

## DIE LABORSEITE

## Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

*Biochemiker forschen daran, chemische Reaktionen in biologischen Systemen aufzuklären. Dafür ist es sehr wichtig, die Bindungskinetiken und -affinitäten verschiedener biologischer Moleküle zu verstehen. Ein äußerst cleveres Verfahren beruht auf einer Aneinanderreihung physikalischer Prozesse an Grenzflächen. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, kurz SPR-Spektroskopie (von engl. surface plasmon resonance) als Methode zur Interaktionsanalyse zwischen Biomolekülen mittels quantenphysikalischer Oberflächenphänomene soll hier im Folgenden vorgestellt werden.*

Oberflächenplasmonen sind Elektronenschwingungen, welche sich parallel zu einer metallischen Oberfläche ausbreiten. Dabei ragen sie in Form von sogenannten evaneszenten Wellen in das umgebende Medium. Das heißt, dass sie exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abklingen (lat. evanescere, „dahinschwinden“), während sie sich parallel dazu weiter ausbreiten [1].

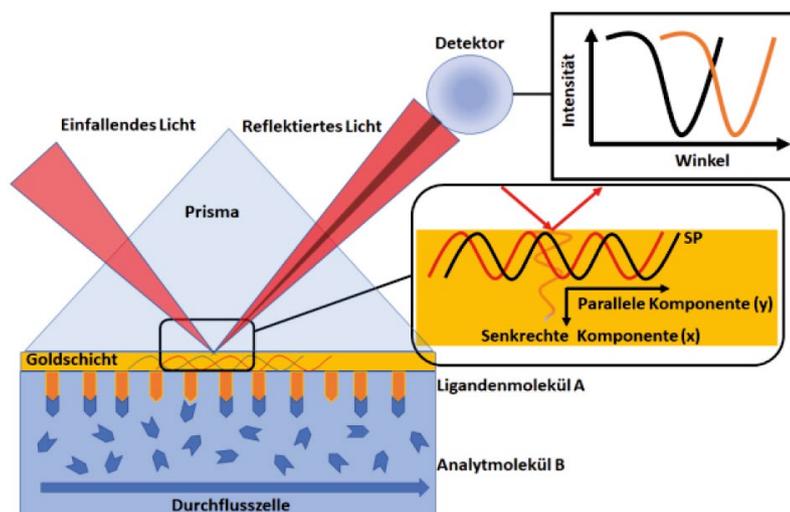
### Totalreflexion und Resonanz

Wenn Licht auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes fällt, dringt ein Teil des Lichts gebrochen in das zweite Medium ein, während der andere Teil des Lichts reflektiert wird. Wird der Winkel des auftretenden Lichts flacher, kommt es – abhängig von den Brechungsindizes der Medien – bei einem bestimmten Winkel zur Totalreflexion: (Fast) das gesamte Licht wird also reflektiert. Licht, welches durch ein Prisma auf eine Metalloberfläche unter einem Winkel der Totalreflexion trifft, dringt als elektromagnetische Welle – exponentiell abfallend – ins Metall ein. Das eindringende elektrische Feld des Lichts kann mit den Leitungselektronen des Metalls koppeln, diese also zur Schwingung anregen. Für den Fall, dass der zur Oberfläche parallele Teil des Felds mit dem der Elektronen übereinstimmt, kommt es zur Resonanz, der sogenannten Oberflächenplasmonenresonanz. Vereinfacht kann

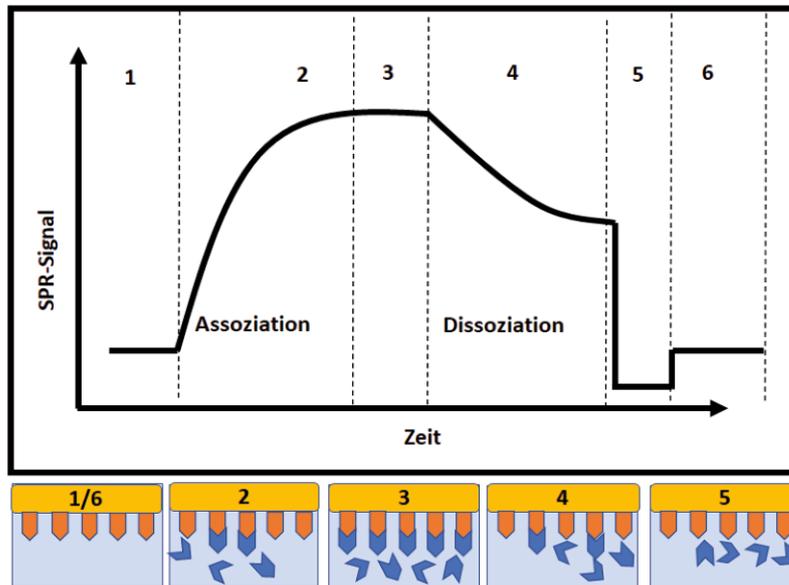
also festgehalten werden, dass nur Licht, das unter einem ganz bestimmten Winkel auf eine Metalloberfläche trifft, die Bedingungen erfüllt, unter denen eine Resonanz der Elektronenschwingung eintritt. Unter dieser Bedingung kommt es zu einem scharfen Intensitätsminimum, einer Art „Schatten“ im reflektierten Licht, da ein Teil der Lichtenergie dafür aufgewendet wurde, die Elektronenschwingung anzuregen. Ein Detektor misst, in welchem Winkel das Intensitätsminimum des reflektierten Lichts auftritt (Abbildung 1).

### Interaktionsanalyse

Wie zuvor erwähnt, hängt der Winkel der Totalreflexion von den Brechungsindizes der Medien ab. Der Brechungsindex eines Mediums ändert sich, wenn die Masse in der Umgebung verändert wird. Damit ist das Puzzle der SPR-Spektroskopie vollständig. In der Praxis werden Moleküle auf der Goldoberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Darüber befindet sich das Prisma, welches angestrahlt wird. Ein Detektor misst winkelabhängig die Intensität des reflektierten Lichts und gibt an, bei welchem Winkel das Intensitätsminimum auftritt. Wenn nun zum Beispiel Antikörper auf dem Chip gebunden sind, tritt das Intensitätsminimum in einem definierten Winkel auf. Durch eine Flusszelle können jetzt verschiedene Antigene im Pufferfluss an den Antikörpern vorbeigeleitet werden. Wenn ein passendes Antigen an die Antikörper bindet, kann die Bindung in Echtzeit detektiert werden: Durch die Massenzunahme an der Chipoberfläche ändert sich der Brechungsindex und mit ihm die Resonanzbedingungen. Folglich tritt das Intensitätsminimum



**ABB. 1** Licht trifft auf die Grenzfläche zwischen dem Prisma und der Goldschicht. Ein Teil des Lichts dringt als evaneszente Welle in die Metallschicht und induziert SPR. Der Detektor misst die winkelaufgelöste Intensität des reflektierten Lichts. Das Intensitätsminimum liegt genau bei dem Winkel, bei welchem es zur SPR kommt (schwarze Kurve). In der Flusszelle unter der Goldschicht sind Ligandenmoleküle A befestigt. Binden interagierende Analytmoleküle B daran, ändert sich der Winkel, bei welchem es zum Intensitätsminimum kommt (orangene Kurve).



**ABB. 2** Abgebildet ist ein typischer Verlauf eines Sensorgramms, in welchem das SPR-Signal gegen die Zeit aufgetragen ist. In Phase 1 liegen nur Ligandenmoleküle (orange) an die Sensoroberfläche gebunden vor. In Phase 2 wird ein Puffer mit den Analytmolekülen B (blau) durchgespült. In diesem Abschnitt des Sensorgramms kann die Assoziation von Ligand und Analyt verfolgt werden. In Phase 3 ist das Gleichgewicht eingetreten, in dem genauso viele Analytmoleküle B an die Liganden A binden wie zeitgleich aus dem Komplex AB dissoziieren – das SPR-Signal bleibt konstant. In Phase 4 wird mit reinem Puffer gespült; die Kurve gibt Aufschluss über die Dissoziation (Zerfall des Komplexes zwischen A und B). Um wieder den Ausgangszustand 6/1 herzustellen, wird mit einem Regenerationspuffer gespült, welcher alle verbleibenden Bindungen zwischen den Molekülen A und B löst.

bei einem anderen Winkel des reflektierten Lichts auf. Die Winkelverschiebung kann in ein sogenanntes Sensorgramm übersetzt werden, indem das SPR-Signal gegen die Zeit aufgetragen wird (Abbildung 2). Die Methode ist äußerst sensitiv und eignet sich somit zur Interaktionsanalyse einzelner Biomoleküle.

### Anwendungen

Die hohe Sensivität der SPR-Spektroskopie erlaubt die Untersuchung vieler biologischer Interaktionen wie Protein-Protein-, Protein-Nukleotid- und Protein-DNA-Interaktionen, aber auch der Interaktion zwischen Proteinen und niedermolekularen Verbindungen (engl. small molecules).

Neben den Antikörper-Antigen-Interaktionen lassen sich also viele weitere biologische relevante Systeme studieren. In der pharmazeutischen Industrie wird die SPR-Spektroskopie daher als eine der Schlüsselmethoden zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Wirkstoffe eingesetzt. Auch in der Grundlagenforschung gilt die SPR-Spektroskopie als Goldstandard der Interaktionsanalyse. So wird in der Abteilung Biochemie der Universität Kassel mit Hilfe der SPR-Spektroskopie beispielsweise intensiv an der Enzymfamilie der Proteinkinasen, ihren Aktivatoren, Inhibitoren und anderen Interaktionspartnern geforscht [2–4]. Auf diese Weise können

Informationen über die Affinitäten und die zugrundeliegenden Reaktionsgeschwindigkeiten gewonnen werden. Des Weiteren kann untersucht werden, inwieweit andere Moleküle, z. B. Cofaktoren wie Adenosintriphosphat (ATP), einen Einfluss auf die Stabilität und die Geschwindigkeit einer Bindung ausüben.

### Ausblick

Die Technik der SPR-Spektroskopie ist ein sehr genaues und breit anwendbares Instrument, um vielerlei Interaktionen zu untersuchen. Es ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren eine Vielzahl an Interaktionsanalysen verschiedenster Stoffe folgen werden, welche weitreichende Erkenntnisse über die Funktion biochemischer Systeme versprechen.

### Literatur

- [1] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos (Eds.), Handbook of Surface Plasmon Resonance, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008, <https://doi.org/10.1039/9781847558220>
- [2] M. J. Knappe et al., Molecular basis for Ser/Thr specificity in PKA signaling. *Cells*, 2020, 9, 1548. <https://doi.org/10.3390/cells9061548>
- [3] J. T. Manschwet et al., A stapled peptide mimic of the pseudosubstrate inhibitor PKI inhibits protein kinase A. *Molecules*, 2019, 24, 1567. <https://doi.org/10.3390/molecules2408156>
- [4] J. A. Byun et al., Mechanism of allosteric inhibition in the Plasmodium falciparum cGMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295, 8480–8491. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013070>

Der Artikel ist mit freundlicher Unterstützung der Abteilung Biochemie an der Universität Kassel entstanden.

*Nico Kubetschek, Bachelorstudent  
Nanostrukturwissenschaften an der  
Universität Kassel,  
Mitglied bei Science Bridge e.V.*