells, neu ermittelt. Dabei wurden drei unterschiedliche Volumina zum Injizieren gegeben und anschließend das restliche Volumen in den Wells annähernd mit einer Kolbenhubpipette gemessen:

Tabelle 1: Berechnung des Totvolumens einer Injektion

Volumen (V_{pip}) in Wells pipettiert	Volumen (V_{edit}) in Methode erstellt	Restvolumen (V_{Rest}) in den Wells	Totvolumen $=V_{pip}-V_{edit}-V_{rest}$
150 μ l	80 μ l	30 μ l	40
150 μ l	40 μ l	68 μ l	42
150 μ l	20 μ l	90 μ l	40

Aufgrund von starken Änderungen des Brechungsindex beim Injizieren von Luftblasen und damit einhergehenden Störung des Signals, wurde ein Sicherheitsvolumen, zusätzlich zum geplanten Injektionsvolumen, von 50 μ l pro Injektion für alle nachfolgenden Versuche festgelegt.

2.1 Aminokopplung

Bei diesem Versuch werden BSA, CAII und HSA immobilisiert. Ziel ist es einerseits die Kapazität der High Capacity Amin Sensoren mithilfe der Aminokopplung zu testen und andererseits die minimale Injektionskonzentration der Proteine zu finden, bei der die maximale Proteinmenge immobilisiert wird.

Ethanolamin, Acetatpuffer und High Capacity Amine Sensoren wurden von SierraSensors GmbH bezogen und bei 4°C gelagert. NHS und EDC, bezogen vom selben Lieferanten, wurden in Wasser zu 100 mM und 800 mM gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.1 Immobilisierung

Alle Reagenzien werden vor der Immobilisierung hergestellt und/oder auf Raumtemperatur gebracht. Der Laufpuffer wird mit TPP Vakuumfilter filtriert. Die NHS und EDC 1:1 Lösung wird kurz vor dem Starten der Immobilisierungsmethode hergestellt und in die Wells pipettiert. Allgemein gilt, dass diese Lösung innerhalb von 30 min verwendet werden sollte.

CAII, HSA und BSA werden je in einem Acetatpuffer gelöst, der einen um 0,5 - 1,0 pH Einheiten geringeren pH-Wert hat als der pI der jeweiligen Proteine.

Tabelle 2: Lösungen für die Aminokopplung

<i>Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung und Konzentrationen</i>		<i>Anmerkung</i>
Laufpuffer 1	PBS Tween 20	10 mM 0,05%	pH 7,4
Reinigungslösung	ddH ₂ O Tween 20	0,05%	
HCl		100 mM	
Konditionierungs- lösung	NaOH NaCl	10 mM 1 M	
Aktivierungslösung	NHS EDC	50 mM 400 mM	1:1 Mix wird erst kurz vor der Immobilisierung hergestellt
BSA- Immobilisierungs- lösung	BSA Na Acetat-Puffer	10 mM	pI 4,7; 69 kDa pH 4,0
CAII- Immobilisierungs- lösung	CAII Na Acetat-Puffer	10 mM	pI 5,9; 29 kDa pH 5,0
HSA- Immobilisierungs- lösung	HSA Na Acetat-Puffer	10 mM	pI 4,7; 66 kDa pH 4,0
Inaktivierungs- lösung 1	Ethanolamin-HCl	1 M	pH 8,5

Erstellen der Methoden

Zuerst wird ein allgemeines Plattenlayout (Rack) in der ControlR2 Software erstellt. Für die Liganden wird dann, in dem allgemeinen Rack, individuell die Bezeichnung und die injizierte Konzentration in den jeweiligen Wells angepasst.

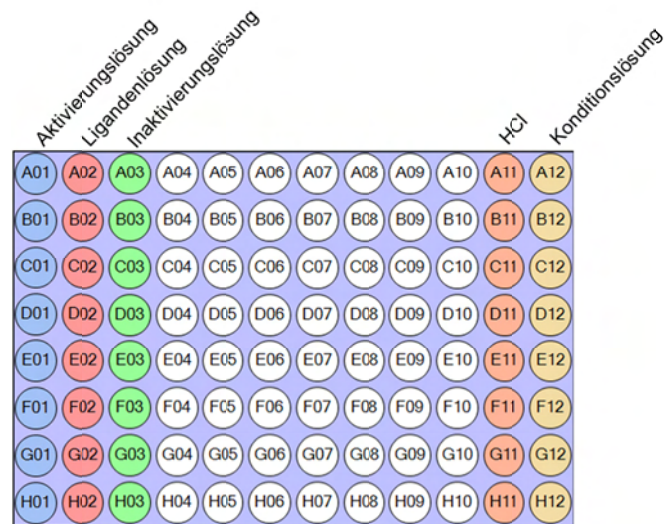


Abbildung 7: Allgemeines Layout der 96-Well Platte für Immobilisierung mit Aminokopplung

Vor der Immobilisierung wird eine Konditionierungsmethode durchgeführt. Der Schritt ist nicht notwendig wird jedoch empfohlen, da durch ihn eine bessere Basislinienstabilität erreicht werden kann. Es wird nach dem Spülen der Flusszelle mit dem Laufpuffer, dem Equilibrierungsschritt (Prime-Schritt), abwechselnd Konditionierungslösung (Spalte 12) und HCl (Spalte 11) über die Spots injiziert. Für Details über die Methode siehe Tabelle 7 im Anhang.

Nach der Konditionierung wird die Methode zur Immobilisierung durchgeführt. Dabei soll die Aktivierungslösung (Spalte 1) über Spots A und B, danach die Ligandenlösung (Spalte 2) über die Spots B und anschließend die Inaktivierungslösung (Spalte 3) wieder über beide Spots injiziert werden. Nach der Immobilisierung soll ein Prime-Schritt folgen (Details sind im Anhang Tabelle 8).

Durchführen der Immobilisierung

Nach dem Einpflegen der Methoden in ControlR2 werden die beiden Lösungen für die Konditionierung im ausreichenden Volumen entsprechend des Plattenlayouts in die Platte pipettiert, mit BioChromato Versiegelungsfolie verschlossen und die Methode wird gestartet. Danach werden in die gleiche Platte alle Reagenzien für die Immobilisierung entsprechend des Plattenlayouts pipettiert, mit der Versiegelungsfolie verschlossen und die Immobilisierungsmethode gestartet.

2.2 Thiolkopplung

Es ist geplant das Resistenzproteine AcrA über Thiolkopplung auf dem Sensor zu immobilisieren. Dafür wird eine Mutante des Proteins (AcrA^{S362C}) verwendet, die ein einziges Cystein an der Position 362 enthält (Tikhonova et al., 2012). Dadurch soll eine optimale Ausrichtung des Proteins nach der Immobilisierung gewährleistet werden.

Für den Test der Thiolkopplung wird CAII und HSA verwendet. Beide Proteine besitzen ein freies Cystein, wobei HSA weitere Cysteine besitzt, die allerdings in der natürlichen Konformation zu Disulfidbrücken verbunden sind.

Wenn mindestens eines der beiden Proteine erfolgreich immobilisiert wurde und die Tests mit großen und kleinen Molekülen auf dem Protein erfolgreich waren, wird AcrA immobilisiert.

2.2.1 Immobilisierung

Wie auch bei der Aminokopplung werden alle Reagenzien vor der Immobilisierung hergestellt und/oder auf Raumtemperatur gebracht. Der Laufpuffer wird mit TPP Vakuumfilter filtriert. Die NHS/EDC 1:1 Lösung und die 2-(2pyridinyldithio)ethanamin/Boratpuffer-Lösung (PDEA/Boratpuffer-Lösung oder auch Modifizierungslösung) wird kurz vor dem Starten der Immobilisierungsmethode hergestellt und in die Wells pipettiert.

CAII und HSA werden, wie bei Aminokopplung, je in einem Acetatpuffer, der einen um 0,5 - 1,0 pH Einheiten geringeren pH-Wert hat als der pI der jeweiligen Proteine, gelöst.

Tabelle 3: Lösungen für die Thiolkopplung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung und Konzentrationen</i>		<i>Anmerkung</i>
TCEP Disulfide Reducing Gel			Kit
BCA Protein Assay			Kit
Equilibrierungs-puffer	HEPES-NaOH	20 mM	pH 7,0
	NaCl	500 mM	
	Na ₂ EDTA	5 mM	
Laufpuffer 2	PBS	10 mM	pH 7,4

Laufpuffer 3	Tween 20	0,05%	pH 5,9
	MES-KOH	20 mM	
	NaCl	150 mM	
	DDM	0,05%	
Reinigungslösung	ddH ₂ O		
	Tween 20	0,05%	
HCl		100 mM	
Konditionierungs- lösung	NaOH	10 mM	
	NaCl	1 M	
Aktivierungslösung	NHS	50 mM	1:1 Mix wird erst kurz vor der Immobilisierung hergestellt
	EDC	400 mM	
Modifizierungs- lösung	PDEA	80 mM	pH 8,5 wird erst kurz vor der Immobilisierung hergestellt
	Natriumborat	100 mM	
	Puffer		
CAII- Immobilisierungs- lösung	CAII		pI 5,9; 29 kDa pH 5,0
	Na Acetat-Puffer	10 mM	
HSA- Immobilisierungs- lösung	HSA		pI 4,7; 66 kDa pH 4,0
	Na Acetat-Puffer	10 mM	
AcrA- Immobilisierungs- lösung	AcrA		pI 7,69 (theoretisch (Gupta, Rai, & Gautam, 2015)) pH 4,8
		10 mM	
	Na Acetat-Puffer		
Inaktivierungs- lösung 2	Cystein	50 mM	pH 4,8
	NaCl	1 M	
	Na Acetat-Puffer	100 mM	

Reduktion der Proteine

Vor der Immobilisierung werden mögliche Disulfidbrücken der Proteine mit TCEP Disulfide Reducing Gel (Thermo Fisher Scientific Inc.) reduziert. Dazu werden 400 µl des resuspendierten Gels in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, 1 min lang bei 2000xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Gel wird mit 400 µl Equilibrierungspuffer resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wird wiederholt. Anschließend werden 200 µl der 1 mg/ml konzentrierten Proteinlösung dazugegeben und 45 min lang unter schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird 1 min lang bei 2000xg bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mit dem reduzierten Protein in ein sauberes Gefäß überführt. Nach der Reduktion sollte das Protein innerhalb von zwei Stunden immobilisiert werden.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird mit BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Dazu werden je 10 µl der unverdünnten, einer 1:1 verdünnten und einer 1:3 verdünnten Lösung der Proteinlösung in zwei Wells (Doppelbestimmung) einer Mikrottestplatte für Proteinbestimmung gegeben. Als Standard der Kalibriergeraden wird BSA verwendet und ebenfalls zur Doppelbestimmung in die Wells der Platte gegeben. In zwei weiteren Wells werden je 10 µl Puffer pipettiert um den Hintergrund zu bestimmen. Danach wird das benötigte Volumen der Reaktionslösungen A und B aus dem Kit im Verhältnis von 1:50 vermischt (Lösung C) und je 200 µl in die Wells gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wird die Extinktion bei 562 nm mit dem EnSpire von PerkinElmer Inc. bestimmt und die Proteinkonzentration mithilfe der Kalibriergeraden in MS-Excel bestimmt.

Durchführen der Immobilisierung

Nach der Proteinbestimmung wird die Proteinlösung nach Bedarf verdünnt, alle Lösungen nach dem Plattenlayout (Abbildung 8) in die Wells pipettiert und die jeweilige Methode gestartet. Für die drei Proteine wird die Methode in der Tabelle 9 im Anhang verwendet.

Bei der Immobilisierung von CAII und HSA kommt der Laufpuffer 2 und für AcrA der Laufpuffer 3 zum Einsatz, da AcrA im MES-Puffer mit DDM als Detergens stabil ist.

Der Konditionierungsschritt (Tabelle 7 im Anhang) wird während der Inkubationszeit von 45 min bei der Reduktion der Proteine vorbereitet und gestartet, um ein Zeitverzug zu vermeiden.

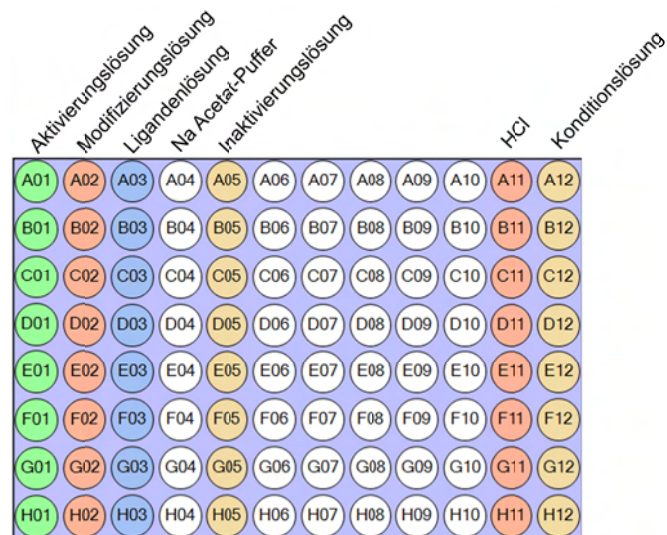


Abbildung 8: Allgemeines Layout der 96-Well Platte für Immobilisierung mit Thiolkopplung

2.3 Molekülinteraktion - groß mit groß

Ziel der Versuche ist es die Interaktion von großen Molekülen mit einander zu beobachten, indem eine mathematische Analyse durchgeführt wird. Gleichzeitig wird ein Vergleich der zwei Analyseprogramme, Analyser2 von Sierra Sensors GmbH und Prism von GraphPad Software Inc., anhand der erzeugten Daten, vorgenommen. Die in Prism aufbereiteten Daten werden für diesen Zweck in Excel exportiert, mit einem Visual Basic Makro sortiert (Scrip: Abbildung 39 im Anhang) und in Prism eingefügt.

Für den Test der Interaktion der immobilisierten Proteine mit großen Molekülen, werden anti-HSA Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Protein gegeben. Aus Kostengründen wird bei diesen Versuchen mit polyklonalen Antikörpern gearbeitet.

Es wird wieder ein Plattenlayout und eine Methode in ControlR2 erstellt, die Antikörper entsprechend verdünnt und nach dem Layout in die 96-Wellplatte pipettiert. Die Abbildung 9 zeigt das Layout.

Vor jedem Versuch wird das System über den Prime-Befehl equilibriert. Bei allen Antikörperversuchen wird Laufpuffer 1 verwendet.

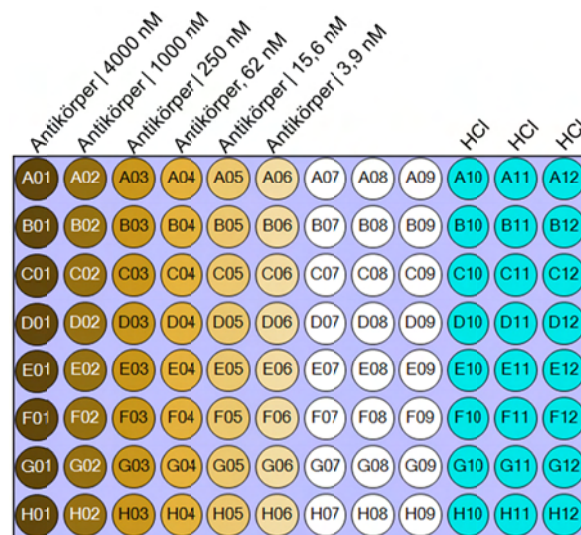


Abbildung 9: Layout der 96-Well Platte für den Antikörpertest auf Immobilisierten HSA.

Die Injektionszeit und damit die Kontaktzeit variiert zwischen den Versuchen. Die Regeneration des Sensors wird aufgrund der starken Bindung der beiden Partner mit 100 mM HCl beschleunigt, wobei die Säure 5 min lang injiziert wird. Am Ende der Methoden wird ein Befehl zum Speichern der Daten ausgeführt und das System in den Standby-Modus versetzt.

2.4 Molekülinteraktion - groß mit klein

Aufgrund zukünftiger Experimente mit dem MASS1, die auf das Testen von Substanzen gegen bestimmte Zielproteine abzielen, wird das Verhalten von Interaktionspartnern mit bekannten K_D -Werten getestet. Auch hier werden die Daten mit AnalyserR2 und Prism parallel analysiert.

Die Testsubstanzen für diesen Versuch werden in reinem DMSO gelöst so wie alle Substanzen am Fraunhofer IME ScreeningPort. Der Nachteil ist, dass DMSO, injiziert über einem Sensor, eine starken Änderung des Brechungsindex hat, die zusätzlich auch von der Beladung der Spots mit Liganden abhängig ist. Je stärker die Beladung, desto weniger DMSO bindet an der Oberfläche. Dadurch werden an den unbeladenen Spots A, gegenüber den Spots B, überproportional stärkere Signal gemessen. Die Kontrolle über die Spots A wird in diesem Fall unbrauchbar. Aus diesem Grund gibt es bei den Auswertungsprogrammen die Möglichkeit einer Lösungsmittelkorrektur, die anhand der Injektion von unterschiedlichen

Lösungsmittelkonzentrationen im Puffer eine Korrektur vornimmt. Es werden dementsprechend vor jedem Versuch Injektionen von DMSO haltigen Puffer mit unterschiedlichen DMSO Konzentrationen durchgeführt.

2.4.1 Sulfanilamid auf immobilisierten CAII

Für diesen Test wird der Sensor mit der über Aminokopplung immobilisierten α -Carboanhydrasen verwendet. Der Compound, Sulfanilamid (172,21 Da), ist ein CAII Inhibitor dessen Bindungsverhalten dokumentiert ist. Als Orientierung für diesen Versuch dient die Publikation von Papalia et al (Papalia et al., 2006).

Tabelle 4: Lösungen für die Sulfanilamiduntersuchung auf CAII

Bezeichnung	Zusammensetzung und Konzentrationen		Anmerkung
Laufpuffer 4	PBS	10 mM	pH 7,4
	Tween 20	0,05%	
	DMSO	3%	
Reinigungslösung	ddH ₂ O		
	Tween 20	0,05%	
Sulfanilamid			Analyt;
Lösungsmittelkorrekturlösung (LKL)	PBS	10 mM	DMSO Konzentrationen unterscheiden sich
	DMSO		

Folgende Verdünnungsreihen werden verwendet:

Tabelle 5: Verdünnungsreihen für Sulfanilamid und LKL für den Bindungstest auf Immobilisierten CAII

Sulfanilamid, μM							
20,00	15,00	10,00	7,500	5,000	3,750	2,500	1,875
LKL, [DMSO] %							
2,6	2,8	3,0	3,2	3,4			

Nach dem Equilibrieren des Systems über den Prime-Befehl, werden Daten für die Lösungsmittelkorrektur generiert, indem die unterschiedlichen Konzentrationen des LKL, beginnend mit der geringsten, auf den Sensor gegeben werden. Nach diesem Schritt werden die Verdünnungen von Sulfanilamid auf den Sensor injiziert. Die Regeneration des Sensors zwischen den Injektionen wird mit dem Laufpuffer

durchgeführt. Die Details zur verwendeten ControlR2-Methode sind in der Tabelle 10 im Anhang zu finden.

2.4.2 Indometacin auf immobilisierten HSA

Der Interaktionstest von niedermolekularen Substanzen auf HSA wird auf dem gleichen Sensor durchgeführt, auf dem HSA über Thiolkopplung immobilisiert wurde. Außer dem Analyten kommen die gleichen Lösungen zum Einsatz, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Der Analyt ist Indometacin (357,79 Da). Er wird als Schmerzmittel eingesetzt. Als Orientierung für diesen Versuch diente Application Note 121 von Oy BioNavis Ltd. (Oy BioNavis Ltd., 2000).

Folgende Verdünnungsreihen werden verwendet:

Tabelle 6: Verdünnungsreihen für Indometacin und LKL für den Bindungstest auf Immobilisierten HSA

<i>Indometacin, μM</i>					
100	50	25	12,5	6,25	3,13
<i>LKL, [DMSO] %</i>					
2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	

Auch hier wird zuerst das System mit dem Prime-Befehl equilibriert und die Daten für die Lösungsmittelkorrektur generiert. Dazu werden die unterschiedlichen LKL-Konzentrationen mit aufsteigendem DMSO-Gehalt auf den Sensor gegeben. Indometacin wird beginnend mit der geringsten Konzentration injiziert. Nach jeder zweiten Injektion wird Laufpuffer injiziert. Dieser Schritt wird empfohlen um Drifts in den Graphen zu vermeiden. Für Details siehe Tabelle 11 im Anhang.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aminokopplung

3.1.1 Immobilisierung von BSA und HSA

Es wurden zwei Immobilisierungsversuche mit BSA (BSA1 und BSA2) und einer mit HSA durchgeführt. Dabei wurden folgende Proteinkonzentrationen auf den jeweiligen Kanälen der Sensoren injiziert:

Kanal	BSA 1, µg/ml	BSA 2, µg/ml	HSA, µg/ml
1	10240	640	24
2	10240	640	12
3	5120	320	6
4	5120	320	3
5	2560	160	/
6	2560	160	/
7	1280	80	/
8	1280	80	/

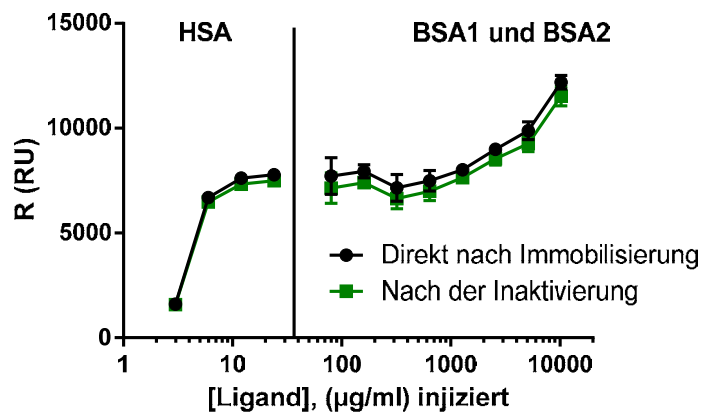


Abbildung 10: Immobilisierung von BSA und HSA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche, in der Tabelle links dargestellte, Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Beide Liganden werden aufgrund der starken Ähnlichkeit in Größe, Sequenz und Struktur in einem Plot dargestellt. Die gemessenen R (RU), rechts im Graph, stellen die Beladung der jeweiligen Spots B der Kanäle nach der Immobilisierung dar.

Der Graph in der Abbildung 10 zeigt die Beladung der Spots B der jeweiligen Kanäle bei den drei Immobilisierungsversuchen. Auch wenn es zwischen HSA und BSA Unterschiede gibt, ähneln sie sich dennoch stark in Gewicht, Sequenz und Struktur. Dadurch ist es möglich, die beiden Proteine in einem Graph dar zu stellen und wie ein und dasselbe Protein in diesem Versuch zu behandeln.

Im Bereich zwischen 12 µg/ml und 1280 µg/ml befinden sich die Werte bei ca. 7000 RU, danach steigen die Werte für BSA ein zweites Mal an. HSA hat einen

Sättigungspunkt bei ca. 12 $\mu\text{g/ml}$ (dritter Datenpunkt), wenn bei der Immobilisierung die Kontaktzeit 10 min beträgt.

Nach der Immobilisierung dissoziieren nicht kovalent gebundenen Liganden, was man an dem Verlauf des grünen Graphen sieht. Er zeigt die Resonance Units, die sich nach dem gesamten Immobilisierungsvorgang einstellen, also nach der Inaktivierung der Sensoroberfläche. Im Fall von BSA und HSA gibt es fast keine Änderung.

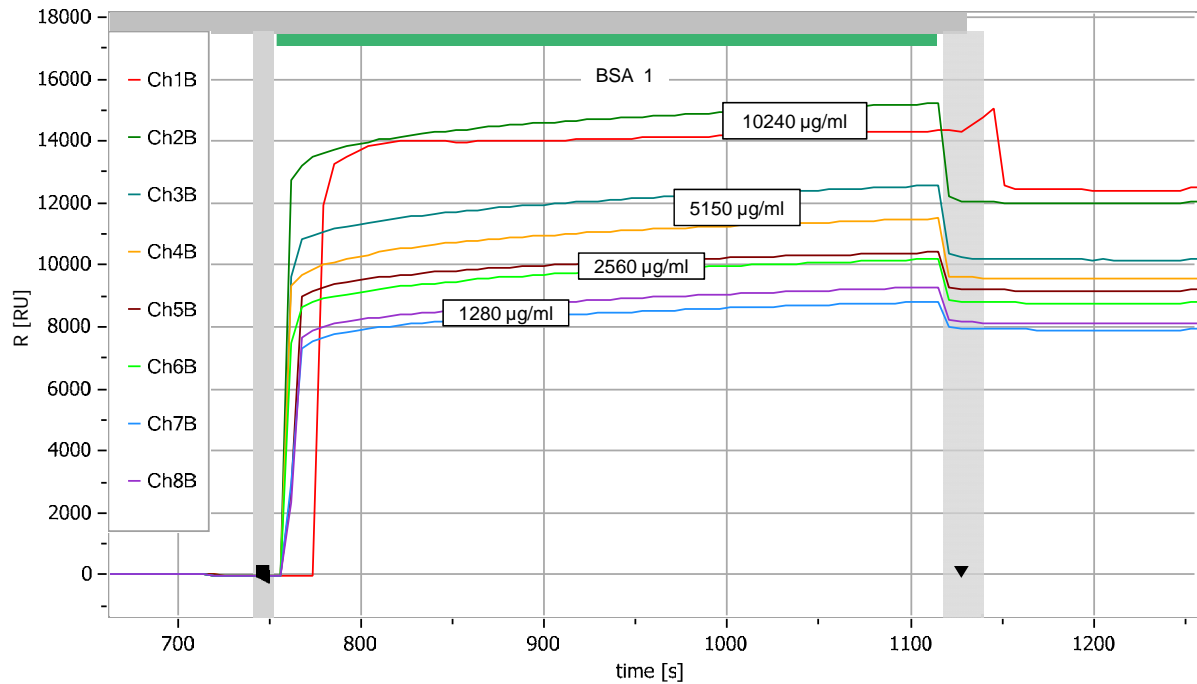


Abbildung 11: Immobilisierungsverlauf der ersten Immobilisierung von BSA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt ist die Injektion von BSA und die zeitliche Entwicklung der RU auf den Spots B aller acht Kanäle.

Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen den Injektionsverlauf von BSA1 und HSA mit den jeweiligen injizierten Konzentrationen. In beiden Fällen ist deutlich erkennbar, dass eine höhere Konzentration zu einer stärkeren Beladung der Kanäle führt, da hier die RU nach der Injektion auf einem höheren Niveau liegen. Die vollständigen Immobilisierungskurven von HSA und BSA2 mit allen Injektionen befinden sich im Anhang (Abbildung 32 und Abbildung 33).

In der Abbildung 12 ist deutlich erkennbar, dass jede Kurve zuerst einen eher linearen Anstieg hat (z.B. blaue Kurve bis zum Zeitpunkt 5300 s) und dann vor der Sättigung eine kurze exponentielle Phase (5300 s bis 5400 s in der blauen Kurve),

die in der Sättigung in eine Phase des begrenzten Wachstums übergeht (5400 s bis Injektionsstop).

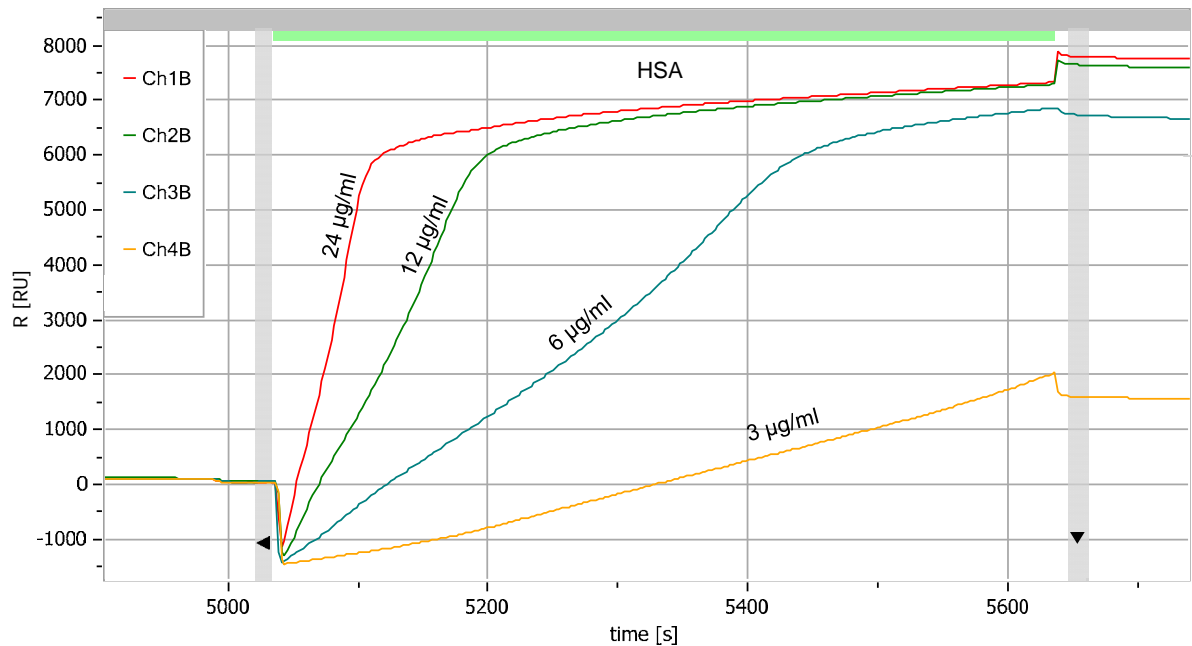


Abbildung 12: Immobilisierung von HSA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt ist die Injektion von HSA und die zeitliche Entwicklung der RU auf den Spots B der ersten vier Kanäle.

Diskussion

Der Anstieg der Masse ist proportional zum Anstieg der RU. Auf Biacore Systemen gilt $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2$. Es ist zwar offen, ob dieses auch auf den MASS1 angewandt werden kann, dennoch kann es als Richtwert genommen werden, da der verwendete Sensor, laut Hersteller, dem CM5-Sensor der Biacore-Systeme sehr ähnlich ist.

Wie erwartet steigt mit der injizierten Konzentration auch die gebundene Masse auf den Spots B, bis ein Plateau erreicht ist (Graph in der Abbildung 10 rechts). Der Anstieg ist nicht linear. Nach dem Plateau steigt sie ab einer bestimmten Konzentration jedoch wieder. Der Anstieg erinnert an exponentielles Wachstum. Die zusätzliche Masse scheint nicht unspezifisch gebunden zu sein, da am Ende der Immobilisierung kaum Protein dissoziiert ist. Eine irreversible Oligomerisation des Proteins ist zwar möglich, diese wurde aber erst bei Temperaturen weit über der Versuchstemperatur von etwa 25°C beobachtet (Vaiana, Emanuele, Palma-Vittorelli, & Palma, 2004).

Konzentrationsabhängige Oligomerisation von BSA und HSA wurden bereits beobachtet und eine mögliche Erklärung sind elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine untereinander (Bhattacharya, Prajapati, Chatterjee, & Mukherjee, 2014). Der in der Quelle beschriebene Vorgang ist jedoch reversibel, was bedeutet, dass nach der Immobilisierung die Oligomere, aufgrund des Verdünnungseffektes bei der Injektion der Inaktivierungslösung, wieder dissoziieren müssten. Dieses hätte sich in einer deutlichen Diskrepanz in der grünen und schwarzen Kurve geäußert. Es bleibt ungeklärt, was den zweiten Anstieg verursacht hat.

Eine wichtige Erkenntnis aus diesem Versuch ist, dass die immobilisierte Masse auf dem Sensor nicht linear mit der injizierten Ligandenkonzentration wächst. Wenn beispielsweise für zukünftige Versuche, wie das Bestimmen von Kinetiken, ein bestimmtes Immobilisierungslevel nicht überschritten werden soll, ist der Zusammenhang zwischen eingesetzten Konzentrationen und resultierenden Beladung des Sensors wichtig. Der Zusammenhang scheint exponentiell zu sein.

3.1.2 Immobilisierung von CAII

Der Graph in der Abbildung 13 zeigt deutlich den Verlust der RU und damit der Beladung nach dem Inaktivierungsvorgang verglichen mit der anfänglichen Masse, die direkt nach der Ligandeninjektion gemessen wurde. Die Tabelle links zeigt den verbliebenen Anteil der Masse am Ende des Versuchs in %.

Kanal	CAII, $\mu\text{g/ml}$	RU nach Inaktivierung, %
1	200	67
2	200	68
3	100	68
4	50	68
5	25	71
6	12,5	75
7	6,25	99
8	3,13	109

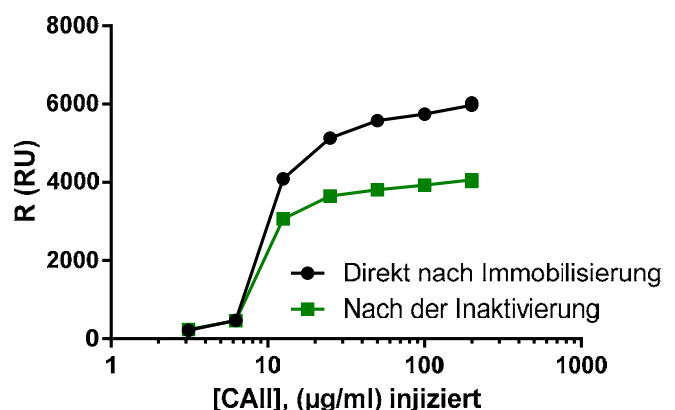


Abbildung 13: Immobilisierung von CAII auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche in der Tabelle links dargestellte Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Die gemessenen R(RU), rechts im Graph, stellen die Beladung der jeweiligen Spots B der Kanäle nach der Immobilisierung dar.

Der Vergleich der beiden Kurven zeigt, dass die schwarze Kurve kein richtiges Plateau erreicht, da mit wachsenden injizierten Konzentrationen das Signal weiterhin wächst. Dieses ist vergleichbar mit der Entwicklung, die bei BSA und HSA beobachtet wurde. Dagegen scheint die grüne Kurve ein Plateau zu haben bzw. ist hier die Steigung in dem erwarteten Plateaubereich (ab ca. 20 $\mu\text{g/ml}$) wesentlich kleiner.

Die Diskrepanz zwischen der schwarzen und grünen Kurve scheint mit der injizierten Konzentration zu wachsen, was die Zahlen in der Tabelle links bestätigen. Für CAII wird, ähnlich wie bei HSA, ein Sättigungspunkt von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt.

Abbildung 14 zeigt den Injektionsverlauf für die jeweiligen Kanäle. Man erkennt deutlich für jede Kurve zwei Phasen. In der ersten Phase ist ein exponentielles Wachstum erkennbar. In der hellgrünen Kurve dauert es bis zu Zeitpunkt 1300 s danach strebt die Kurve einem Sättigungspunkt entgegen. Je höher die eingesetzte Konzentration, desto früher endet die exponentielle Phase (bei 20 $\mu\text{g/ml}$ bereits bei ca. 1070 s). Der vollständige Immobilisierungsverlauf befindet sich im Anhang (Abbildung 34).

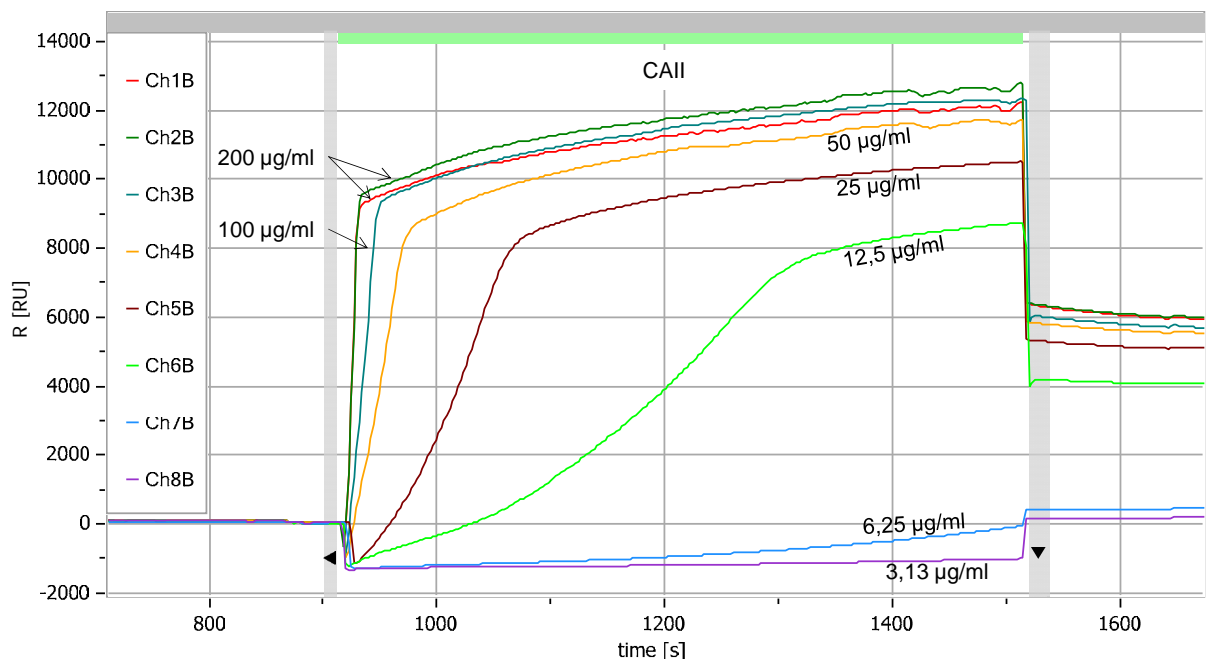


Abbildung 14: Verlauf der Immobilisierung von CAII auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben (siehe Abbildung 13). Dargestellt sind die drei Injektionen bei einer Aminokopplung und die zeitliche Entwicklung der RU auf den Spots B aller acht Kanäle

Diskussion

Ein exponentielles Wachstum in Abbildung 14 deutet darauf hin, dass möglicherweise zwei Bindungseffekte zu beobachten sind. Einerseits der Vorgang der kovalenten Bindung von CAII an die Dextranmatrix via Aminokopplung. Andererseits die Oligomerisation der freien Proteine mit den kovalent gebundenen Proteinen. Der zweite Effekt hängt von der gebundenen Masse auf dem Sensor ab, die in diesem Fall durch kovalente Immobilisierung stetig steigt. Dieses würde bedeuten, dass die steigende Anzahl kovalent gebundener Proteine mehr Bindungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen generieren und umso mehr Masse kann gebunden werden. Der Anstieg der RU wird exponentiell. Da die Bindungsplätze sich jedoch auf die immobilisierten Proteine beschränken, kommt es später zu einer Sättigung, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation einstellt. Diese Sättigung tritt ein, wenn der Sensor nur noch wenige Proteine kovalent binden kann. Für diese Annahme spricht auch der starke Abfall des Signals nach Beendigung der Injektion, da dann nicht kovalent gebundene Proteine vom Sensor gewaschen werden (Vergleich grüne und schwarze Kurve im Graph der Abbildung 13). Diese Annahme kann aufgrund fehlender Literatur nicht eindeutig überprüft werden.

Die bei CAII beobachtete Entwicklung scheint proteinabhängig zu sein, da bei BSA bzw. HSA kaum eine Diskrepanz zwischen dem grünen und schwarzen Graphen besteht. Die unterschiedlichen Entwicklungen der Kurven von CAII und den Serumalbuminen liegt vermutlich in ihren unterschiedlichen Eigenschaften. CAII hat weniger als die Hälfte der Masse von BSA bzw. HSA und der pI ist um 1,2 Punkte höher. Sie haben auch eine unterschiedliche Sequenz und Faltung, was möglicherweise unterschiedliche lokalen Ladungen bzw. hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche der Proteine als Folge hat.

3.2 Thiolkopplung

3.2.1 Immobilisierung von CAII

Kanal	CAII, $\mu\text{g/ml}$
1	
2	
3	
4	
5	12
6	12
7	6
8	3

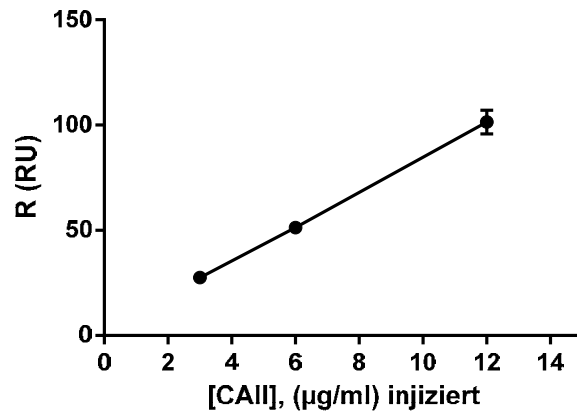


Abbildung 15: Beladung der jeweiligen Kanäle nach der Immobilisierung von CAII mit Thiolkopplung auf High Capacity Amin Sensor des MASS1, dargestellt in R(RU); Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben (siehe Tabelle links).

Die Immobilisierung von CAII über Thiolkopplung ist nicht in dem gewünschten Umfang möglich. Der Anstieg der RU mit der Konzentration des injizierten Liganden scheint zwar gegeben, liegt aber mit ca. 100 RU bei 12 $\mu\text{g/ml}$ um das Dreißigfache unter dem Wert, der bei gleicher injizierten Konzentration, bei der Aminokopplung gemessen wurde.

Diskussion

CAII hat zwar ein Cystein in der Sequenz, was im vorliegenden Fall nicht ausreichend zu sein scheint. Betrachtet man die Tertiärstruktur des Proteins (Abbildung 16), so findet man das Cystein mittig in dem Protein (Gelb markierte Struktur). Aus sterischen Gründen ist die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Disulfidbrücken mit der modifizierten Dextranmatrix auf der Sensoroberfläche deshalb relativ klein, was die geringe Immobilisierungseffizienz erklärt.

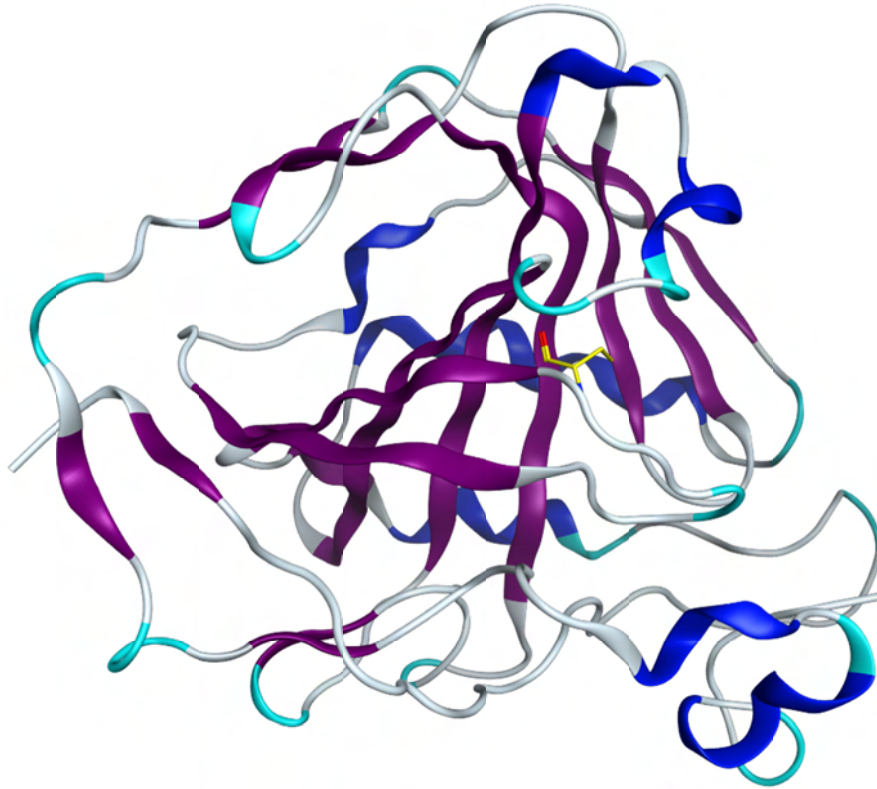


Abbildung 16: CAII Struktur mit hervorgehobenen Cystein (gelbe Struktur mittig im Protein), aufgenommen mit Molecular Operating Environment (MOE) 2014.09 von Chemical Computing Group Inc. Quelle der Struktur: Protein Data Bank (PDB Proteinnummer 2H4N); Abbildung erstellt mit Unterstützung von Alessia Gilardi.

3.2.2 Immobilisierung von HSA

Kanal	HSA, $\mu\text{g/ml}$
1	12
2	6
3	6
4	3
5	
6	
7	
8	

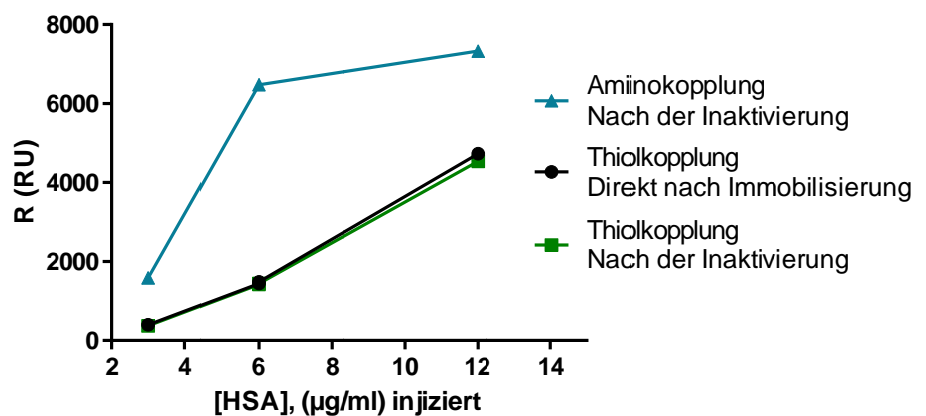


Abbildung 17: Beladung der jeweiligen Kanäle nach der Immobilisierung von HSA mit Thiolkopplung (grün) und Aminokopplung (blau) auf High Capacity Amin Sensor des MASS1, dargestellt in R(RU); Die Sensoroberfläche wurde für die Thiolkopplung mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben (siehe Tabelle links).

Die Thiolkopplung von HSA ist möglich, was an dem grünen Graphen der Abbildung 17 erkennbar ist. Die grüne Kurve stellt die Beladung der Spots B bei der Thiolkopplung und die blauen Kurve bei der Aminokopplung jeweils nach der Inaktivierung dar, was einen Vergleich der beiden Immobilisierungsmethoden ermöglicht.

Es fällt auf, dass bei der Aminokopplung bei gleicher eingesetzter Proteinkonzentration wesentlich mehr Protein immobilisiert wird als bei der Thiolkopplung. Die Diskrepanz zwischen der Masse direkt nach der Proteininjektion und der Masse nach der Inaktivierung ist, ähnlich wie bei der Aminokopplung, gering.

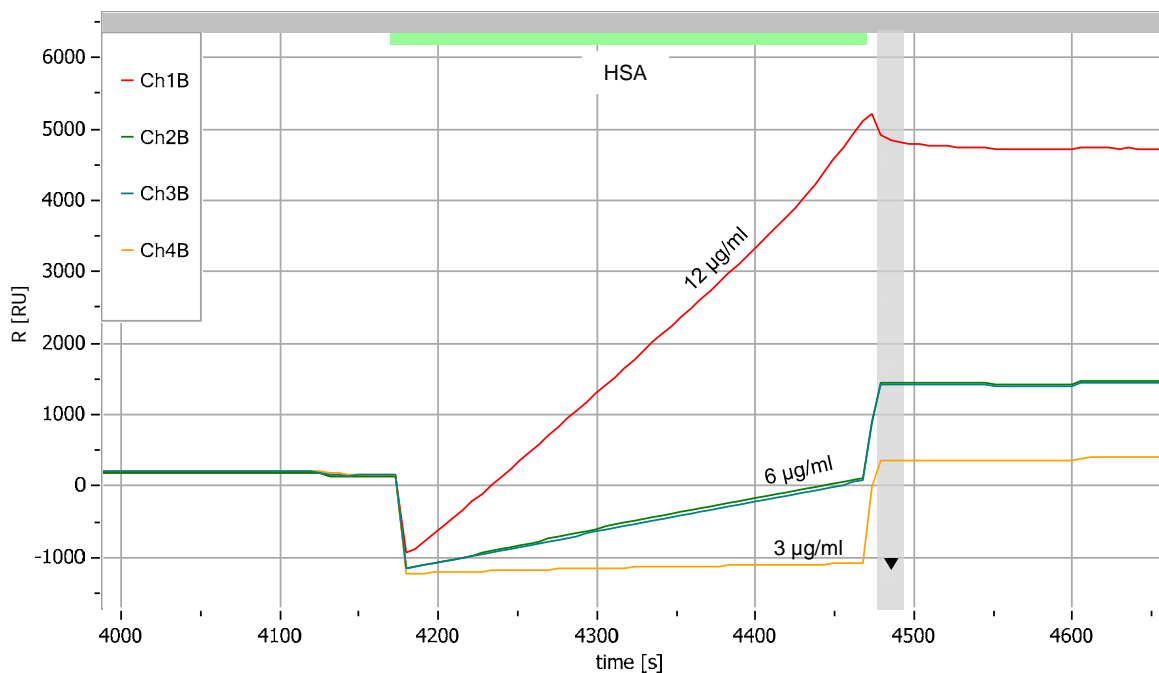


Abbildung 18: Verlauf der Immobilisierung von HSA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben; Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der RU auf den Spots B der Kanäle 1-4.

Diskussion

Dass die Thiolkopplung von HSA gut funktioniert hat, ist nicht überraschend. HSA mit den 34 Cysteinen (Abbildung 19 unten), die zum Teil außen lokalisiert sind (Abbildung 19 oben, gelb markierte Strukturen), ist ein guter Kandidat für die Thiolkopplung.

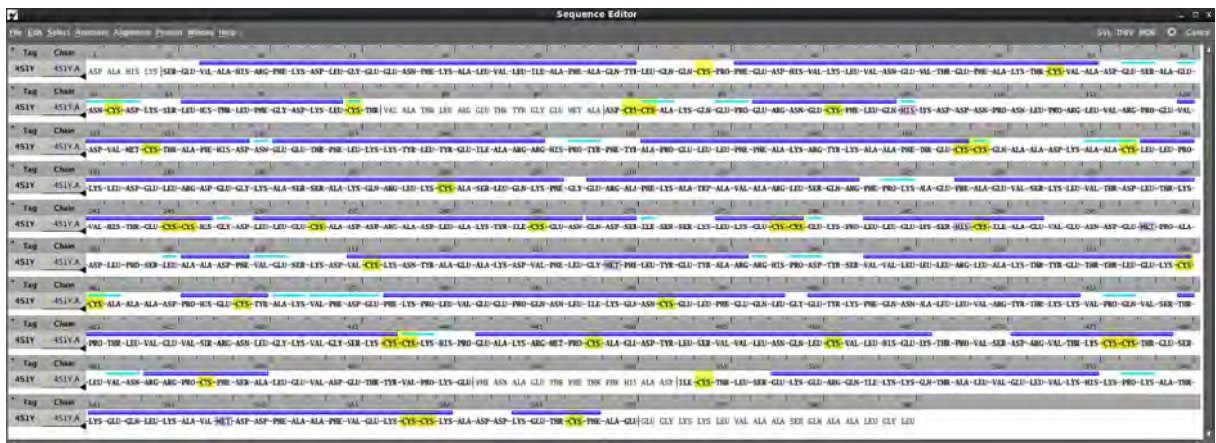
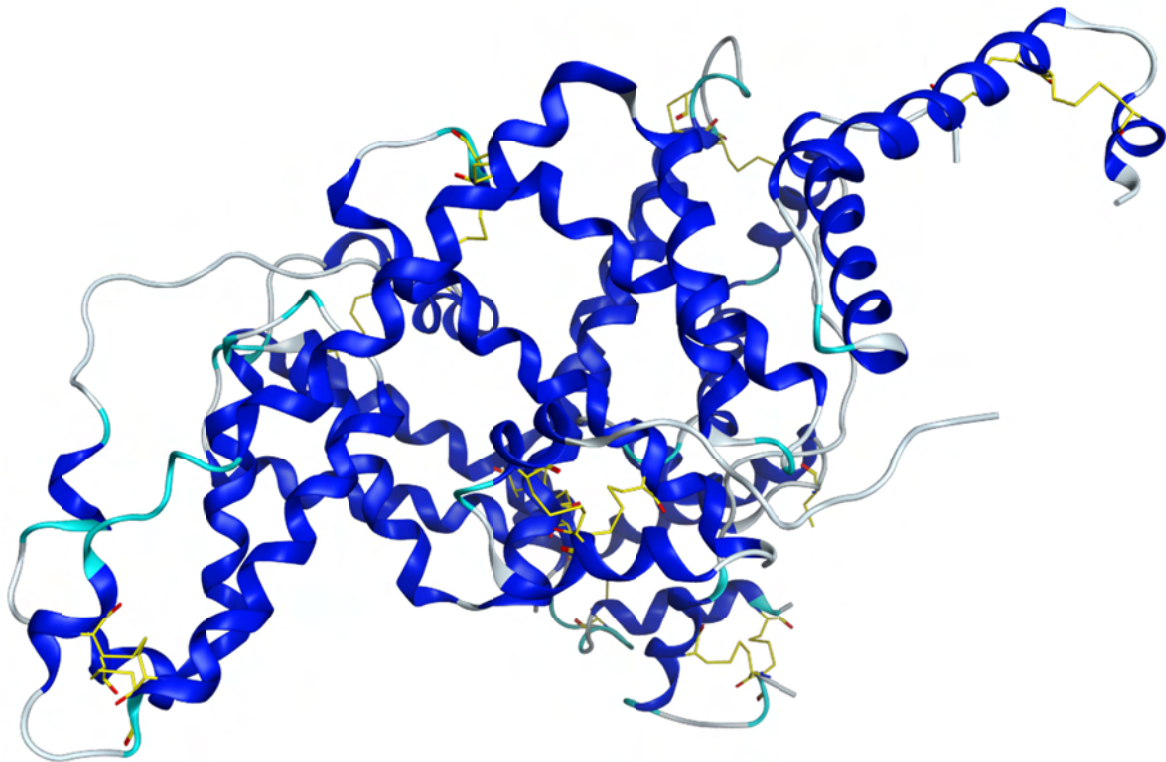


Abbildung 19: HSA Struktur und Sequenz. Cystein ist in der Struktur und der Sequenz gelb hervorgehoben oder markiert. Aufgenommen mit Molecular Operating Environment (MOE) 2014.09 von Chemical Computing Group Inc. Quelle der Struktur: Protein Data Bank (PDB Proteinnummer 4S1Y); Abbildung erstellt mit Unterstützung von Alessia Gilardi

Allerdings zeigt der Vergleich der blauen und grünen Kurve in Abbildung 17, dass die Aminokopplung wesentlich effektiver ist: Während die Thiolkopplung lediglich über ein Aminosäurerest funktioniert (Cys), hat das Protein über die Aminokopplung vier Aminosäurereste (Arg, Asn, Gln, Lys) als mögliche Bindungspartner mit der Dextranmatrix des Sensors. Darüber hinaus wird bei der Aminokopplung der Sensor mit EDC und NHS aktiviert, was die Dextranoberfläche gegenüber dem Liganden wesentlich reaktiver macht.

Die maximale Beladung des Sensors ist nicht immer die höchste Priorität. Sie ist wichtig, wenn bspw. kleine Verbindungen auf einem Protein mit der Fragestellung getestet werden, ob die Verbindung überhaupt binden oder nicht. Hier ist die Höhe des Signals gegenüber dem Hintergrund interessant. Das Signal ist stärker, wenn die Sensoroberfläche mit dem Protein gesättigt ist. Wenn jedoch die Messung der Kinetik oder der Affinität von Substanzen im Fokus steht, ist eine schwache bis mittelmäßige Beladung des Sensors besser, um nicht das Problem der Massentransportlimitierung berücksichtigen zu müssen. Wenn man sich nun die konzentrationsabhängige Maximalbeladung der Thiolkopplung bei HSA anschaut (Abbildung 17), stellt man fest, dass in dem Bereich zwischen 3 µg/ml und 12 µg/ml ein fast linearer Zusammenhang besteht, wobei die Steigung gegenüber dem Verlauf der Aminokopplung moderat ist. Dieses lässt im Fall von HSA eine bessere Kontrolle über die Sensorbeladung zu, verglichen mit der Immobilisierung durch die Aminokopplung.

Ein weiterer bereits erwähnter Vorteil der Thiolkopplung ist die Selektivität der Ausrichtung des Proteins auf der Sensoroberfläche.

Abbildung 18 zeigt den Injektionsverlauf von HSA während der Immobilisierung. Der Verlauf ist ähnlich dem bei der Aminokopplung. Die Kurven haben auch hier eher einen linear als exponentiell anmutenden Verlauf und auch hier wird kaum unspezifisch gebundenes Protein ausgewaschen, was möglicherweise mit einander zusammenhängt. Der Signalsprung nach der Injektion ist gerätebedingt und ist lediglich die Normalisierung des Signalabfalls beim Start der Injektion.

3.3 Molekülinteraktion - groß mit groß

Die Analyse der Interaktion von großen Molekülen mit großen Molekülen wird mit Anti-HSA Antikörpern, auf mit Aminokopplung immobilisierten HSA, durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die Injektionen der unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers auf dem Kanal 1 mit der HSA-Beladung von 7500 RU (oben links und rechts) und Kanal 4 mit der Beladung von 1600 RU (unten links und rechts). Links oben und unten sind die mit AnalyserR2 und rechts oben und unten die mit Prism angepasste Kurven. Die durch die kin. Kurvenanpassung generierte Kurven sind

schwarz. Es fällt auf, dass die auf dem Kanal 1 aufgenommenen Kurven weder von AnalyserR2 noch von Prism gut angepasst werden. Die von den beiden Programmen ermittelten K_D -Werte unterscheiden sich. Während AnalyserR2 einen Wert von ca. 6 nM ermittelt, ermittelt Prism einen Wert von 43 nM.

Die Kurven des gleichen Tests bei einer geringeren Beladung des Sensors (unten links und rechts) werden von beiden Analyseprogrammen besser angepasst. Der mit dem AnalyserR2 ermittelte K_D ist jedoch negativ.

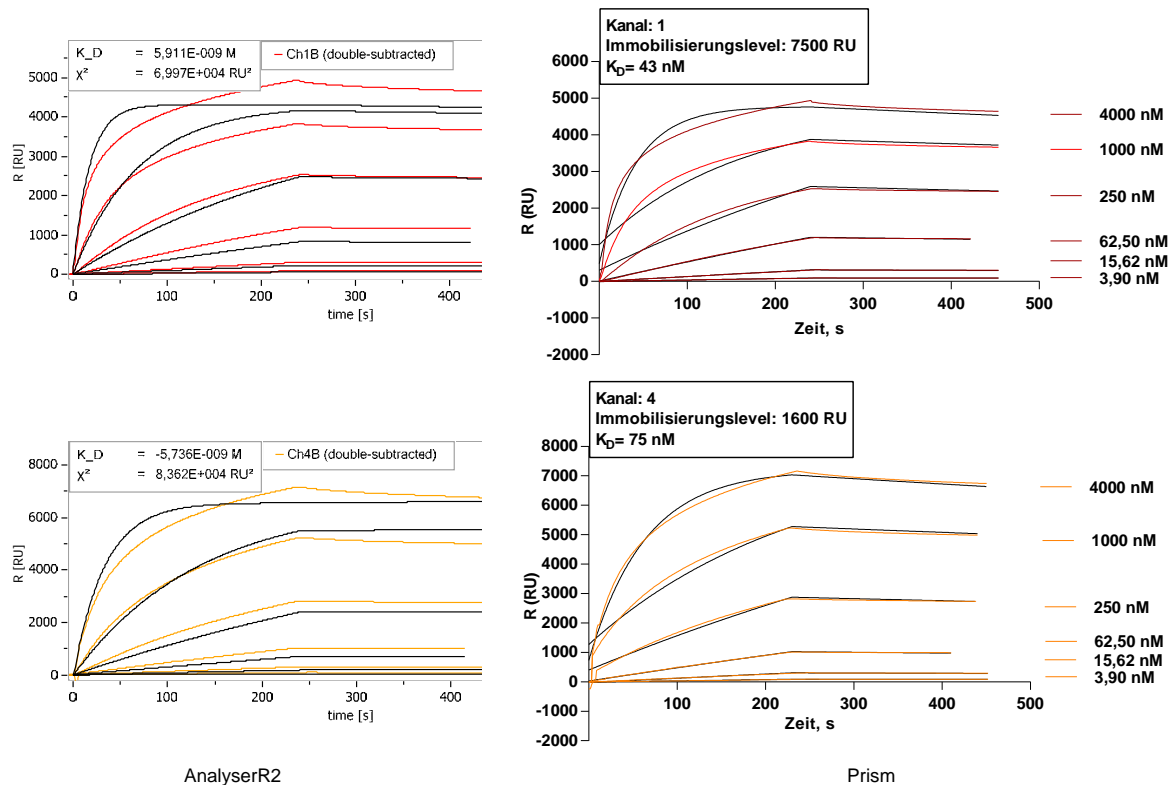


Abbildung 20: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Bindungschemie: Aminokopplung; Links oben und unten: Kin. Kurvenanpassung der Daten mit AnalyserR2; Rechts oben und unten: Kin. Kurvenanpassung der gleichen Daten mit Prism. Oben links und rechts: Kanal 1 mit einem Immobilisierungslevel von 7500 RU (Sättigung); Unten links und rechts: Kanal 4 mit einem Immobilisierungslevel von 1600 RU; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} ="Shared value for all data sets"; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch AnalyserR2: im Report Point Table Menü wurde bei „Reference“ auf „InjectionStart“ und „Type“ auf „PostInjectionStart“ gesetzt.

Die Abbildung 21 zeigt den gleichen Versuch wie Abbildung 20, mit den Unterschieden, dass HSA mit Thiolkopplung immobilisiert wurde und die Antikörperkonzentration von 4000 nM aufgrund von Blasenbildung bei der Injektion für die Auswertung nicht verwendet werden konnte. Die mit Prism durchgeführte Kurvenanpassung unterscheidet sich kaum von den gemessenen Daten. Die

Anpassung durch AnalyserR2 führt zu besseren Ergebnissen als in Abbildung 20, der K_D -Wert ist jedoch auch hier negativ.

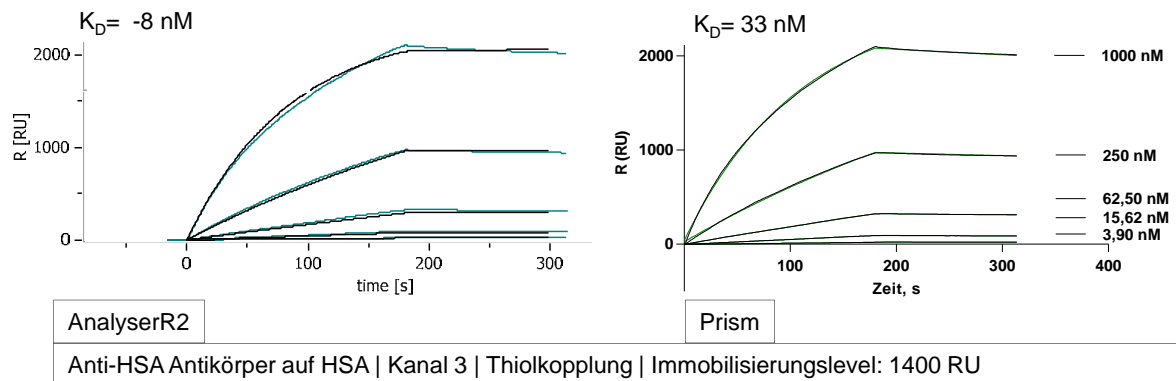


Abbildung 21: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Bindungschemie: Thiolkopplung; Links: Kin. Kurvenanpassung der Daten mit AnalyserR2; Rechts: Kin. Kurvenanpassung der gleichen Daten mit Prism. Kanal 3 mit einem Immobilisierungslevel 1400 RU; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} ="Shared value for all data sets"; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch AnalyserR2: im Report Point Table Menü wurde bei „Reference“ auf „InjectionStart“ und „Type“ auf „PostInjectionStartPoint“ gesetzt.

Diskussion

In der Abbildung 20 oben sind die Kurvenanpassungen weder von Prism noch von AnalyserR2 befriedigend. Der Unterschied dieser Graphen zu den besser angepassten in der Abbildung 20 unten ist, dass die oberen Graphen auf einem Sensor entstanden sind, der ca. das 4,5 fache der Proteinmenge besitzt. Es scheint, dass hier eine Massentransportlimitierung eingetreten ist, obwohl die maximal mögliche Flussrate von 50 μ l/min bei der Antikörperinjektion gewählt wurde. Den Hinweis auf Massentransportlimitierung birgt die Betrachtung der Vergrößerung der Abbildung 20 rechts oben (Abbildung 22):

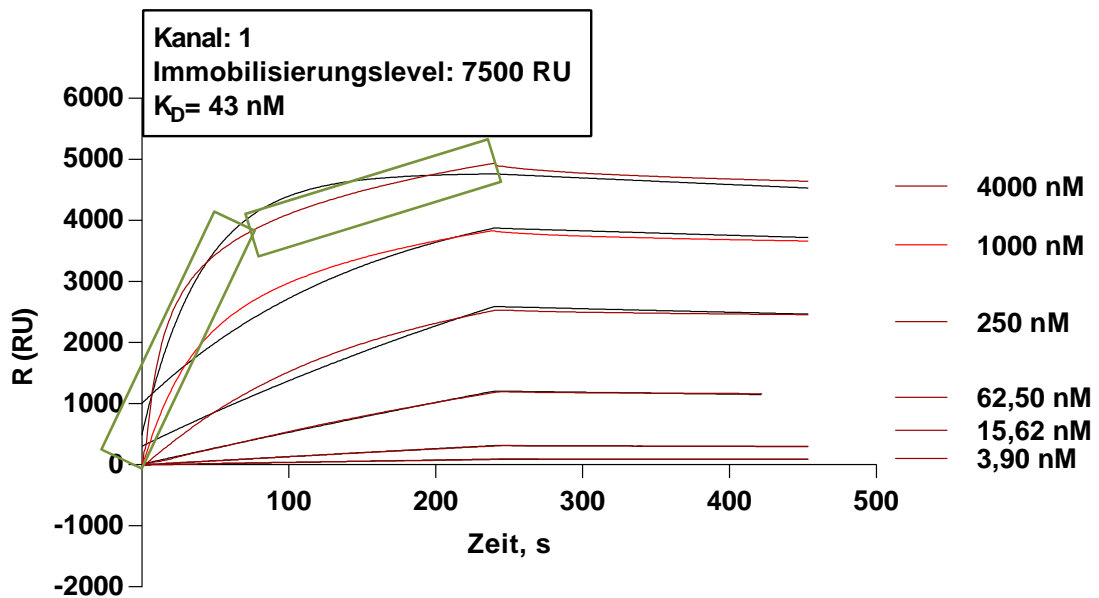


Abbildung 22: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Detailansicht; Bindungschemie: Aminokopplung; Flussrate 50 $\mu\text{l}/\text{min}$; Kin. Kurvenanpassung der Daten mit Prism; Immobilisierungslevel: 7500 RU (Sättigung); Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} ="Shared value for all data sets".

Die zwei grünen Rechtecke schließen in etwa die zwei Bereiche ein, die typischerweise bei einer Massentransportlimitierung auftreten und unterschiedliche Assoziationskonstanten haben (Fischer, 2010). Die Einteilung in diese zwei Phasen wird deutlich, wenn man in der Abbildung 20 die 4000 nM Kurve oben und unten vergleicht. Die zweite Phase der Assoziation (70 s bis 230 s) scheint in der Oberen Abbildung fast ins Lineare über zu gehen. Dieses ist wahrscheinlich auch die Erklärung für die Schwierigkeit beider Programme eine Kurvenanpassung durchzuführen.

Da die Flussrate nicht weiter erhöht werden kann, kann hier in Zukunft eine entsprechende Beladung des Sensors Abhilfe schaffen. Abbildung 20 (unterer Teil) zeigt bei reduzierter Beladung der Sensoren deshalb auch eine bessere Kurvenanpassung durch beide Programme.

Die Abbildung 21 rechts zeigt eine nahezu perfekte Kurvenanpassung durch Prism. Da bei allen diesen Versuchen mit polyklonalen Antikörpern gearbeitet wurde, ist ein Vergleich mit Literaturwerten, um diese Beobachtung zu verifizieren, leider nicht möglich. Auch die Anpassung durch Analyser2 sieht auf den ersten Blick akzeptabel aus. Trotzdem ist der K_D -Wert negativ. Dieses Anpassungsproblem mit Analyser2 ist während der Arbeit oft aufgetreten, was der Grund dafür war die Daten parallel mit Prism auszuwerten. Das negative Vorzeichen des K_D -Werts ist

möglicherweise darauf zurück zu führen, dass in der Dissoziationsphase vom Analyseprogramm ein begrenztes Wachstum, statt einem begrenzten Zerfall, zugrunde gelegt wird und k_{off} ein negatives Vorzeichen erhält. Bei der Division von k_{off} durch k_{on} entsteht dadurch ein negativer K_D -Wert.

Dass der Antikörpertest auf dem thiolgekoppelten Sensor im Vergleich zum ähnlich stark beladenen aminogekoppelten Sensor eine wesentlich bessere Kurvenanpassung erlaubt, liegt daran, dass bei der Anpassung des Tests auf dem aminogekoppelten Sensor eine zusätzliche Konzentration von 4000 nM in die Berechnung einbezogen wird. Abbildung 23 zeigt die Anpassung auf dem aminogekoppelten Sensor ohne diese zusätzliche Konzentration. Es zeigt sich, dass die Kurven des Tests auf dem thiolgekoppelten Sensor und die Kurven des Tests auf dem aminogekoppelten Sensor von Prism ähnlich gut vorhergesagt werden (Vergleich Abbildung 21 rechts und Abbildung 23). Das bedeutet, dass in beiden Fällen das 1:1 Bindungsmodell angewandt werden kann. Dieses kann, trotz unterschiedlicher Assoziationszeit und Signalstärke, ein Hinweis darauf sein, dass die Kopplungschemie auf die Bindung von Antikörpern auf HSA keinen wesentlichen Einfluss hat.

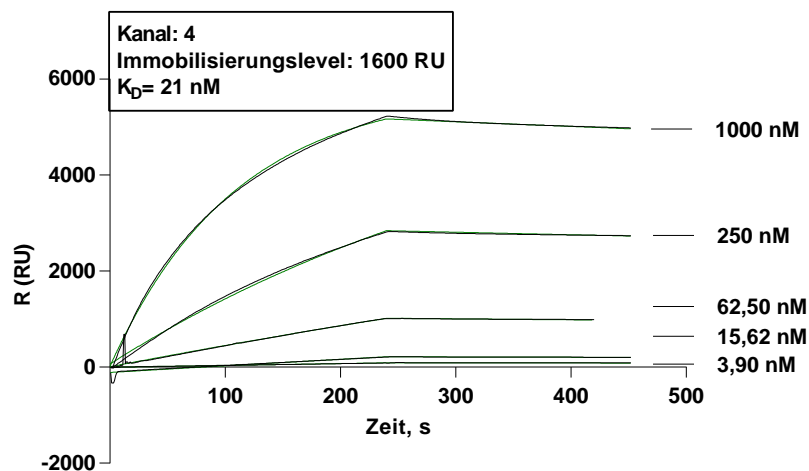


Abbildung 23: Anti-HSA Antikörper auf HSA; Kin. Kurvenanpassung ohne Berücksichtigung der 4000 nM Kurve; Bindungschemie: Aminokopplung; Flussrate 50 $\mu\text{l}/\text{min}$; Kin. Kurvenanpassung mit Prism; Immobilisierungslevel: 1600 RU; Analyseparameter für kin. Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} ="Shared value for all data sets".

Die beiden durch Prism ermittelten K_D -Werte in den zwei Versuchen, mit ähnlicher Sensorbeladung aber unterschiedlichen Kopplungschemie, liegen zwar in der gleichen Größenordnung (33 nM und 21 nM) sie sind aber dennoch, trotz guter kin. Kurvenanpassung, recht weit voneinander entfernt. Möglicherweise ist die

Dissoziationszeit zu kurz um stabile k_{off} -Werte zu ermitteln und daraus ähnliche K_D -Werte zu berechnen, denn verglichen mit der Assoziation ist die Dissoziation sehr langsam. Dieses könnte auch der Grund dafür sein, dass der AnalyserR2 negative K_D -Werte berechnet.

3.4 Molekülinteraktion - groß mit klein

Die Interaktion von kleinen Molekülen mit den Liganden zeichnet sich durch niedrige Signale aus, da relativ wenig Masse pro Bindungsstelle gebunden wird. Aufgrund der geringen Signalstärke kommt das Rauschen deutlicher zur Geltung.

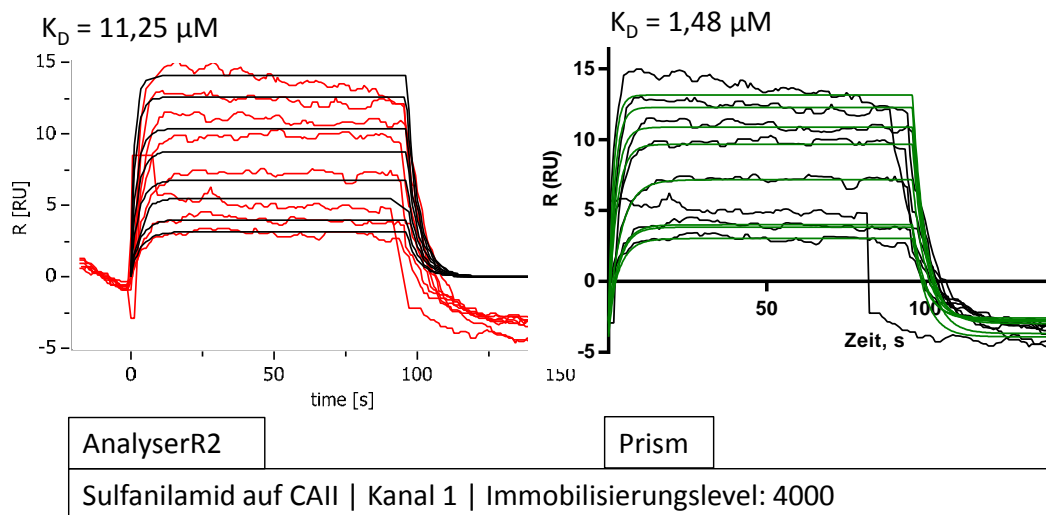


Abbildung 24: Kin. Untersuchung der Bindung von Sulfanilamid auf CAII; es wurde PBS mit 3% DMSO als Laufpuffer verwendet. Nach jeder zweiten Injektion, begonnen mit der geringsten Konzentration, folgte eine Pufferinjektion; Kopplungschemie: Aminokopplung; Immobilisierungslevel: 4000 RU; Links: Kin. Kurvenanpassung durch AnalyserR2, rechts: Kin. Kurvenanpassung durch Prism; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} = "Shared value for all data sets"; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch AnalyserR2: im Report Point Table Menü wurde bei „Reference“ auf „InjectionStart“ und „Type“ auf „PreInjectionStopPoint“ gesetzt.

Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Injektionen von Sulfanilamid auf CAII. Links ist die kin. Kurvenanpassung durch AnalyserR2 und rechts durch Prism. Das Rauschen ist relativ stark, dennoch konnten beide Programme eine Kurvenanpassung durchführen. Die ermittelten K_D sind 11,25 μM (AnalyserR2) und 1,48 μM (Prism). Die Kurvenanpassung durch Prism scheinen die Plateaus der Kurven besser zu treffen und kommt näher an den Literaturwert von $3,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (Papalia et al., 2006). Der Kurvenverlauf in der Abbildung 24 links weist vor der Injektion (zum Zeitpunkt 0) eine negative Steigung auf und die Plateaus während der Injektion sind zum Teil fallend,

was als Drift bezeichnet wird. Dabei ist die Basislinie nicht waagrecht sondern unterliegt einer Steigung (positiver Drift) oder sie fällt (negativer Drift). Ursachen für Drifts können unterschiedlich und geräteabhängig sein. Schwankende Flussrate, Temperaturänderungen oder Verunreinigungen des Gerätes sind mögliche Ursachen.

Abbildung 25 zeigt den Test von Indometacin auf HSA. Durch die Halbierung der Injektionszeit, gegenüber der Messung mit CAII (Abbildung 24), wirkt das Rauschen des Signals etwas schwächer. Die durch Prism angepassten Kurven (grün) gehen auch hier besser durch die Plateaus der gemessenen kurven. Betrachtet man die beiden K_D -Werte von $449 \mu\text{M}$ (AnalyserR2) und $22 \mu\text{M}$ (Prism), trifft Prism auch hier den Literaturwert von $21,3 \mu\text{M}$ (Oy BioNavis Ltd., 2000) besser. Die Basislinie nach der Injektion in Abbildung 25 links scheint unterhalb der Basislinie vor der Injektion zu liegen. Auch diese Entwicklung deutet auf einen Drift hin.

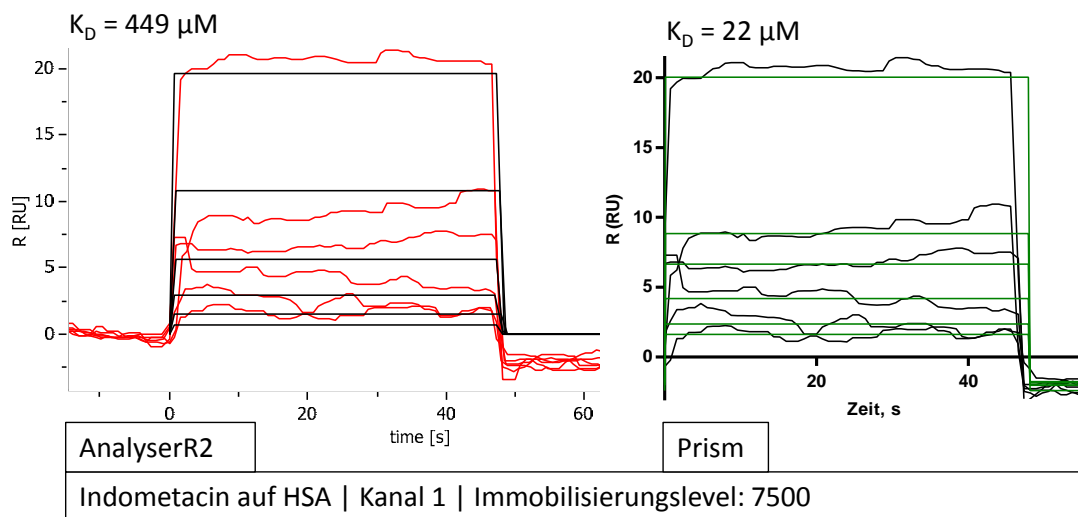


Abbildung 25: Kin. Untersuchung der Bindung von Indometacin auf HSA; Sensorbeladung: 4500 RU; es wurde PBS mit 3% DMSO als Laufpuffer verwendet. Nach jeder zweiten Injektion, begonnen mit der geringsten Konzentration, folgte eine Pufferinjektion; Kopplungschemie: Thiolkopplung; Links: Kin. Kurvenanpassung durch AnalyserR2, rechts: durch Prism; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch Prism: Constrain für k_{on} und k_{off} ="Shared value for all data sets"; Analyseparameter für die Kurvenanpassung durch AnalyserR2: im Report Point Table Menü wurde bei „Reference“ auf „InjectionStart“ und „Type“ auf „PreInjectionStopPoint“ gesetzt.

Diskussion

Der Test von kleinen Molekülen auf CAII und HSA war insofern erfolgreich als dass das Signal eine Stärke erreichte, die eine K_D -Bestimmung möglich machte. Dennoch wird in der verwendeten Literatur für HSA bei einer Beladung von durchschnittlich 2000 pg/mm^2 (entspricht bei Biacore Systeme ca. 2000 RU) ein Signal von etwa 30

RU gemessen, wenn eine Indometacinlösung von 50 μM injiziert wurde (Oy BioNavis Ltd., 2000).

Das Signal auf dem Sensor mit einer ähnlich starken HSA-Beladung (ca. 1400 RU) in diesem Versuch ergab Graphen, die aufgrund der niedrigen Signale und des Drifts nicht ausgewertet werden konnten (Abbildung 26). Deswegen wurde für die Auswertung in diesem Versuch ein Sensor gewählt, dessen Beladung über dem Dreifachen der Literatur (4500 RU) lag. Trotzdem war das Signal bei einer Injektion von 50 μM lediglich 10 RU. Der Grund für das schwache Signal kann nicht abschließend bestimmt werden. Möglicherweise ist ein Aktivitätsverlust des Liganden, durch die Immobilisierung oder andere Versuchsschritte, für die Bindung von wenigen Analyten und damit das schwache Signal verantwortlich.

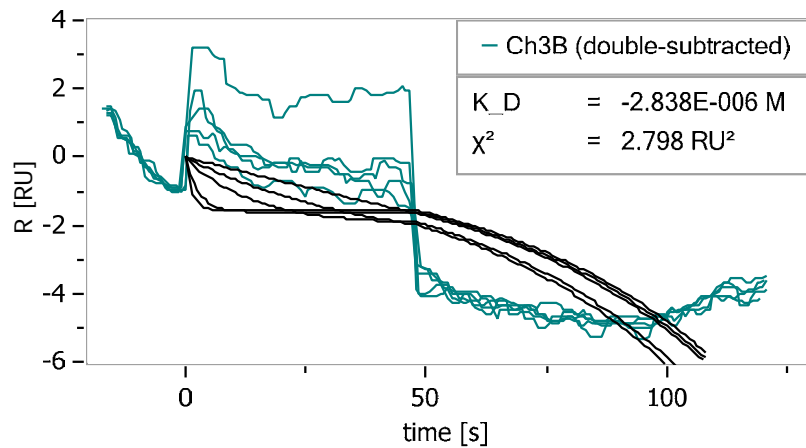


Abbildung 26: Kin. Untersuchung der Bindung von Indometacin auf HSA; Sensorbeladung: 1400 RU; es wurde PBS mit 3% DMSO als Laufpuffer verwendet. Nach jeder zweiten Injektion, begonnen mit der geringsten Konzentration, folgte eine Pufferinjektion; Kopplungschemie: Thiolkopplung; Analyseparameter für die kin. Kurvenanpassung durch AnalyserR2: im Report Point Table Menü wurde bei „Reference“ auf „InjectionStart“ und „Type“ auf „PreInjectionStopPoint“ gesetzt.

Trotz der empfohlenen Pufferinjektionen zwischen jeder zweiten Analytinjektion konnten die Drifts nicht ganz vermieden werden. Vergleicht man Abbildung 25 links mit Abbildung 26, liegt der Schluss nahe, dass der Drift mit Erhöhung der Signalstärke reduziert werden kann. Die Signalstärke lässt sich durch Erhöhung des Immobilisierungslevels steigern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Prism in den beiden Versuchen eine bessere kin. Kurvenanpassung durchgeführt hat, weshalb diese Werte auch den Literaturwerten wesentlich näher waren als die Ergebnisse des AnalyserR2.

Generell gilt aber, dass bei großen Datenmengen, die bei langen Messungen anfallen, die Rechenzeit zum Anpassen der Kurven mit Hilfe von Prism enorm ansteigt. Außerdem müssen die Daten vor dem Bearbeiten mit Prism durch den AnalyserR2 aufbereitet und in Excel sortiert werden. Dennoch ist Prism neben guter Kurvenanpassung auch wesentlich flexibler in der Darstellungsform. Schriftart, Skalierung der Achsen und Beschriftungen lassen sich sehr komfortabel ändern, was die Arbeit erheblich erleichtert.

3.5 Immobilisierung von AcrA

Die Immobilisierung von AcrA wurde mit Thiolkopplung durchgeführt. Dafür wurden, um das Immobilisierungsverhalten zu testen, unterschiedliche Verdünnungen auf die Sensoren gegeben. Abbildung 27 zeigt links die Verdünnungen und rechts die resultierende Beladung der Sensoren.

Kanal	AcrA 1, $\mu\text{g/ml}$	RU nach Inaktivierung ,%	RU absolut
1			
2			
3			
4			
5	50	78	1124
6	25	78	335
7	12,5	21	25
8	6,25	29	10

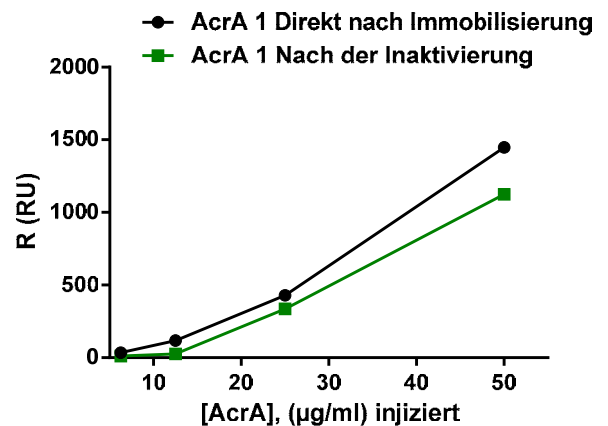


Abbildung 27: Erste Immobilisierung von AcrA; Rechts im Graph ist die Beladung der jeweiligen Spots B der Kanäle direkt nach der Immobilisierung von AcrA (schwarze Kurve) und Inaktivierung (grüne Kurve) mit Thiolkopplung auf High Capacity Amin Sensor des MASS1 dargestellt; Links die injizierte Konzentration mit nach der Inaktivierung verbliebenen RU in % und resultierenden absoluten RU. Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Tabelle links zeigt die unterschiedliche Konzentrationen des Liganden, die auf die entsprechenden Kanäle gegeben wurden und die nach der Inaktivierung verbliebene Proteinmenge.

Ähnlich dem Verhalten von CAII nach der Immobilisierung, kann auch hier das Absinken der RU beobachtet werden (Vergleich schwarzer und grüner Graph in Abbildung 27).

Noch deutlicher wird es, wenn man die Wiederholung des Versuchs betrachtet (Abbildung 28). Hier wurde die injizierte Konzentration noch einmal auf 100 µg/ml erhöht. Während bei injizierten Konzentrationen zwischen 25 und 50 µg/ml nach dem Inaktivierungsschritt ca. 75 % des anfänglich immobilisierten Proteins auf dem Sensor verbleiben, verbleiben bei der Injektion von 100 µg/ml nur ungefähr 60 %.

Kanal	AcrA 2, µg/ml	RU nach Inaktivierung , %	RU absolut
1	100	58	4990
2	100	60	4974
3	50	74	553
4	50	73	505
5	25	72	143
6	25	78	117
7	12,5	34	23
8	12,5	23	12

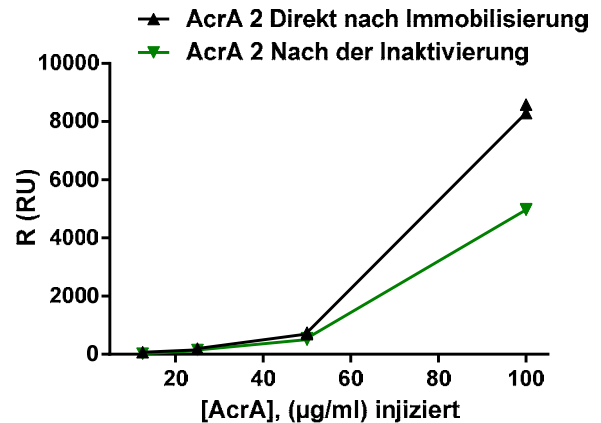


Abbildung 28: Zweite Immobilisierung von AcrA; Rechts im Graph ist die Beladung der jeweiligen Spots B der Kanäle nach der Immobilisierung von AcrA mit Thiolkopplung auf High Capacity Amin Sensor des MASS1 dargestellt. Links die injizierte Konzentration mit nach der Inaktivierung verbliebenen RU in % und resultierenden absoluten RU; Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Tabelle links zeigt die unterschiedliche Konzentrationen des Liganden, die auf die entsprechenden Kanäle gegeben wurden und die nach der Inaktivierung verbliebene Proteinmenge.

Auffällig in beiden Versuchen ist, dass auf den Kanälen der geringen injizierten Proteinkonzentrationen (zwischen 6 µg/ml und 12 µg/ml), nach der Inaktivierung nur noch ca. 30 % des immobilisierten Proteins verbleiben.

Verglichen mit HSA-, BSA- und CAII-Immobilisierungen, ob Thiolkopplung oder Aminokopplung, unterscheidet sich der Injektionsverlauf von AcrA deutlich: Während HSA sowohl über Thiolkopplung als auch über Aminokopplung ein eher lineares und CAII über Aminokopplung ein exponentielles Wachstum zeigten, wenn man den Verlauf vor der Sättigung betrachtete, zeigt AcrA bei geringeren Konzentrationen lineares und bei hohen durchgehen ein eher begrenztes Wachstum (Abbildung 29 und Abbildung 30).

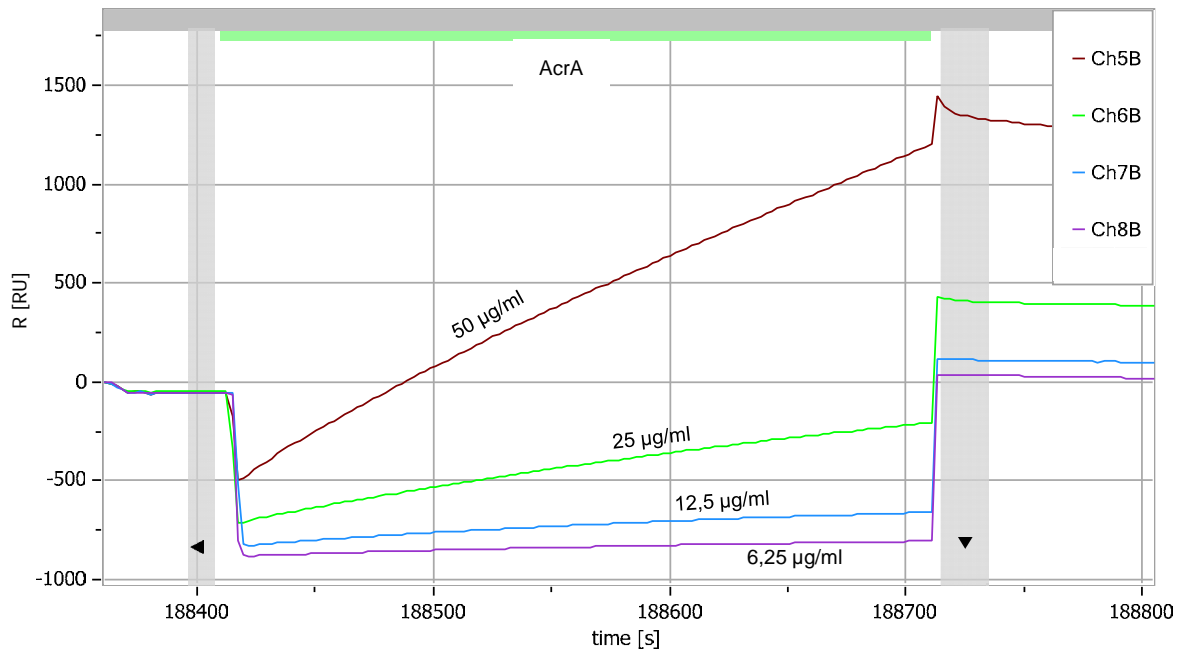


Abbildung 29: Verlauf der ersten Immobilisierung von AcrA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf den Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben; Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B der Kanäle.

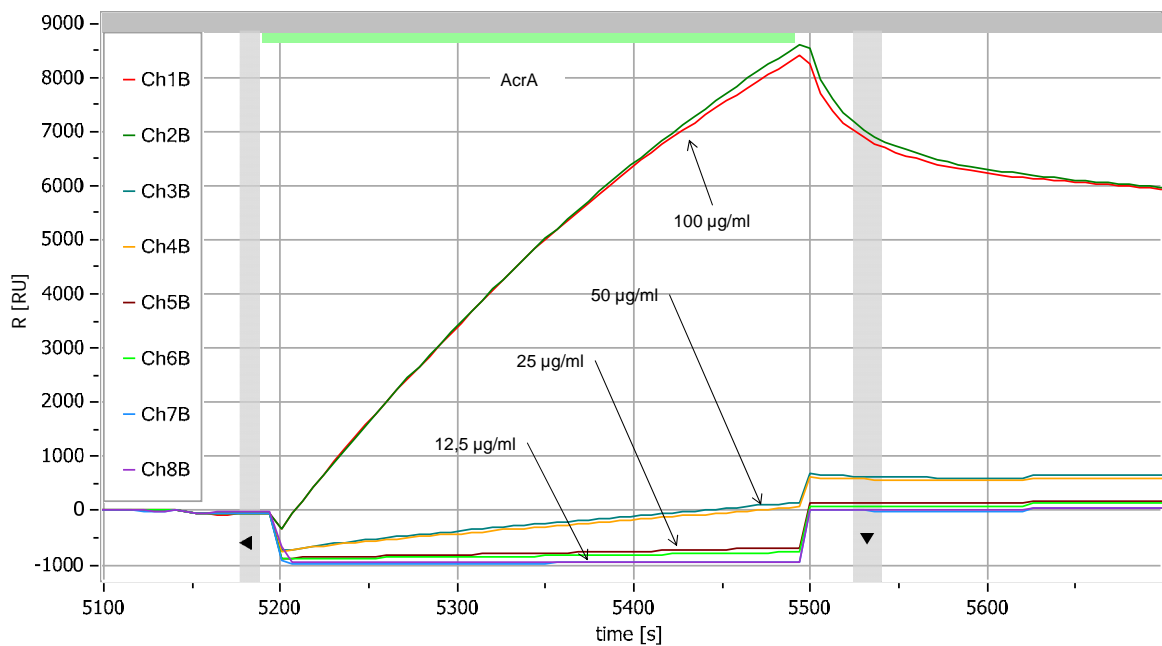


Abbildung 30: Verlauf der zweiten Immobilisierung von AcrA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf Spots A. Inaktiviert wurde mit der Inaktivierungslösung 2. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben; Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B der Kanäle.

Eine weitere Beobachtung bei der Immobilisierung von AcrA ist in der Abbildung 31 dargestellt. Abbildung 31 B zeigt vier Kanäle des Sensors direkt nach der Immobilisierung von AcrA. Zu sehen ist zunächst das immobilisierte Protein auf den Spots B mit abnehmender Intensität von Kanal 1 bis 4, so wie erwartet. Es fallen jedoch Unregelmäßigkeiten über den gesamten Sensor auf. Zum Vergleich: Abbildung 31 A zeigt einen typischen Sensor nach der Immobilisierung (hier: über Thiolkopplung immobilisiertes HSA).

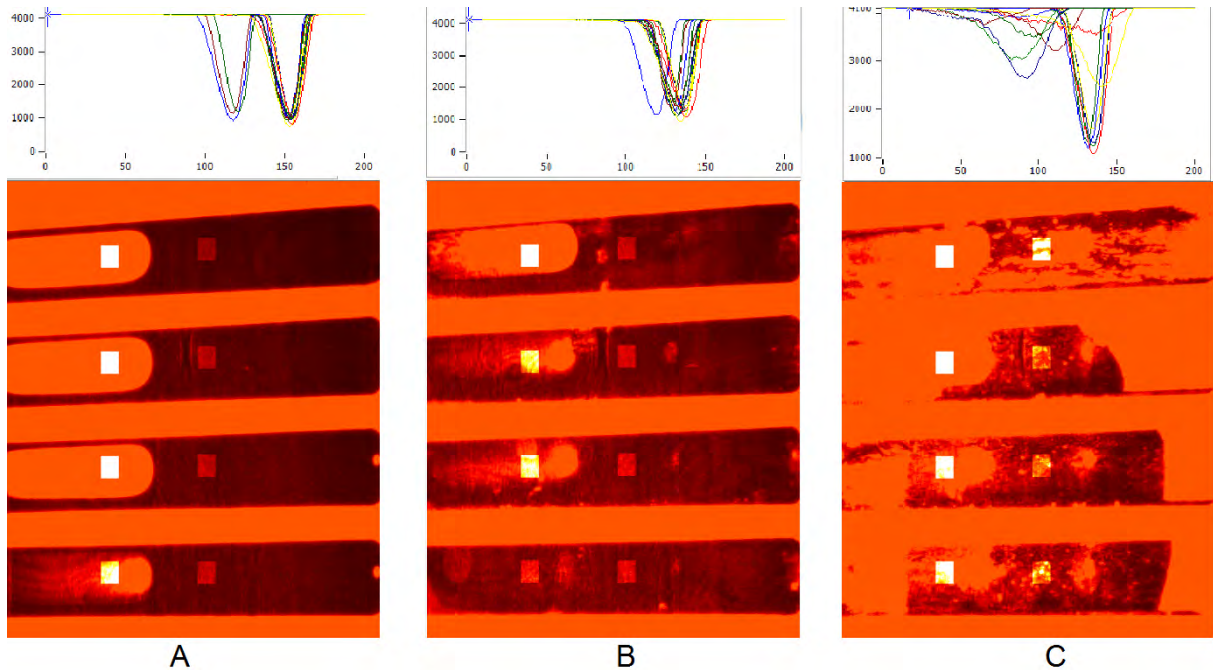


Abbildung 31: Vergleich von zwei Sensoren nach der Immobilisierung von HSA und AcrA; Dargestellt sind die ersten vier Kanäle der Sensoren mit den dazugehörigen Resonanzwinkel. Abbildung B: AcrA immobilisiert mit Thiolkopplung auf den Kanälen 1-4 mit 1124, 335, 25 und 10 RU Beladung des Proteins. Aufnahme ca. 3 Stunden nach der Immobilisierung; Abbildung C: Gleicher Sensor wie in Abbildung B nach 72 Stunden; Abbildung A: Zum Vergleich wird der Sensor mit über Thiolkopplung immobilisierten HSA auf Kanälen 1-4 mit 4536, 1443, 1417, 368 RU Beladung dargestellt.

Noch deutlicher wird die Veränderung des Sensors nach 72 Stunden im Puffer (Abbildung 31 C). Vergleicht man die jeweils dazu gehörenden Resonanzwinkel, stellt man fest, dass ihre Veränderung nach 72 Stunden so stark ist, dass Untersuchungen auf diesem Sensor nicht durchführbar sind.

Diskussion

Das Absinken der RU nach der Inaktivierung ist möglicherweise, wie bei CAII, auf das Dissoziieren der nichtkovalent gebundenen Proteine zurück zu führen. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass AcrA als periplasmatischer Adapter zur Oligomerisation neigt (Hinchliffe et al., 2013). Möglicherweise wurde das Protein

deshalb bereits bei der Injektion als Oligomer immobilisiert. Bei der Inaktivierung dissoziierten die Oligomere möglicherweise, sodass nur noch kovalent gebundene Monomeren verblieben und die RUs sanken bedingt durch diesen Massenverlust.

Warum sich der Verlauf der AcrA-Immobilisierung vom Verlauf anderer Proteine unterscheidet, ist schwer zu deuten.

Der Proteinverlust von bis zu 70% nach der Inaktivierung der leichtbeladenen Kanäle in beiden Versuchen (Kanäle 7 und 8 in den Tabellen der Abbildung 27 und Abbildung 28) deutet auf eine Verunreinigung der Proteinpräparation hin. Nach Diskussionen dieses Problems mit Mitarbeitern, wurde als Grund die mögliche Präsenz von Proteasen vermutet. Weitere Versuche in Gegenwart von Proteaseinhibitoren sollen folgen.

Die Degeneration der Sensoroberfläche stellt jedoch ein wesentlich größeres Problem dar. Auch mit dem Fachpersonal von SierraSensors GmbH wurde bis dato keine Lösung dieses Problems gefunden.

Was die Immobilisierung von AcrA von den anderen Immobilisierungen unterscheidet, ist der Einsatz des Laufpuffers. Aufgrund der Instabilität des Proteins wird MES-Puffer (20 mM) mit 0,05% DDM als Detergenz verwendet. Unter diesen Bedingungen ist das Protein auch bei Raumtemperatur stabil. Die Degeneration des Sensors wurde zum ersten Mal beobachtet, als MES eingesetzt wurde. Da aber MES als ein gängiger Laufpuffer für SPR-Instrumente dokumentiert ist und in vielen Publikationen verwendet wird, bestehen seitens SierraSensors Zweifel daran, dass MES die Degeneration verursachen könnte. Ein weiterer Grund könnte laut SierraSensors in einer möglichen Verunreinigung des Gerätes liegen, die über die Zeit Schäden am Sensor verursacht. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass vor jeder Immobilisierung (außer HSA mit Aminokopplung) das Gerät über eine integrierte Reinigungsroutine mit SDS- und Glycin-Lösungen gespült wurde. Ein weiteres Argument dagegen liefert die Immobilisierung von HSA nach den beiden AcrA Immobilisierungen. Das Gerät wurde davor nicht gereinigt. Und auch nach einer Antikörperuntersuchung auf HSA über Nacht wies der Sensor keine Schäden auf. Das Problem besteht also nur bei der Immobilisierung von AcrA.

Der Vorgang der Thiolkopplung an sich wurde auch mit HSA und CAII getestet. Dabei wurden keine Unregelmäßigkeiten beobachtet, was dagegen spricht, dass die

Kopplungschemie die Ursache der Sensorstörung ist. Außerdem müsste in diesem Fall die Degeneration lediglich in der Nähe der Spots A und B zu sehen sein. Tatsächlich betroffen ist aber der gesamte Sensor. Das spricht wiederum eher dafür, dass etwas im MES-Puffer die Schäden am Sensor verursacht.

Ohne die Lösung des zuletzt genannten Problems ist ein Fortschreiten in den Experimenten nicht sinnvoll. Weitere Versuche, die dieses Problem aufklären sollen, sind geplant. So soll ein sogenannter Super-Clean mit aggressiveren Reagenzien wie Natriumhypochlorid durchgeführt werden. Außerdem soll eine längerfristige Injektion des MES-Puffers über einen Kanal und die Beobachtung der Degeneration auf diesem zeigen, ob das Problem tatsächlich im Puffer liegt oder nicht.

Wenn das Problem gefunden und beseitigt ist, wird erneut AcrA immobilisiert und die Interaktion mit TolC untersucht. Des Weiteren ist eine niedermolekulare Substanz gefunden worden, die die Interaktion der beiden Proteine beeinflussen könnte. Ihre Interaktion mit den beiden Proteinen und der Einfluss auf die AcrA-TolC-Interaktion soll ebenfalls untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Bhattacharya, A., Prajapati, R., Chatterjee, S., & Mukherjee, T. K. (2014). Concentration-Dependent Reversible Self-Oligomerization of Serum Albumins through Intermolecular β - Sheet Formation.
- Fischer, M. J. E. (2010). *Surface Plasmon Resonance. Methods in Molecular Biology* (Vol. 627). <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2>
- Ge, Q., Yamadah, Y., & Zgurskaya, E. (2009). The C-terminal domain of AcrA is essential for the assembly and function of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4365–4371. <http://doi.org/10.1128/JB.00204-09>
- Gedig, E. (2008). Surface chemistry in SPR technology. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance* (pp. 173–220). Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1039/9781847558220-00173>
- Gupta, P., Rai, N., & Gautam, P. (2015). ANTICANCER DRUGS AS POTENTIAL INHIBITORS OF AcrAB-TolC OF MULTIDRUG RESISTANT E.coli: AN IN SILICO MOLECULAR MODELING AND DOCKING STUDY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(1). Retrieved from <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/3767>
- Hinchliffe, P., Symmons, M. F., Hughes, C., & Koronakis, V. (2013). Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annual Review of Microbiology*, 67, 221–42. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155718>
- Kausaite, A., Van Dijk, M., Castrop, J., Ramanaviciene, A., Baltrus, J. P., Acaite, J., & Ramanavicius, A. (2007). Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(1), 57–63. <http://doi.org/10.1002/bmb.22>
- Knoll, W., Kasry, A., Liu, J., Neumann, T., Niu, L., Paulsen, H., & Robelek, R. (2008). Surface Plasmon Fluorescence Techniques for Bioaffinity Studies. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance* (pp. 275–312). Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1039/9781847558220-00275>
- Kooyman, R. O. B. P. H. (2008). Physics of Surface Plasmon Resonance. In *Handbook of SPR* (pp. 15–34). Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1039/9781847558220-00015>
- Mol, N. De, & Fischer, M. (2008). Kinetic and thermodynamic analysis of ligand-receptor interactions: SPR applications in drug development. In *Handbook of Surface Plasmon ...* (pp. 123–172). Utrecht, The Netherlands: Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1039/9781847558220-00123>

- Monolayers, S., & Bergström, A. (2009). *SPR Sensor Surfaces based on Self-Assembled Monolayers*.
- Morona, R., Manning, P. a., & Reeves, P. (1983). Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *153*(2), 693–699.
- Nuzzo, R. G., & Allara, D. L. (1983). Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of American Chemical Society*, *105*(11), 4481–4483. <http://doi.org/10.1021/ja00351a063>
- Oy BioNavis Ltd. (2000). Interactions of small molecular weight drugs with human serum albumin. Retrieved from <http://www.bionavis.com/downloads/application-notes/>
- Papalia, G. a., Leavitt, S., Bynum, M. a., Katsamba, P. S., Wilton, R., Qiu, H., ... Myszka, D. G. (2006). Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. *Analytical Biochemistry*, *359*(1), 94–105. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2006.08.021>
- Patching, S. G. (2014). Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1838*(1 Pt A), 43–55. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.028>
- Tikhonova, E. B., Dastidar, V., Rybenkov, V. V, & Zgurskaya, H. I. (2009). Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16416–16421. <http://doi.org/10.1073/pnas.0906601106>
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., & Zgurskaya, H. I. (2012). Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol.*, *29*(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Vaiana, S. M., Emanuele, a., Palma-Vittorelli, M. B., & Palma, M. U. (2004). Irreversible formation of intermediate BSA oligomers requires and induces conformational changes. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *55*(4), 1053–1062. <http://doi.org/10.1002/prot.20074>

Anhang

In ControlR2 erstellte Methoden

Tabelle 7: Methode zur Konditionierung der Sensoroberfläche vor der Immobilisierung

<i>Befehl</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Injiziertes Volumen, µl</i>	<i>Kontaktzeit, min</i>	<i>Fluss, µl/min</i>	<i>Spot</i>
1	Equilibrierungsschritt (Prime)				
2	Injektion Konditionierungslösung	20	0,5	40	A+B
3	Injektion HCl	20	0,5	40	A+B
4	Injektion Konditionierungslösung	20	0,5	40	A
5	Injektion HCl	20	0,5	40	A
6	Injektion Konditionierungslösung	20	0,5	40	B
7	Injektion HCl	20	0,5	40	B
8	Versetzen in Standby				

Tabelle 8: Methode zur Immobilisierung der Liganden über Aminokopplung

<i>Befehl</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Injiziertes Volumen, µl</i>	<i>Kontaktzeit, min</i>	<i>Fluss, µl/min</i>	<i>Spot</i>
1	Injektion Aktivierungslösung	60	6	10	A+B
2	Injektion Ligandenlösung	50	10	5	B
3	Injektion Inaktivierungslösung	60	6	10	A+B
4	Equilibrierungsschritt (Prime)				
5	Speichern der Daten				
6	Versetzen in Standby				

Tabelle 9: Methode zur Immobilisierung der Liganden über Thiolkopplung

<i>Befehl</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Injiziertes Volumen, µl</i>	<i>Kontaktzeit, min</i>	<i>Fluss, µl/min</i>	<i>Spot</i>
1	Injektion Aktivierungslösung	10	2	5	A+B
2	Injektion Modifizierungslösung	20	4	5	A+B

3	Injektion CAII-, HSA- oder AcrA-Immobilisierungslösung	25	5	5	B
4	Injektion Na Acetat-Puffer	25	5	5	A
5	Injektion Inaktivierungslösung	20	4	5	A+B
6	Equilibrierungsschritt (Prime)				
7	Speichern der Daten				
8	Versetzen in Standby				

Tabelle 10: Methode zum Testen von Acetacolamid und Sulfanilamid auf immobilisierten CAII

Befehl	Bezeichnung	Injiziertes Volumen, μl	Kontaktzeit, min	Fluss, $\mu\text{l}/\text{min}$	Spot
1	Equilibrierungsschritt (Prime)				
2 - 6	Injektion LKL	20	1,6	12,5	A+B
7 - 14	Injektion Acetacolamid	20	1,6	12,5	A+B
15	Equilibrierungsschritt (Prime)				
16 - 23	Injektion Sulfanilamid	20	1,6	12,5	A+B
24	Speichern der Daten				
25	Versetzen in Standby				

Tabelle 11: Methode zum Testen von Indomethacin auf immobilisierten HSA

Befehl	Bezeichnung	Injiziertes Volumen, μl	Kontaktzeit, min	Fluss, $\mu\text{l}/\text{min}$	Spot
1	Equilibrierungsschritt (Prime)				
2 - 6	Injektion LKL	10	1,6	12,5	A+B
7 - 15	3 Wiederholungen: 2 x Injektion Indomethacin 1 x Injektion Laufpuffer 4	10 10	1,6 1,6	12,5 12,5	A+B A+B
16	Injektion LKL	10	1,6	12,5	A+B
17	Speichern der Daten				
18	Versetzen in Standby				

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 12: Reagenzien, Chemikalien und Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>	<i>Lagerung</i>
Acetacolamid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	97582-100MG	-20°C
Amine Coupling Kit II	SierraSensors GmbH, HH, DE	ACK-001-025	-20°C
Anti-HSA Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK	ab2406	4°C
Borat-Puffer (Pierce™ 20X Borate Buffer)	Thermo Fisher Scientific Inc, CA, USA	28341	RT
Carbonic Anhydrase Isozyme II from bovine erythrocytes	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	C2522-5MG	-20°C
DMSO	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE	HN47.1	RT
EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc, CA, USA	15575-020	RT
HEPES	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, DE	9105.4	RT
HSA	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	A3782-100MG	-20°C
High Capacity Amine- SPR Affinity Sensors	SierraSensors GmbH, HH, DE	SPR-AS-HCA- 03	4°C
Indomethacin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	0200000	
L-Cystein	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE		1693.1
MES	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE	4256.2	RT
NaCl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE	HN00.2	RT
Na Acetate Puffer	SierraSensors GmbH, HH, DE	BK-001-030	4°C
PBS	AMRESCO LLC, OH, USA	E703-1L	RT
PDEA Thiol Coupling Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, HH, DE	BR100058	-20°C
Reduzierendes Gel (Pierce™ Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel)	Life Technologies, CA, USA	77712	4°C
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	P2287	RT

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Bestellnummer</i>
TPP Vakuumfilter	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	99500
Versiegelungsfolie (96-well Microtiter Plate Sealers)	BioChromato, Inc, CA, USA	R80.120.00
Mikrotestplatte für Proteinbestimmung	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht, DE	82.1581.001
MICROPLATTE, 96 WELL, PP, U-BODEN	Greiner Bio-One International GmbH	650201

Tabelle 14: Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Multimode reader (EnSpire)	PerkinElmer Inc., MA, USA
Inkubator (I30)	PerkinElmer Inc., MA, USA
Zentrifuge (Megafuge 16 R)	Thermo Scientific
Mikroreaktionsgefäßzentrifuge (Sprout Mini-Centrifuge)	Heathrow Scientific LLC, VH, USA
MASS1	SierraSensors GmbH, HH, DE

Tabelle 15: Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Prism	GraphPad Software, Inc, CA, USA
AnalyserR2	SierraSensors GmbH, HH, DE
ControlR2	SierraSensors GmbH, HH, DE
Molecular Operating Environment	Chemical Computing Group Inc

Abbildungen

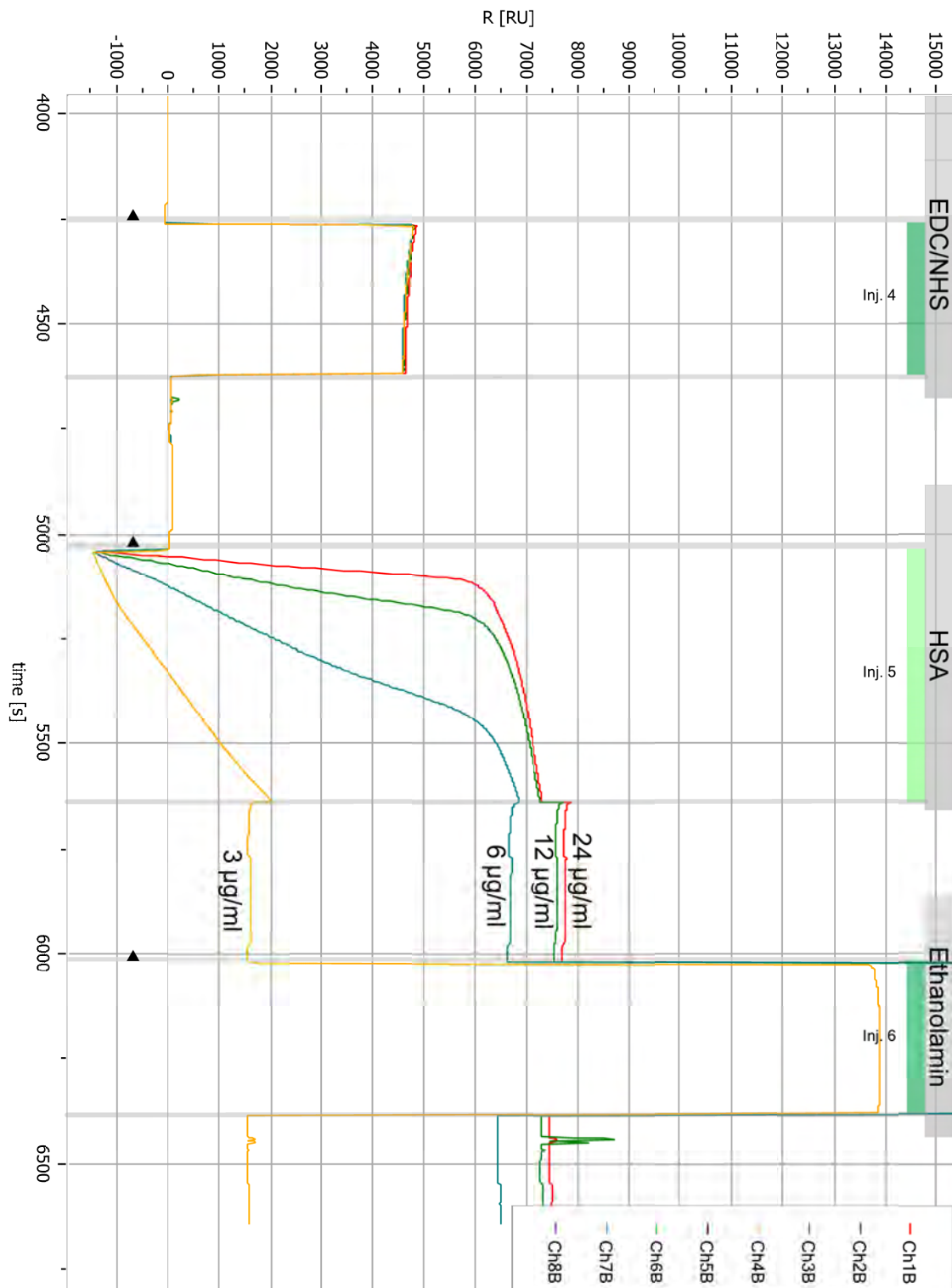


Abbildung 32: Gesamtverlauf der Immobilisierung von HSA mit Aminkopplung auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminkopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die drei Injektionen bei einer Aminkopplung und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B der ersten vier Kanäle.

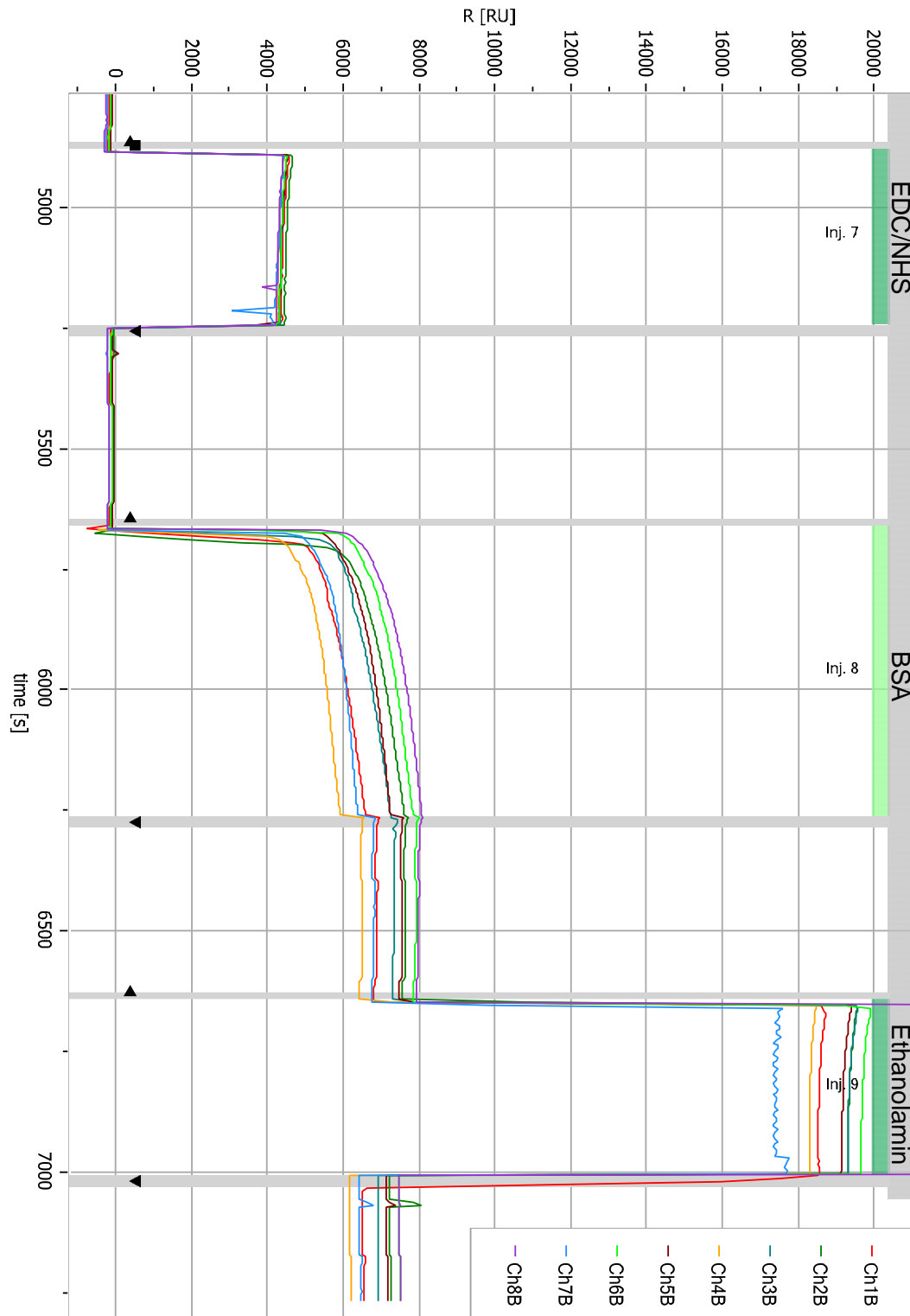


Abbildung 33: Gesamtverlauf der zweiten Immobilisierung von BSA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die drei Injektionen bei einer Aminokopplung und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B aller acht Kanäle.

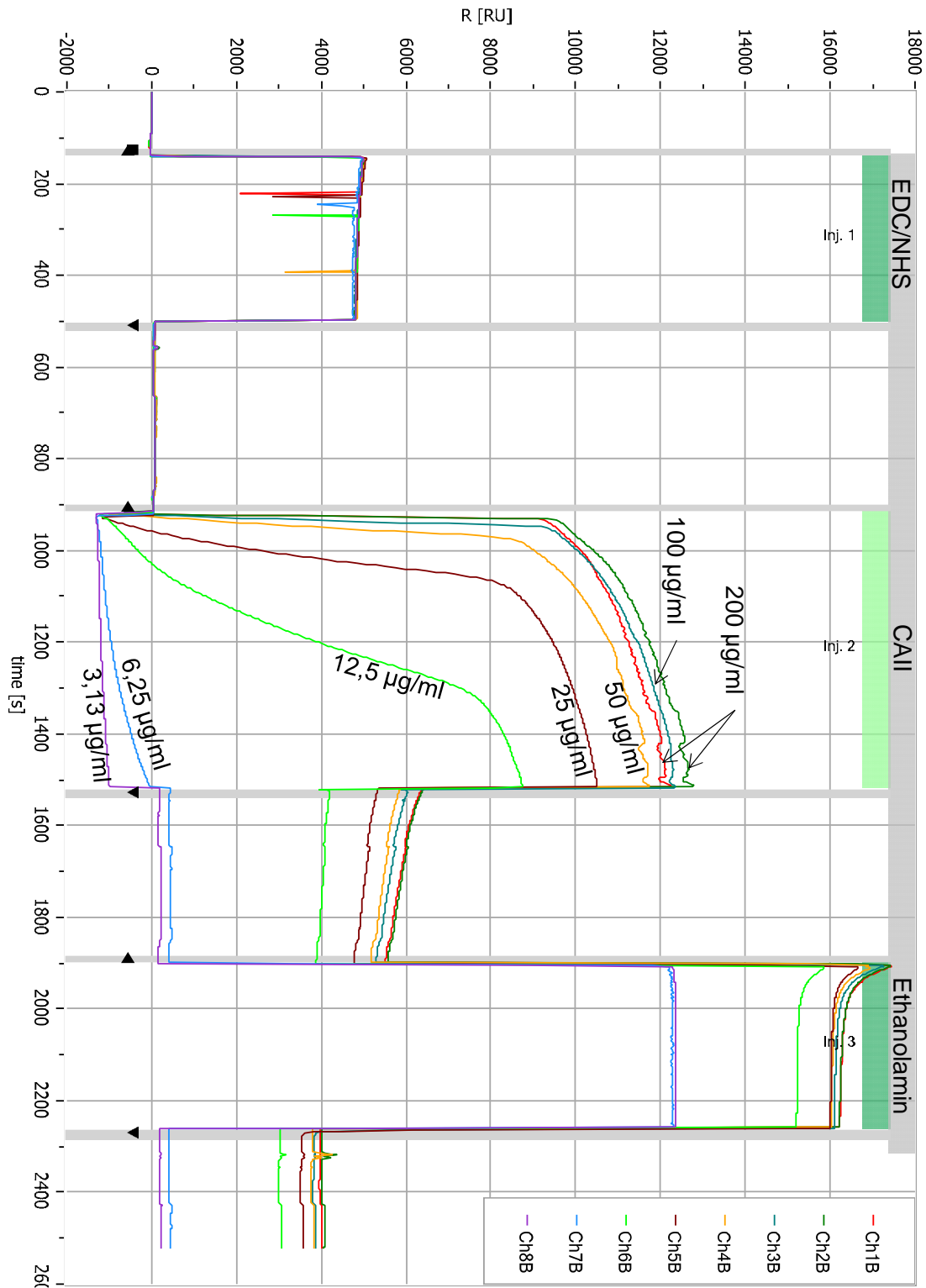


Abbildung 34: Gesamtverlauf der Immobilisierung von CA11 mit Aminokopplung auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Es wurde das Standardprotokoll für Aminokopplung verwendet und unterschiedliche Konzentrationen der Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben (siehe Abbildung 13). Dargestellt sind die drei Injektionen bei einer Aminokopplung und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B aller acht Kanäle.

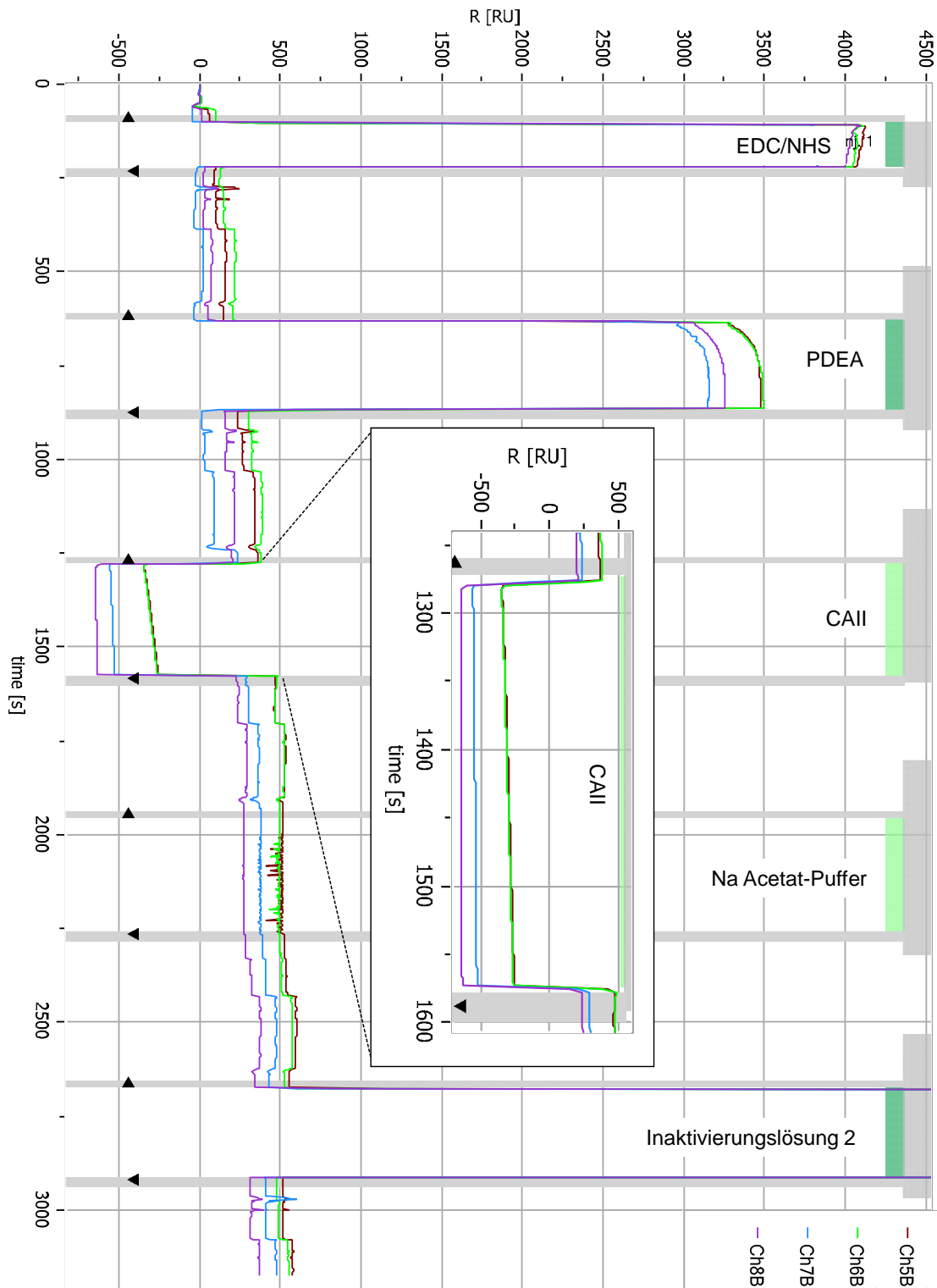


Abbildung 35: Gesamtverlauf der Immobilisierung von CAII mit Thiolkopplung auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Immobilisierungsschemie war Thiolkopplung. Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf die Spots A. Inaktiviert wurde mit einer Cysteinlösung. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die fünf Injektionen und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B aller acht Kanäle.

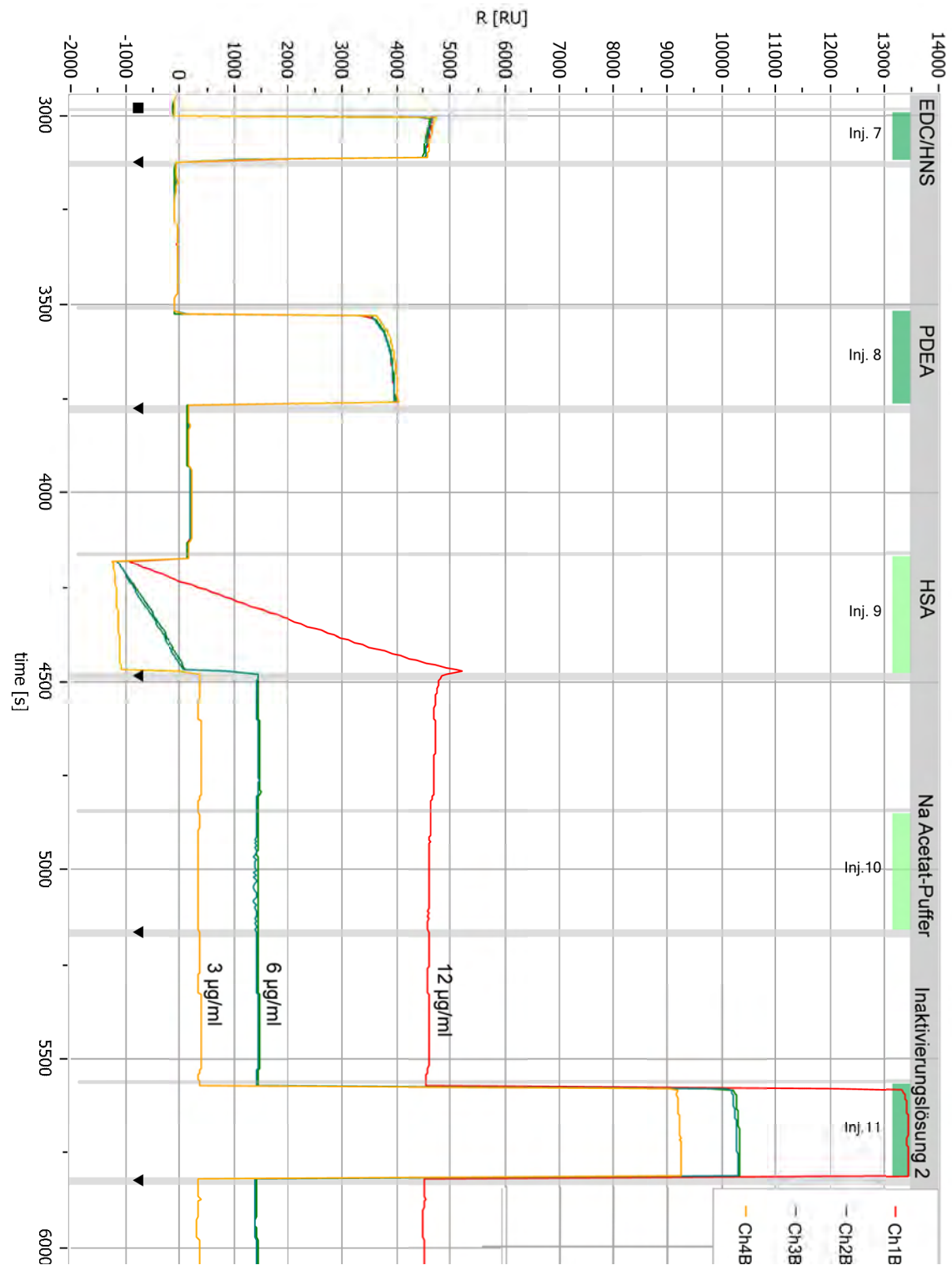


Abbildung 36: Gesamtverlauf der Immobilisierung von HSA mit Thiolkopplung auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf die Spots A. inaktiviert wurde mit einer Cysteinlösung. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die fünf Injektionen und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B aller acht Kanäle.

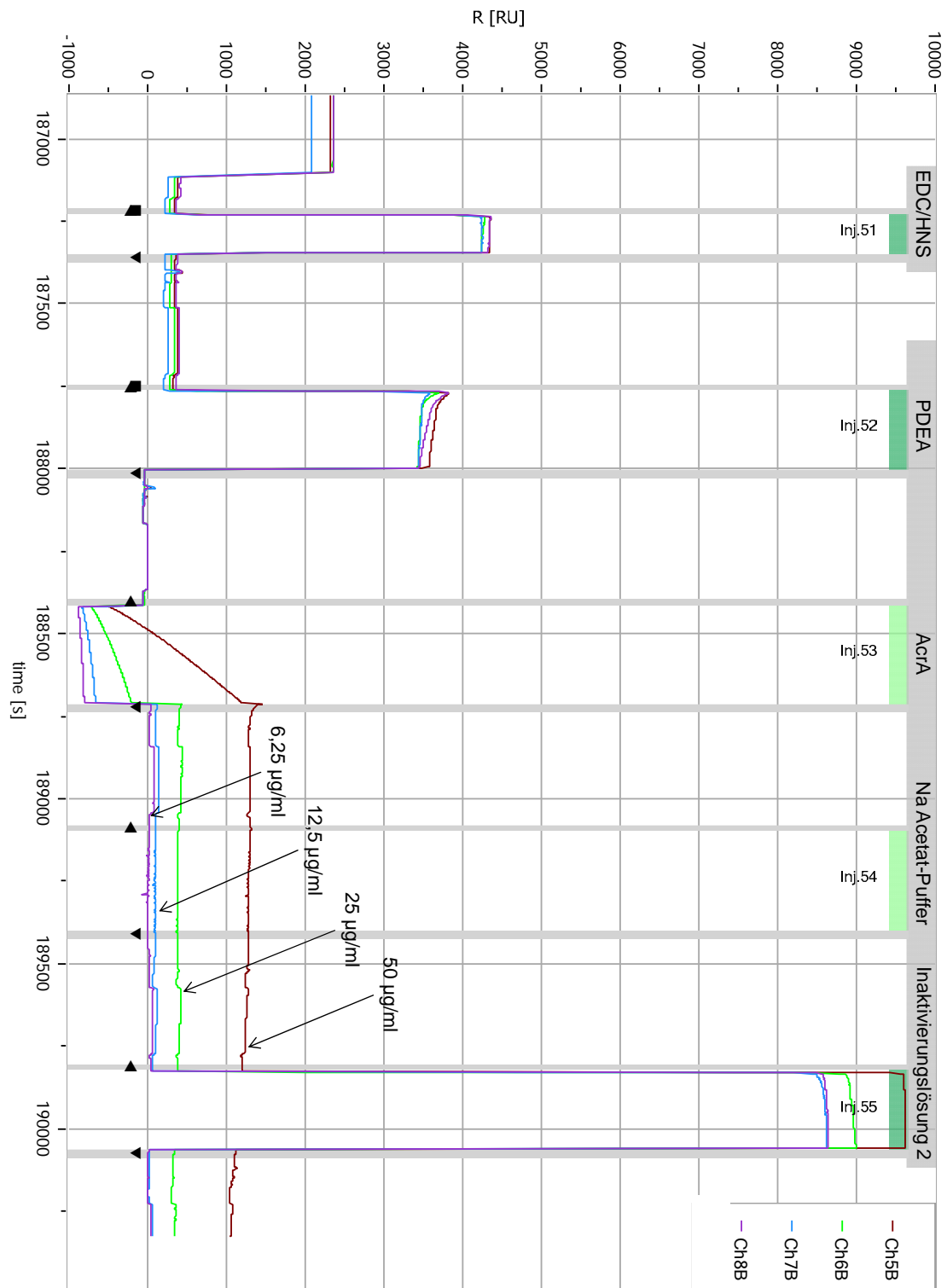


Abbildung 37: Gesamtverlauf der ersten Immobilisierung von AcrA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Immobilisierungsschemie war Thiolkopplung. Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf die Spots A. inaktiviert wurde mit einer Cysteinlösung. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die fünf Injektionen und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B der Kanäle 5-8.

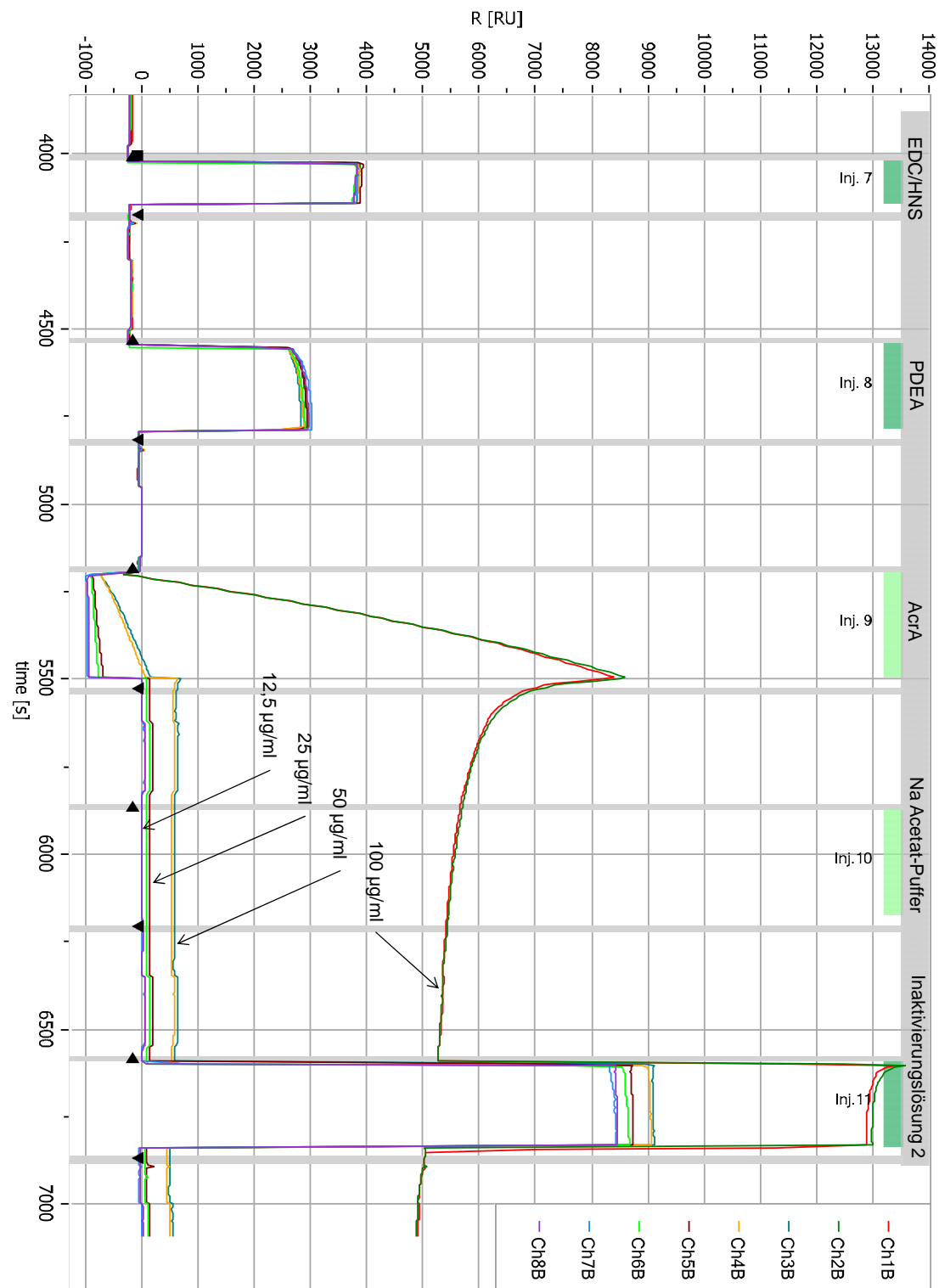


Abbildung 38: Gesamtverlauf der zweiten Immobilisierung von AcrA auf einem High Capacity Amin Sensor des MASS1; Immobilisierungsschemie war Thiolkopplung. Die Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS aktiviert und mit PDEA modifiziert, danach wurde das mit TCEP Disulfide Reducing Gel reduzierte Protein auf den Spots B injiziert und Na Acetat-Puffer auf die Spots A. inaktiviert wurde mit einer Cysteinlösung. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden auf die entsprechenden Kanäle gegeben. Dargestellt sind die fünf Injektionen und die zeitliche Entwicklung der Resonance Units (RU) auf den Spots B aller acht Kanäle.

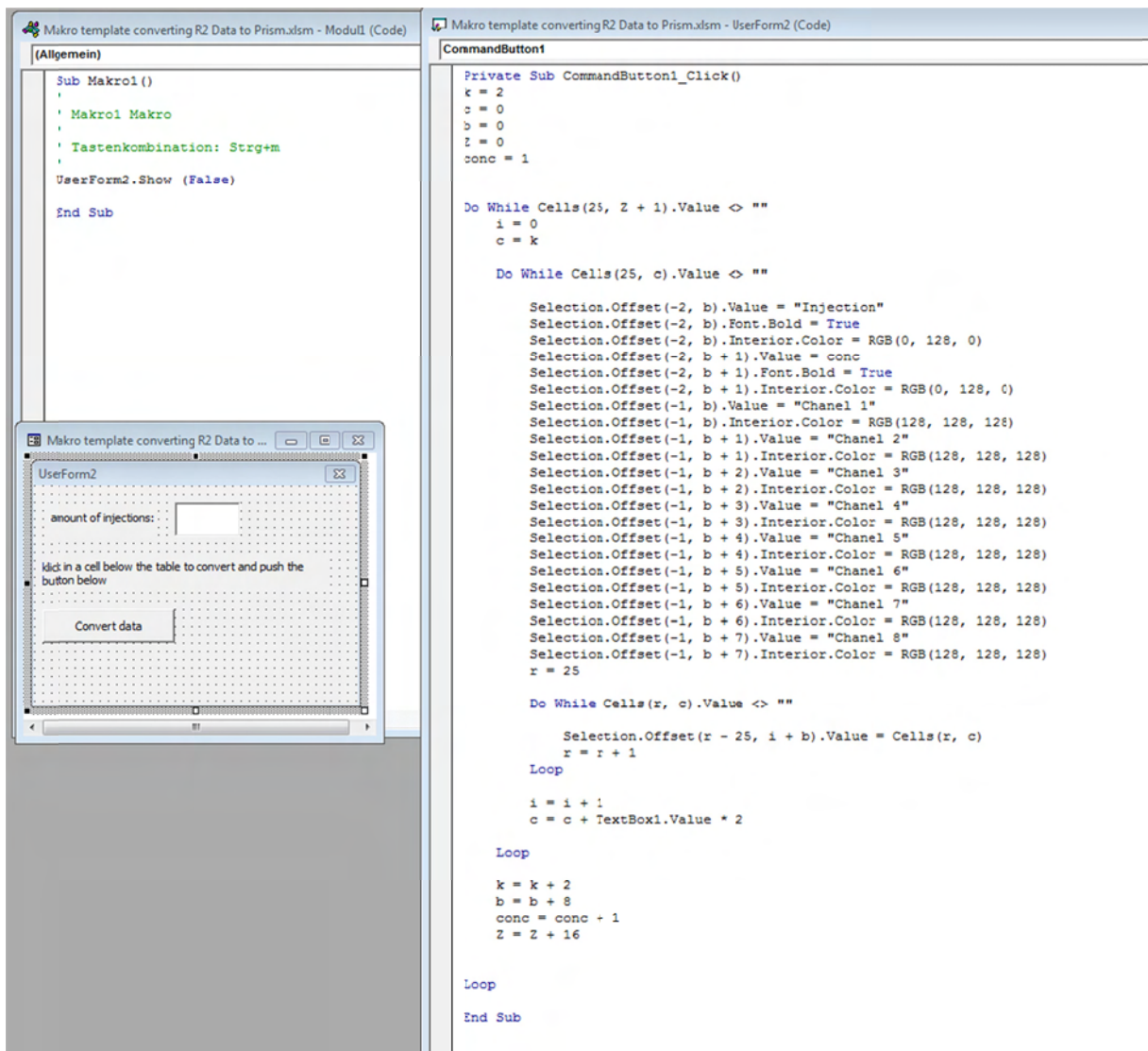


Abbildung 39: Visual Basic Script in Excel zum Sortieren der im AnalyserR2 aufbereiteten Daten.