

# On-Chip-Proteinbiosynthese

Christopher Timm und Christof M. Niemeyer\*

Biosensoren · DNA-Transkription · Mikrostrukturen ·  
Selbstorganisation · Zellfreie Proteinsynthese

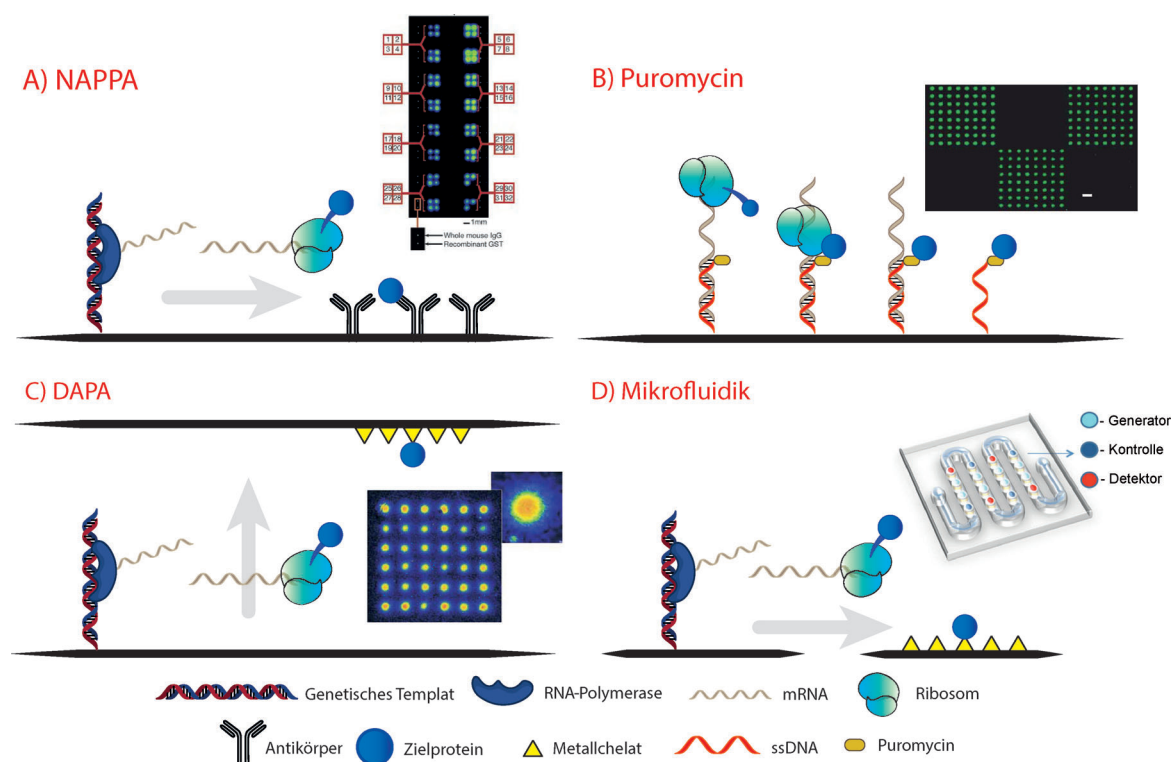
Die Mikroarray-Technik hat sich in den vergangenen 25 Jahren zu einem etablierten Ansatz für die schnelle und kostengünstige Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen entwickelt. Während DNA-Mikroarrays routinemäßig für die Transkriptionsanalyse, Genotypisierung und andere Anwendungen im Bereich der biomedizinischen Forschung verwendet werden,<sup>[1,2]</sup> sind Protein-Mikroarrays wegen der Komplexität und Instabilität dieser Biomakromoleküle weitaus weniger gut entwickelt. DNA und viele andere Nucleinsäuren können leicht in großem Maßstab durch Festphasensynthese hergestellt und wegen ihrer außergewöhnlich hohen physikochemischen Stabilität an feste Phasen gebunden werden, ohne ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung zu beeinträchtigen. Proteine dagegen haben häufig filigrane dreidimensionale Strukturen, deren Funktion und Wechselwirkungspotenzial stark von ihrer nativen Faltung abhängt. Physikochemische Manipulationen, wie die Immobilisierung auf Oberflächen, führen daher häufig zu einer Störung der Proteinfunktion. Deshalb werden besondere Techniken zur Herstellung von Protein-Mikroarrays benötigt, die die Entwicklung sanfter chemischer Verfahren zur gerichteten Immobilisierung rekombinanter Proteinsonden umfassen.<sup>[3,4]</sup> Während diese Ansätze normalerweise gereinigte Proteine verwenden, die durch heterologe Expression in zellulären Systemen hergestellt werden, wurden jüngst auch einige Methoden entwickelt, um Protein Biochips in situ durch Verwendung zellfreier Expression herzustellen.<sup>[5]</sup> Eine kürzlich von Corn et al. veröffentlichte Arbeit zeigt, dass dieses Format großes Potenzial für die Anwendung im Bereich der Biosensorik hat.<sup>[6]</sup> Zellfreie Proteinexpression basiert auf In-vitro-Transkription und -Translation (IVTT) eines DNA-Templats mithilfe von Zellextrakten aus *Escherichia coli*, Kaninchen-Retikulozyten, Weizenkeimen oder anderen Zellen, die alle notwendigen Bestandteile für die Proteinbiosynthese enthalten.<sup>[7]</sup>

Die IVTT ist sehr gut etabliert, und Reagentien sind kommerziell verfügbar. Die Methode bietet unter anderem den Vorteil, dass es möglich ist, toxische Proteine herzustellen oder nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzubauen. Außerdem ermöglicht der offene und flexible Charakter der

IVTT-Systeme den Einsatz von Produkten der Polymerasekettenreaktion (PCR) als Template, um kleine Mengen vieler verschiedener Proteine für eine Bibliothek zu generieren.<sup>[8]</sup> Dieser Ansatz kann durch die Verwendung von Mikrotiterplatten mit einer individuellen Kavitätengröße von etwa 100 nL herunterskaliert werden, um die Expression und Charakterisierung großer Proteinbibliotheken zu ermöglichen.<sup>[9]</sup> Zur leichteren Reinigung der Proteine und Abtrennung der IVTT-Komponenten für anschließende Charakterisierung und Bindungsstudien kann eine spontane Immobilisierung der neu synthetisierten Proteine erreicht werden, indem die Oberfläche von Mikrotiterplatten oder anderer planarer Substrate mit einem spezifischen Fängerreagens beschichtet wird. Hierzu kann beispielsweise ein Metallchelat verwendet werden, das selektiv an ein genetisch mit dem Zielprotein fusioniertes Oligohistidin-Epitop bindet. Dieser Ansatz wird bei der „protein in situ array“ (PISA)-Technik genutzt<sup>[10]</sup> und lässt sich durch das Spotting verschiedener PCR-Template und IVTT-Reagentien weiter verfeinern, so dass die Produktion und Immobilisierung der generierten Proteine auf einem Spot möglich ist.<sup>[11]</sup> So wurden mithilfe der PISA-Methode bereits hochminiaturisierte Protein-Mikroarrays in situ mit bis zu 13 000 Spots pro Biochip hergestellt. Man fand, dass 35 fg ungereinigtes PCR-Produkt (etwa 22 500 Moleküle) pro Spot für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ausreichen.

Die zellfreie Proteinexpression auf einer Oberfläche wurde schon 2004 von LaBaer et al. beschrieben.<sup>[12]</sup> Deren „nucleic acid-programmable protein array“ (NAPPA)-Technik nutzte eine chemisch reaktive Glasoberfläche, auf die durch Spotting eine Mischung aus DNA-Plasmid und Fängerantikörper, der gegen ein Epitop aus der Glutathion-S-Transferase (GST) gerichtet war, aufgetragen wurde (Abbildung 1 A). Unterschiedliche Zielplasmid-DNAs, die die genetische Information für C-terminale GST-Fusionsproteine trugen, wurden durch Mikrodeposition angeordnet, und der gesamte Biochip wurde mit Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten inkubiert. Die hierdurch generierten Proteine wurden umgehend in den Spots durch Anti-GST-Antikörper gebunden. Immunfärbung mit zielspezifischen Antikörpern zeigte, dass alle Proteine korrekt exprimiert wurden und dass es keine unerwünschten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Spots auf dem Biochip gab. Diese Methode wurde dazu verwendet, menschliche DNA-Replikationsenzyme herzustellen und deren Wechselwirkung mit anderen Proteinen zu kartieren.<sup>[12]</sup>

[\*] M. Sc. C. Timm, Prof. Dr. C. M. Niemeyer  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT),  
Institut für Biologische Grenzflächen (IBG 1)  
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen  
(Deutschland)  
E-Mail: niemeyer@kit.edu



**Abbildung 1.** Verschiedene Formate für die On-Chip-Proteinsynthese. A)–D) zeigen repräsentative Proteinchips und deren allgemeines Funktionsprinzip. A) Nucleic acid programmable protein array (NAPPA).<sup>[12]</sup> B) Puromycin-vermittelte Immobilisierung von Proteinen auf einer Oberfläche.<sup>[13]</sup> C) DNA array to protein array (DAPA).<sup>[14]</sup> D) Aufeinanderfolgende mikrofluidische Generierung und Immobilisierung von Proteinen auf verschiedenen Spots in einem mikrofluidischen Reaktor. Die Kontroll-Spots fungieren als Negativkontrolle, die kein Metallchelator für die Bindung der neu generierten Proteine enthält.<sup>[6]</sup>

Eine Variante der NAPPA-Technik wurde von Tao und Zhu entwickelt, die Proteinchips in situ durch direkte Bindung der während der ribosomalen Translation von RNA-Molekülen entstehenden Polypeptide herstellten (Abbildung 1B).<sup>[13]</sup> Zu diesem Zweck wurden DNA-Fängeroligonucleotide auf Oberflächen immobilisiert, die mit dem Peptidantibiotikum Puromycin derivatisiert und komplementär zum 3'-Ende eines mRNA-Moleküls waren. Während der Translation blockiert die doppelsträngige RNA-DNA-Region die Ablesung der mRNA durch das Ribosom, wodurch das Puromycin in die A-Stelle des Ribosoms eindringen kann und hierdurch das neu synthetisierte Peptid an das Puromycin-modifizierte Oligonucleotid gekuppelt wird. Mit dieser Technik war es möglich, etwa 0.8 fmol Proteine pro Spot zu generieren. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Proteinkonzentration auf Mikroarrays, die durch Spotting von gereinigtem Protein erzeugt wurden.<sup>[13]</sup>

Während NAPPA und Puromycin-Bindung auf der gleichzeitigen Immobilisierung von Transkriptionstemplat und einem geeigneten Fängerreagens für Proteine im gleichen Spot beruhen, können Transkription/Translation und Proteinimmobilisierung auch in verschiedenen Bereichen einer Mikrostruktur erreicht werden. Dieses Prinzip wird bei der „DNA array to protein array“ (DAPA)-Methode eingesetzt, die von Taussig und Mitarbeitern entwickelt wurde.<sup>[14]</sup> Ein Biochip, der eine Anordnung von DNA-Templatmolekülen enthält, wird mit einem zweiten Biochip vereint, der ein

Fängerreagens für die Zielproteine, wie das Metallchelator Nitrilotriacetat, trägt. In einer Sandwich-Konstruktion werden die beiden Biochips durch eine poröse Membran getrennt, die mit einem IVTT-Mix durchtränkt ist. Proteine, die auf den Spots aus immobilisierter DNA synthetisiert wurden, diffundieren durch die Membran und werden an die Oberfläche des gegenüberliegenden Biochips gebunden (Abbildung 1C). Durch Verwendung von Hexahistidin-markiertem GFP und myc-markiertem E2F6-Modellprotein wurde gezeigt, dass eine fast zwanzigfache Wiederverwendbarkeit des Templat-Biochips für die Translation möglich ist.<sup>[14]</sup>

Mikrokompartimentierung von DNA-Templat enthaltenden Erzeuger-Spots und Fängerreagens tragenden Detektor-Spots wurde in einer aktuellen Veröffentlichung von Corn et al. gezeigt.<sup>[6]</sup> Die Spots waren dabei durch einen mikrofluidischen Kanal verbunden, der sie mit IVTT-Reagenzien versorgte und den Transport der synthetisierten Proteinen vom Erzeuger- zum Detektor-Spot bewirkte (Abbildung 1D). Die mikrofluidisch verbundenen Spots befanden sich auf einer Biosensoroberfläche, die die Echtzeitbeobachtung von Bindungsereignissen durch abbildende Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPRI) ermöglichte. Obwohl nur zwei Modellproteine (GFP, Luciferase) für diese Machbarkeitsstudie verwendet wurden, zeigen die Befunde deutlich, dass sowohl die IVTT-Prozesse auf den Erzeuger-Spots als auch die Bindung der neu synthetisierten Proteine an die Antikörper in Echtzeit verfolgt werden können. Da

dieses zweigeteilte Format unspezifische Adsorptionsprozesse minimiert, regen die Autoren eine Verwendung dieser On-Chip-Generierung für Protein-Mikroarrays mit kombinierter SPRI für die Verwendung in Hochdurchsatzverfahren der Bioanalytik mit klinischem und wissenschaftlichem Hintergrund an.<sup>[6]</sup>

Die im Vorangegangenen beschriebene Arbeit demonstriert einen sehr interessanten Ansatz zu Nutzung der On-Chip-Proteinsynthese für neue Anwendungsfelder, indem leistungsfähige Auslesemethoden implementiert werden. Bemerkenswert ist jedoch auch, dass die Verknüpfung von IVTT mit hochentwickelter Mikrofluidik neuartige, sehr leistungsfähige Systeme hervorbringen kann. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür wurde 2007 von Quake und Maerkl publiziert.<sup>[15]</sup> Diese entwickelten einen integrierten mikrofluidischen Chip für das mechanische Einfangen von molekularen Interaktionen (MITOMI), um die mit geringer Affinität auftretenden Bindungsereignisse zwischen Transkriptionsfaktoren (TFs) und DNA-Sequenzen zu untersuchen. Ihr Chip bestand aus 2400 Einzelzellen, in denen immobilisierte DNA-Template für die In-situ-Generierung von vier verschiedenen TFs durch IVTT verwendet wurden. Die löslichen TFs wurden anschließend mikrofluidisch mit fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten vereint, und Bindungsgleichgewichte von freier DNA und schwach gebundenen DNA-TF-Komplexen wurden mechanisch durch einen druckaktivierten Pfropf in der Reaktionskammer eingefangen. Dieser Ansatz eliminierte das Problem der hohen Dissoziationsgeschwindigkeiten, wie es bei konventionellen Plattformen für Oberflächenanordnungen auftritt, und ermöglichte eine detaillierte Beschreibung des Energieprofils von DNA-Bindungen für eukaryotische TFs. Eine solche Beschreibung ist notwendig, um grundlegende Annahmen zur TF-Bindung zu überprüfen und ihre In-vivo-Funktion vorherzusagen.<sup>[15]</sup>

Die oben beschriebenen Ansätze zeigen klar, dass die Implementierung von zellfreier Proteinexpression in bioanalytische Lab-on-a-Chip-Systeme vielfältige neue Möglichkeiten erschließt. Der mikrofluidische Ansatz erleichtert nicht nur die genaue Steuerung von Reaktionsparametern, wie

Druck oder Temperatur, was zu verlässlicheren Experimenten führt, sondern bietet auch die Möglichkeit zur Bündelung von Experimenten mit geringen Anforderungen an Reagensverbrauch und Durchlaufzeit. Dementsprechend haben mikrofluidische IVTT-Systeme ein enormes Potenzial für Anwendungen in der Grundlagenforschung sowie in wirtschaftlich relevanten Gebieten wie der Wirkstoff-Entwicklung oder, allgemeiner formuliert, bei der Bewertung des Einflusses von Substanzen auf biologische Systeme.

Eingegangen am 6. November 2012

Online veröffentlicht am 10. Januar 2013

- [1] M. Schena, *DNA Microarrays (Methods Express)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2007**.
- [2] P. Baldi, G. W. Hatfield, *DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling*, Cambridge University Press, Cambridge, **2011**.
- [3] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618.
- [4] D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7744.
- [5] M. He, O. Stoevesandt, M. J. Taussig, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 4.
- [6] T. H. Seefeld, A. R. Halpern, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12358.
- [7] Y. Shimizu, T. Kanamori, T. Ueda, *Methods* **2005**, *36*, 299.
- [8] A. S. Spirin, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 538.
- [9] P. Angenendt, L. Nyarsik, W. Szaflarski, J. Glokler, K. H. Nierhaus, H. Lehrach, D. J. Cahill, A. Lueking, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1844.
- [10] M. He, M. J. Taussig, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e73.
- [11] P. Angenendt, J. Kreutzberger, J. Glokler, J. D. Hoheisel, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1658.
- [12] N. Ramachandran, E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter, J. LaBaer, *Science* **2004**, *305*, 86.
- [13] S. C. Tao, H. Zhu, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1253.
- [14] M. He, O. Stoevesandt, E. A. Palmer, F. Khan, O. Ericsson, M. J. Taussig, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 175.
- [15] S. J. Maerkl, S. R. Quake, *Science* **2007**, *315*, 233.