

Thorsten Fischer: Oberflächen-Plasmon-Resonanz- spektroskopische Studie an verschiedenen Biosensoroberflächen. Charakterisierung von Protein-Peptid und Protein-Lipid Wechselwirkungen. 2000

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) ist eine Technik zur zeitaufgelösten Messung von Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen. Für die Messung ist es nötig, einen Bindungspartner auf der Oberfläche eines Sensorchips zu immobilisieren. Die Messungen werden als Sensorgramme aufgezeichnet. In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Oberflächen ausgetestet worden. Als biologisches Modellsystem für die Untersuchung von Wechselwirkungen diente die Bindung von Calmodulin an ein synthetisches Peptid, das der Aminosäuresequenz der CaM-Bindungsstelle aus der Stickoxidsynthase Typ I entspricht. Für die Bindung von CaM an dieses Peptid NOS-I WT wurden die Ratenkonstanten (k_a, k_d) und die Gleichgewichtskonstante (K_D) mit verschiedenen Auswerteverfahren bestimmt. Die Dissoziationskonstanten, die aus den Sensorgrammen für die verschiedenen Sensorchipoberflächen bestimmt wurden, nahmen mit steigender Immobilisierungsdichte zu. Eine Analyse, der aus den Sensorgrammen bestimmten Ratenkonstanten zeigte, daß mit zunehmender Immobilisierungsdichte besonders k_a stark abnahm. Die Sensorgramme auf den verschiedenen Sensoroberflächen waren bei hoher Immobilisierungsdichte mit einem monoexponentiellen Bindungsmodell nicht mehr zu erklären. Die zeigte sich auch in der abnehmenden Stöchiometrie von Peptid NOS-I WT zu CaM bei zunehmender Immobilisierungsdichte des Peptids. Die beste Übereinstimmung mit den Literaturwerten wurde auf einer Dextranoberfläche bei sehr geringer Immobilisierungsdichte ($< 5.8 \text{ fmol/mm}^2$) an Peptid (NOS-I WT) erreicht (K_D -Werte von 0.8 - 3.9 nM). Weiterhin wurden Sensorchips mit hydrophoben Oberflächen hergestellt, um Heterodoppelschichten oder Phospholipiddoppelschichten aufzubauen. Diese Sensorchips wurden eingesetzt, um die Ca^{2+} -abhängige Membranassoziation des Ca^{2+} -Bindungsproteins Recoverin zu untersuchen. Eine N-terminale Myristoylgruppe verankert Recoverin bei hohen Calciumkonzentrationen in der Membran. Es wurden Mutanten von Recoverin untersucht, deren Affinität für Ca^{2+} -Ionen im Vergleich zum Wildtyp verändert waren. Alle Recoverinformen (nativ, rekombinant myristoyliert (WT), EF+4, EF-3, EF-2) zeigen eine Bindung an die hydrophobe Sensorchipoberfläche in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen, allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten (EC_{50} : natives Recoverin = 18 μM ; WT = 5 μM ; EF+4 = 29 μM ; EF-3 = 8 μM ; EF-2 = 9 μM). Interessanterweise konnte auch eine Bindung an die Phospholipidschicht in der Abwesenheit von Ca^{2+} detektiert werden, die aber mit deutlich geringerer Amplitude erfolgte.

Surface plasmon resonance spectroscopy (SPR spectroscopy) is a technique for the time-resolved measurement of interactions between macromolecules. For these measurements, it is necessary to immobilize a binding partner on the surface of a sensor chip. The measurements are recorded as sensorgrams. In the present study, different surfaces were tested. The biological model system for the investigation of the interactions was the binding of calmodulin to a synthetic peptide which corresponds to the amino-acid sequence of the CaM binding site from the type-I nitrogen oxide synthase. For binding CaM to this peptide, NOS-I WT, the rate constants (k_a, k_d) and the equilibrium constants (K_D) were determined by different evaluation methods. The dissociation constants determined from the sensorgrams for the different sensor chip surfaces increased with rising immobilization density. An analysis of the rate constants determined from the sensorgrams showed that especially k_a decreased substantially with increasing immobilization density. The sensorgrams on the different sensor surfaces could no longer explained by a monoexponential bondmodel at high immobilization density. This was also reflected in the decreasing stoichiometry of peptide NOS-I WT for CaM at increasing immobilization density of the peptide. The best agreement with the literature values achieved on a dextran surface at very low immobilization density ($< 5.8 \text{ fmol/mm}^2$) on peptide NOS-I WT (K_D values of 0.8 - 3.9 nM). Furthermore, sensor chips with hydrophobic surfaces were

produced to build up heterobilayers or phospholipid bilayers. The sensor chips were used to investigate the Ca^{2+} -dependent membrane association of the Ca^{2+} binding protein recoverin. An N-terminal myristoyl group anchors recoverin at high calcium concentrations in the membrane. Mutants of recoverin were examined, whose affinities for Ca^{2+} ions were modified in comparison to the wild type. All forms of recoverin (native, recombinantly myristoylated (WT), EF+4, EF-3, EF-2) show a bond to the hydrophobic sensor chip surface in the presence of Ca^{2+} ions, although with different affinities (EC_{50} : native recoverin = 18 μM ; WT = 5 μM ; EF+4 = 29 μM ; EF-3 = 8 μM ; EF-2 = 9 μM). Interestingly enough, it was also possible to detect a bond to the phospholipid layer in the absence of Ca^{2+} which, however, occurred with a markedly lower amplitude.