

Wie sich Proteine selbst verraten: Neue Konzepte zum Proteinnachweis

M. Kautt, MIKRO; J. Reichert, W. Hoffmann, M. Strasser, M. Rapp, A. Voigt, K. Länge, IFIA;
K.-F. Weibezahn, E. Gottwald, IMB

Einleitung

In den zurückliegenden 10 Jahren legten die Biowissenschaften ein vorher nur schwer absehbares Entwicklungstempo vor. Den bisherigen Höhepunkt stellt dabei sicher die vollständige Entzifferung, genauer: Sequenzierung, des menschlichen Genoms im Jahre 2000 noch vor dem ursprünglich vorgesehenen Zeitpunkt dar [1]. Die Grundlagen für diese und vergleichbare Leistungen liegen auf technischer Seite insbesondere in der Einführung automatisierter Prozesse und der Bereitstellung neuartiger und leistungsfähiger Untersuchungsmethoden. Neben dem Einzug der Robotik in das biologische Laboratorium lässt sich ein Trend zur Nutzung miniaturisierter Komponenten und Verfahren beobachten. Mit dem großangelegten Einsatz von sogenannten Mikro-Arrays (auch als DNA-, Bio- oder Proteinchips bezeichnet) und zunehmend von mikrofluidischen Analysenchips hat sich die Mikrosystemtechnik als eine der Triebkräfte in der Bio-Analytik erwiesen.

Nachdem so mit dem „Bauplan des Lebens“ eine riesige Informationsquelle eröffnet wurde, richtet sich heute das Interesse auf ein tieferes funktionales Verständnis der in lebenden Organismen ablaufenden Prozesse. Hierbei sind die Proteine in ihrer Ausprägung und Funktion von zentraler Bedeutung. Die entsprechende Forschungsrichtung wird in Analogie zur Genomforschung („Genomics“) als Proteomforschung („Proteomics“) bezeichnet. Unter Proteom versteht man dabei allgemein das quantitative Protein-

muster, das von einer Zelle oder einem Gewebe unter exakt definierten Bedingungen exprimiert wird [2].

Aus Sicht der Mikrosystemtechnik eröffnen sich interessante Wege, neue Werkzeuge für die Proteom- und Proteinanalytik bereitzustellen, weil es nicht einfach möglich ist, die bereits für die Genomforschung entwickelten technischen Ansätze eins zu eins zu übertragen. Dazu unterscheiden sich Proteom und Genom zu sehr. So stehen den rund 30.000 bis 40.000 Genen des Menschen schätzungsweise zwischen 200.000 und 2 Millionen Proteine in jeder Zelle gegenüber. Ihre Zusammensetzung variiert im Gegensatz zum Genom je nach Zelltyp. Sie ist abhängig vom allgemeinen Zustand eines Organismus und wohl auch davon, was man gerade zum Frühstück gegessen hat [3]. Das Proteom zu beschreiben ist damit keine einfache Aufgabe und es soll nicht verschwiegen werden, dass das Proteom – oder zumindest was man in der Analyse sieht – auch davon abhängt, mit welchen Methoden man es betrachtet. Dementsprechend sind insbesondere solche Technologien erforderlich, mit denen das spezifische Auftreten und Verhalten einzelner Proteine in möglichst ungestörter Umgebung nachgewiesen werden können, die eine Proteingesamtheit charakterisieren können und mit denen auch geringste Substanzmengen noch zu handhaben sind. Hier sind besonders markierungsfreie Nachweismethoden in Kombination mit neuen mikrofluidischen und Array-basierten Ansätzen erfolgversprechend.

Der Nachweis von Biomolekülen in mikrotechnischen Analysensystemen – etwa den als „Lab-on-a-chip“ bezeichneten mikrofluidischen Systemen oder in sogenannten „Microarrays“ – erfolgt heute üblicherweise durch laserinduzierte Fluoreszenz (LIF). Die Fluoreszenzdetektion zeichnet sich durch eine enorme Empfindlichkeit und durch eine sehr hohe Selektivität aus. So kann beispielsweise eine Fluorescein-Lösung noch bis zu Konzentrationen von 10^{-12} Mol/L nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass bei Vorliegen einer intrinsischen Fluoreszenz, wenn die Fluoreszenz also eine Eigenschaft des Moleküls ist, die LIF-Detektion ideal ist. Liegt keine native Fluoreszenz vor, existieren zwar eine Reihe von Markierungs- und Derivatisierungsmöglichkeiten, es treten jedoch häufig Probleme mit uneinheitlichen Derivatisierungsprodukten und -ausbeuten auf. Da beispielsweise im Falle eines zu analysierenden Protein- oder DNA-Gemischs die Markierung üblicherweise noch vor einer Trennung des Gemischs erfolgt, die Trennung jedoch auf molekularen Unterschieden der Proteine oder DNA-Sequenzen beruht, kann zusätzlich die Trennung auch durch die Markierung beeinflusst sein. Um dies zu umgehen, sind Nachweismethoden erforderlich, die intrinsische Eigenschaften der Moleküle oder spezifische Wechselwirkungen nutzen. Ziel der am Forschungszentrum verfolgten Entwicklungen ist es, insbesondere die im Vergleich zur DNA wesentlich labileren Proteine in ihrem nativen Zustand nachweisen zu können.

Elektrochemische Detektion von Biomolekülen auf mikrofluidischen Analysenchips

Die elektrochemische Detektion nutzt in Dickschicht- und Dünnschichttechniken hergestellte Metall- oder Graphitelektroden und elektrochemische Reaktionen der zu bestimmenden Analyten hieran aus. Diese Elektroden können als Sensorelemente in Analysenchips integriert und beispielsweise für eine amperometrische Detektion genutzt werden, da viele biologisch relevante Spezies elektroaktiv sind. Parallel dazu können weitere Elektroden zur Erzeugung elektrischer Felder integriert werden, die für elektrokinetischen Transport und elektrophoretische Trennung benötigt werden. Somit eröffnet sich die Möglichkeit, sowohl die Trennung der Analytspezies als auch deren Detektion in nur einer Technologie im Chipformat zu vereinen.

Abb. 1 zeigt das Funktionsmuster eines hybrid aufgebauten Kapillarelektrophorese-Chips mit inte-

grierter elektrochemischer Detektion. Der Chip ist auf einer Substratplatte aus Quarzglas aufgebaut, die Platin- oder Gold-Mikroelektroden enthält, welche mittels Sputtern und lithografischem Lift-off-Prozess hergestellt worden sind. Darauf befindet sich als Deckplatte ein Polymer (Polydimethylsiloxan, PDMS) mit einer einfachen kreuzförmigen Mikrokanalstruktur. Der Querschnitt der Kanäle beträgt $50\ \mu\text{m}$, die Strecken zwischen A und B betragen $8\ \text{mm}$ und zwischen C und D $38\ \text{mm}$. Minireservoirs dienen der Aufnahme von Analyt- und Pufferlösung für die elektrophoretische Trennung. Über die elektrische Kontaktierung (erkennbar als metallische Leiterbahnen und Kontaktinseln am Chiprand) erfolgen die elektrokinetische Injektion der Analytlösung im Bereich der Kreuzung (durch Anlegen einer Spannung zwischen 1 und 2), der Transport der Analytlösung und die Trennung der Spezies im elektrischen Feld (Spannung liegt nun an zwischen 3 und 4) und die Detektion durch Messung des konzentrationsabhängigen Stromes an einer der Arbeitselektro-

den am Ausgang des Trennkanales (siehe Detailaufnahme). Als Beispiel ist die Trennung und der amperometrische Nachweis der Neurotransmitter Dopamin und Brenzkatechol in nur wenigen Sekunden gezeigt (Abb. 2).

Direkter Nachweis von Proteinen in Analysenchips durch Lichtstreuung

Eine in der Mikrosystemtechnik neuartige optische Methode zum markierungsfreien Nachweis von Proteinen stellt der Prototyp eines optischen Detektors auf Basis der Lichtstreuung dar. Er erlaubt, Proteine ohne vorheriges Markieren durch Anbinden eines Fluoreszenzlabels, in Kapillarelektrophorese-Chip-Systemen (CE-Chips) aufgrund des von den Proteinen durch Laserlichtanregung ($670\ \text{nm}$) gestreuten Lichts zu detektieren.

Lösliche Proteine haben bis zu einer Molmasse von $500\ \text{kD}$ einen Durchmesser von kleiner $15\ \text{nm}$, die Lichtstreuung erfolgt somit isotrop ($P(\vartheta) = 1$, Rayleigh-Streu-

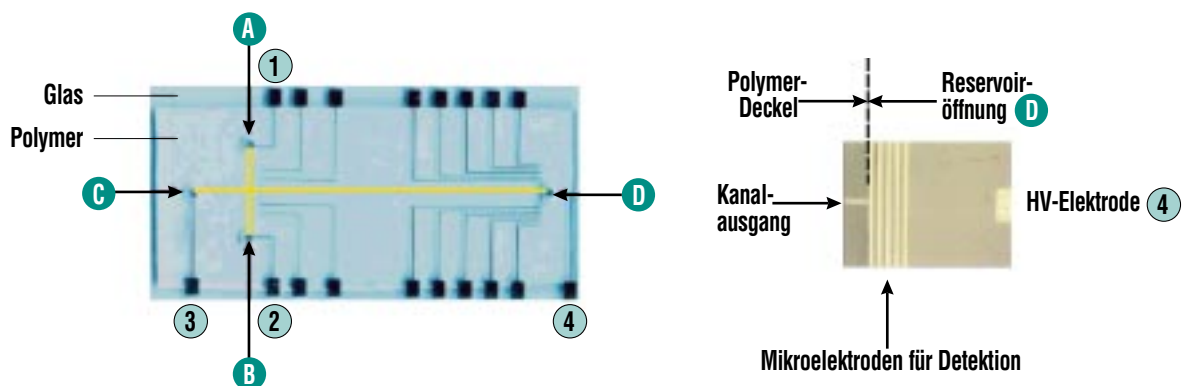


Abb. 1: Kapillarelektrophorese-Analyse-Chip mit integrierter elektrischer Detektion (links) und Detailansicht der Messelektroden am Ausgang des Trennkanales (rechts).

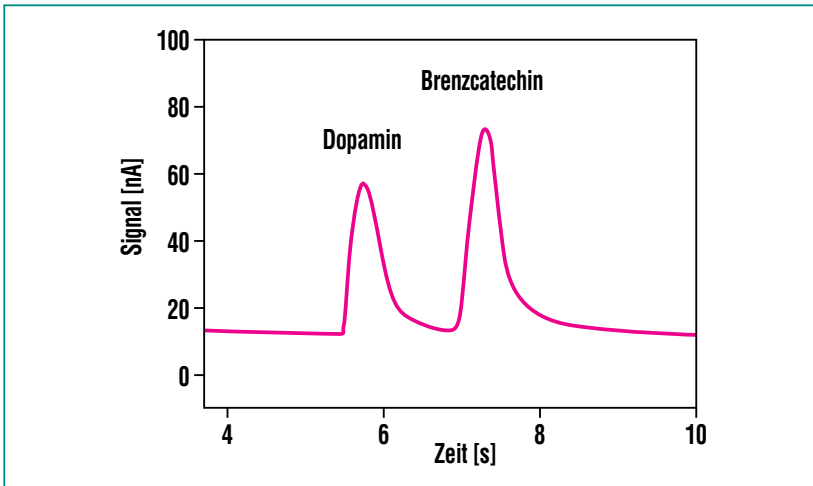


Abb. 2: Amperometrische Detektion von Neurotransmittern an Au-Chipelektroden (Injektion: 2 s bei 0,5 kV, Trennpotential: 2 kV, Detektionsspannung: 1200 mV, Analytkonzentration: 0,5 mM in Puffer pH 5,5).

ung). Bezüglich des geometrisch-optischen Layouts sind planare Chipstrukturen mit rechteckig ausgebildeten Kanälen, wie sie in Analysen-Chips durchaus typisch sind, vorteilhaft. Die Fokussierung des Messstrahls in den Ka-

nal kann hier optimal ausgelegt werden, so dass Nachweisgrenzen bis 1 µg Protein/ml grundsätzlich möglich sind.

Der Aufbau des Detektors (Abb. 3) enthält neben dem Mess-

kanal noch einen optischen Referenzkanal, der einerseits zur Kompensation von Schwankungen des Lasers dient und über den andererseits die Grundstreuung des Chipmaterials und des Laufpuffers in der Kapillare vor den Messungen abgeglichen wird. Erfasst und elektronisch verstärkt wird somit nur das durch die Streuung der Proteine verursachte Differenzsignal.

Abb. 4 a) zeigt den im Detektor eingelegten Chip. Deutlich zu erkennen ist die klassische Kreuzführung der Kapillaren eines CE-Chips. Die Justage des Chips in x-, y- und z-Richtung erfolgt auf einem Mikroskoptisch. Nach vorheriger Kompensation der Grundintensität über einen Graukeil im Referenzkanal wird das vom Probenkanal kommende Messlicht mittels Fasern abgegriffen und auf den Differenzdetektor geleitet. Die Änderung der Streuung kann

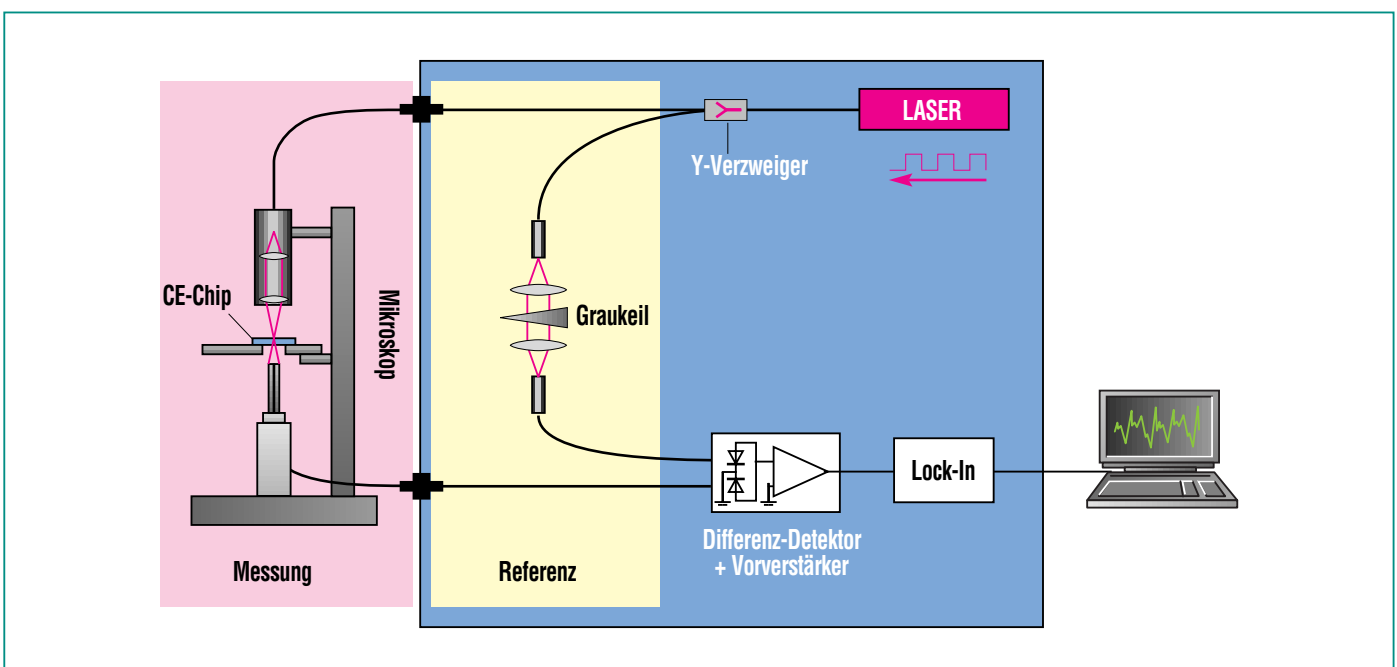


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Streulichtmessung auf mikrofluidischen Chips.

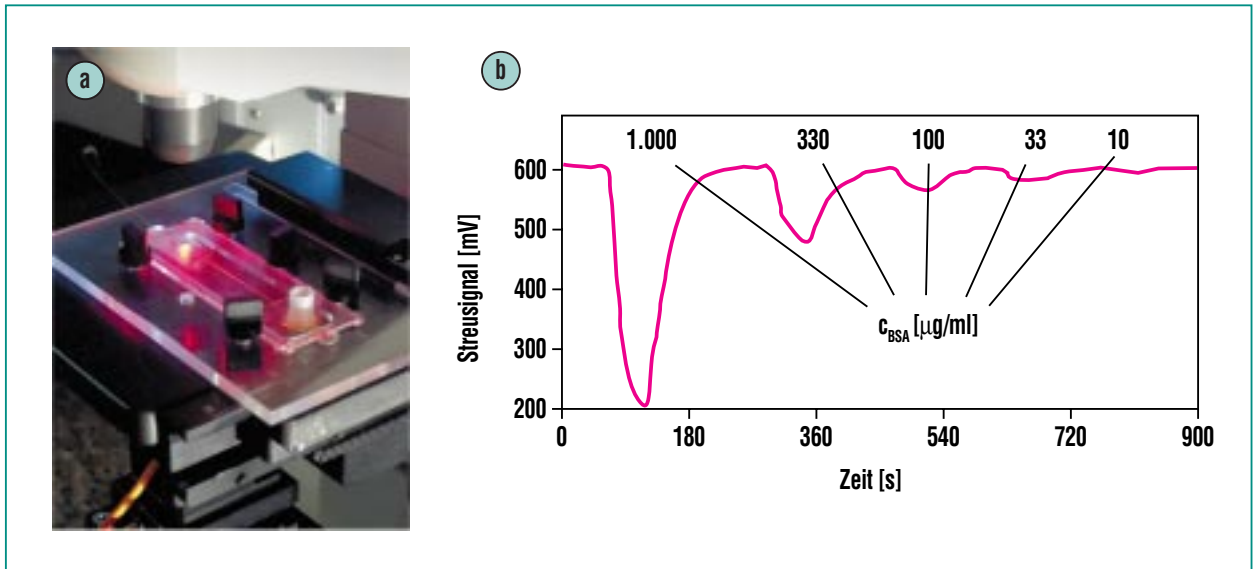


Abb. 4: a) Miniaturisierter Streulichtdetektor mit eingelegtem mikrofluidischen Chip. b) Test des Protein-detektors mit Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA). Aufgetragen ist der Zeitverlauf des Streusignals bei sequentieller Beprobung mit abnehmenden Proteinkonzentrationen, jeweils 60 s Proteinzugabe und nachfolgend 180 s Spülen mit Pufferlösung.

entweder als Schwächung des Primärstrahls verfolgt oder unter einem Winkel von 8° bis 15° erfasst werden. In Abb. 4 b) ist der Zeitverlauf des Streusignals dargestellt, das bei Beprobung mit einer Lösung von Rinderalbumin (BSA) in abnehmender Konzentration erhalten wurde.

Derzeit wird der Detektor in Kooperation mit der École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) optimiert und anhand deren Chip-Strukturen getestet, wobei das Erreichen einer Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/ml}$ ein vorzügliches Entwicklungsziel darstellt. Damit stünde dann eine kostengünstige und einfach realisierbare alternative Nachweismethode für Proteine ohne vorherige Markierung zur Verfügung, deren Sensitivität für eine Vielzahl von Anwendungen an Kapillarelektrophorese-Proteinchips ausreichend wäre.

Massensensitive Sensoren zum spezifischen Nachweis von Proteinen und zur Quantifizierung von Protein/Protein-Interaktionen

Ein weiteres Prinzip zur markierungsfreien Bestimmung von Biomolekülen ist die direkte Messung der Massenzunahme einer sensitiven Oberfläche. Ein am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelter Sensor beruht auf einem SAW-Resonator ausgerüstet mit einer entsprechend biorezeptiven Oberfläche. SAW steht hierbei für Surface Acoustic Wave = Akustische Oberflächenwelle. Auf diesem Resonator wird die masseabhängige Ausbreitung einer durch Kristallschwingungen hervorgerufenen akustischen Oberflächenwelle gemessen [6].

Solche massensensitiven SAW-Sensoren stellen im Vergleich zu anderen massensensitiven Verfahren eine empfindliche Methode für die direkte markierungsfreie Detektion von (Bio-)Molekülen wie z. B. Proteinen dar, und lassen sich zudem noch vergleichsweise kostengünstig parallelisieren. Dies ist immer dann ein Vorteil, wenn eine große Zahl gleichartiger Untersuchungen in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden soll.

Abb. 5 zeigt das SAW-Bauelement, das aus einem piezoelektrischen Substrat mit zwei aufgetragenen Interdigitaltransducern besteht, von denen einer als Sender, der andere als Empfänger arbeitet. Eine hochfrequente Wechselspannung am Sendetransducer erzeugt eine akustische Oberflächenwelle, die über das Substrat läuft und im Empfängertransducer wieder in ein elektrisches Signal zurückverwandelt

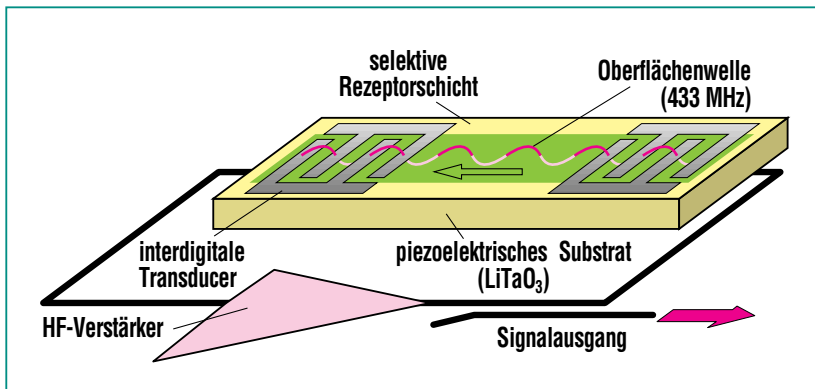


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines SAW-Oszillatorschaltkreises.

wird. Durch Integration dieses Bauelements in einen Oszillatorschaltkreis erhält man, nach Ausgleich von Dämpfung und Phasenverschiebung der akustischen Welle, eine Schwingung mit spezifischer Resonanzfrequenz. Diese Frequenz wird als Messsignal aus der Schaltung ausgekoppelt.

Das Signal ändert sich, wenn Biomoleküle angelagert werden, da diese aufgrund der Änderung von Masse und Viskosität an der Oberfläche die Schallgeschwindigkeit der Oberflächenwelle beeinflussen.

Durch eine mikrofluidische Peripherie können kompakte Messzellen mit Volumina im Sub-Mikroliterbereich aufgebaut werden, die zudem einfach zu handhaben sind; beides wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung eines flexiblen und leistungsfähigen Arrays. Liegen komplexe Matrices vor, so können mit einem Array, wie es momentan entwickelt wird, bei geeigneter Wahl der Rezeptorschichten auf den Sensoren während einer Messung mehrere Proteine zur gleichen Zeit spezifisch nebeneinander nachgewiesen werden. Im Falle einer ent-

sprechenden Kalibration kann auch quantifiziert werden. Falls nur ähnliche Proteine als Analyte vorliegen, für die zunächst keine hochspezifischen Rezeptoren zur Verfügung stehen, lassen sich deren tatsächliche Konzentrationen ebenfalls bestimmen, wenn Verfahren zur Signalmusterauswertung eingesetzt werden.

Unabhängig von einer Parallelisierung ermöglicht bereits die Integration nur eines SAW-Detektors in ein Fließ-Injektions-Analyse-System neben einer automatisierten Probenhandhabung vor allem die Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Konstanten einer Bindungsreaktion an der Oberfläche. Hierzu wird der Bindungsvorgang zeitaufgelöst beobachtet. Das Prinzip beruht darauf, dass der ausgenutzte Bindungsprozess von Analyt-Molekülen in Lösung an oberflächengebundenen Rezeptoren aus zwei Schritten besteht: Diffusion an die Oberfläche und die eigentliche Bindungsreaktion. Die Rezeptordichte an der Oberfläche bestimmt, welcher dieser beiden Schritte der geschwindigkeitsbestimmende ist und gibt somit den Informationsgehalt der Bindungskurve vor. In der Abb. 6 ist dieser Zusammenhang

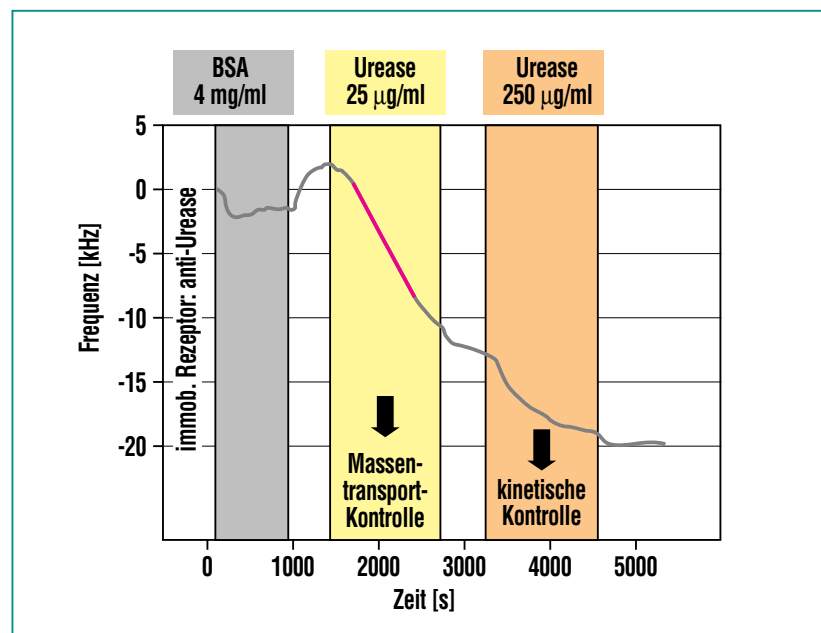


Abb. 6: Mess-Signale bei unterschiedlicher Konzentration des auf dem SAW-Resonator immobilisierten Rezeptors. Je nach Bedingungen werden kinetische und thermodynamische Größen zur Charakterisierung der Interaktionsanalyse zugänglich.

gezeigt. Im massentransportkontrollierten (diffusionskontrollierten) Bereich kann die in der Lösung vorhandene Analyt-Konzentration über die Steigung der linearen Bindungskurve bestimmt werden, im kinetisch kontrollierten Bereich können durch Kurvenanpassung kinetische und thermodynamische Konstanten der Oberflächenreaktion ermittelt werden.

Weltweit sind inzwischen eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen publiziert und qualitativ untersucht worden. Es fehlt jedoch meist an einer verlässlichen Quantifizierung dieser Reaktionen, die für ein tieferes Verständnis komplexer funktionaler Zusammenhänge, beispielsweise auf zellulärer Ebene, notwendig ist. Hier bietet sich das SAW-basierte System aufgrund seiner bereits heute erreichten Nachweisstärke bis 4 pg/mm^2 Protein, einfachen Parallelisierbarkeit und biorezeptiven Konditionierbarkeit als leistungsfähiges und auch kostengünstiges Analysenprinzip an.

Biohybride CellChips für Stoffwechselltests

Im Folgenden wird eine Entwicklung vorgestellt, die allein zwar noch kein Analysensystem ist, jedoch das Potenzial besitzt, zur Kernkomponente eines Systems für Toxizitäts- und Wirksamkeitstests zu werden. Es handelt sich um eine als „Cellchip[®]“ bezeichnete Polymere Mikrokomponente, die es erlaubt, Zellen unter Erhalt ihrer Differenzierung über einen langen Zeitraum zu kultivieren. Damit könnten solche Systeme für Analysezwecke über längere Zeit nicht nur vital bleiben, sondern auch ihre spezifischen Funktionen erhalten und notfalls wiederholt eingesetzt werden.

Der am Forschungszentrum entwickelte Ansatz, der auch für eine spätere Anwendung als Leberunterstützungssystem denkbar ist, geht davon aus, definierte Zellzahlen bzw. Schichtdicken von Gewebe zu kultivieren, die sogar aktiv bei kurzen Versorgungsweegen durchströmt bzw. überströmt

werden können und somit nicht diffusionslimitiert sind. Dazu wird ein Raster für die Zellkultur genutzt, das sich von der Größenordnung her an physiologischen Maßen orientiert. So beträgt etwa die mittlere freie Weglänge zwischen zwei Blutkapillaren ca. $300 \text{ }\mu\text{m}$. Eine Gewebeschicht von $150 \text{ }\mu\text{m}$ Dicke kann also noch durch Diffusion versorgt werden. Dieses Grundmaß wurde für das Design einer Gitterstruktur gewählt, das sich mikrotechnisch realisieren lässt. Als Materialien für den mikrotechnisch hergestellten Cellchip[®] kommen Polymere wie Polymethylmethacrylat, Polycarbonat oder andere in Frage, die sich in Heißspräge- bzw. Mikrospritzgussverfahren gut verarbeiten lassen. Solche Mikrostrukturen können auf einer Fläche von 1 cm^2 900 (30×30) Mikrocontainer beherbergen (Abb. 7). Der pyramidenförmig strukturierte Boden ist porös, um Medium oder Testsubstanzen hindurch pumpen zu können (Abb. 8).

Zellkulturversuche mit Ratten- bzw. Schweinehepatozyten auf Mikrostrukturen bestätigen den vorgestellten Ansatz: Die Zellen bleiben sogar ohne aktive Mediumversorgung (nur durch Diffusion versorgt) auf lange Zeit vital und funktionsfähig. Damit ist dieses System grundsätzlich geeignet als Basis für Testsysteme bis hin zu einem extrakorporalen Organersatz. Besonders für die letzte Anwendung sind allerdings noch eine Vielzahl weiterer Probleme zu lösen. Unter anderem muss die Oberfläche der eingesetzten Polymere für die Zellen angemessen funktionalisiert werden [5]. Neben der Anwendung

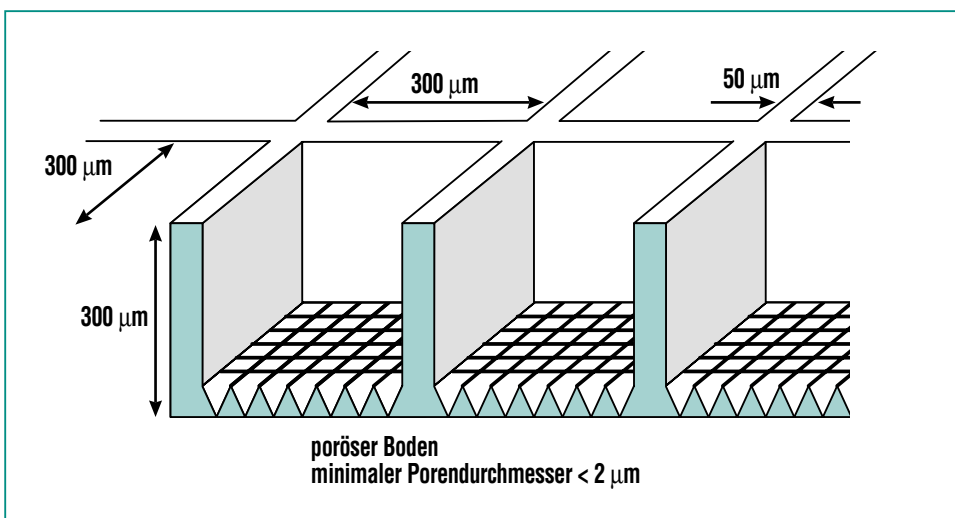


Abb. 7: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Mikrostruktur, die zur Besiedlung mit Zellen geeignet ist.

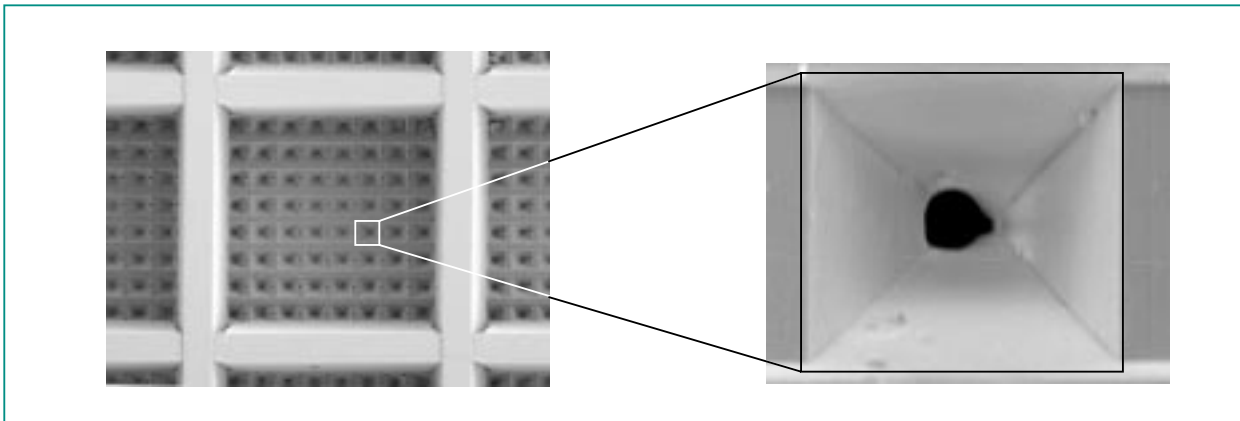


Abb. 8: Mikrostruktur mit Perfusionskanälen, die durch Excimer-Laser-Beschuss hergestellt wurden. Links: Aufsicht auf einen Mikrocontainer (300 µm Innenbreite), rechts: Ausschnittvergrößerung einer pyramidenförmigen Vertiefung (Kanaldurchmesser ca. 2 µm).

als biohybrides Lebersystem, werden auch weitere Anwendungen angestrebt, etwa die Expansion von Knochenmark oder die Züchtung von Dünndarmgewebe und Haut.

Die Möglichkeit präzise definierte Gewebeschichten und -geometrien kultivieren zu können ist ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen dreidimensionalen Kultivierungsverfahren. Gerade dies macht die Mikrostrukturen für die Pharma- und Wirkstoffforschung interessant. Es ließen sich in solchen Arrays Toxizitäts- und Wirksamkeitstests an In-vitro-Geweben miniaturisieren. Die Rasteranordnung von 900 Mikrocontainern auf nur 1 cm² Fläche kommt dem Bestreben entgegen, immer kleinere Probenvolumina zu verwenden. Damit lässt sich nicht nur für Anwendungen im sogenannten High-Throughput-Screening der Probendurchsatz steigern, sondern es besteht auch die Möglichkeit das erforderliche Probenvolumen, das inzwischen einen bedeutenden Kostenfaktor darstellt, zu reduzieren.

Zusammenfassung und Ausblick

Erste Entwicklungsbeispiele von markierungsfreien Detektionsverfahren für den Nachweis von Proteinen und zum Aufbau eines Systems für wirkungsspezifische Tests wurden vorgestellt. Dabei zeigte sich, dass insbesondere elektrochemische Ansätze das Potenzial besitzen, in einer Technologie den Protein-Nachweis gleichzeitig mit Maßnahmen zum Probentransport zu verbinden. Damit eröffnet sich die prinzipielle Möglichkeit, in nur einem Fertigungsschritt („Metallisierung“) zwei Funktionalitäten in neuartige Analysensysteme zu integrieren. Mit dem Funktionsmuster eines miniaturisierten Verfahrens zum Nachweis von Proteinen durch Streulichtmessung steht ein neuartiges unspezifisches optisches Prinzip zur Verfügung, das den Nachweis von unmarkierten Proteinen bereits heute bis in den unteren µg/ml-Bereich ermöglicht. Hinsichtlich des spezifischen Nachweises von Proteinen ermöglicht das SAW-gestützte

Verfahren den Aufbau eines massensensitiven Biosensorsystems, das sowohl parallelisiert werden kann als auch – abhängig von der angewandten Methode – eine Quantifizierung von Proteininteraktionen erlaubt. Dabei ist schon heute abzusehen, dass im Vergleich zu kommerziell vertriebenen Technologien, eine mittelfristige Realisierung von mobilen Geräten für die medizinische Diagnostik zu attraktiven wirtschaftlichen Bedingungen möglich wird. Das abschließend vorgestellte Cellchip[®]-System zur Kultivierung von Zellen erlaubt grundsätzlich den Aufbau von neuartigen und lebensnahen Toxizitäts- und Wirksamkeitstest für die Pharmaforschung.

Danksagung

Wichtige Anregungen zur Entwicklung von in Analyse-Chips integrierbaren elektrochemischen Detektionsmethoden verdanken wir Herrn Prof. Dr. P. C. Hauser vom Department Chemie der Universität Basel.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Ruth Freitag, EPFL, für die anregenden Diskussionen und die Bereitstellung der von ihr entwickelten Analysenchips.

Wir danken auch den Kollegen Thomas Schaller, Dr. Volker Piotter und Dr. Wilhelm Pfleging so-

wie deren Mitarbeitern, die bei der Herstellung der CellChips wesentliche Beiträge geleistet haben.

Literatur

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers et al, *Science* 291 (2001) 1304-1351
- [2] F. Lottspeich, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 2476-2492
- [3] R. F. Service, *Science* 294 (2001) 2074-2076
- [4] N. Barié, M. Rapp, H. Siegrist, *Analisis* 27 (7/1999) 622-629
- [5] A. Welle, *Nachrichten* 33 (4/2001) 295-304