

Enzyme – Individualität statt Konformität

Analyse individueller Enzymmoleküle im Femtoliter-Array

Raphaela Liebherr¹, Benno Ehrh¹, Albert Hutterer², Helmut Hummel² und Hans-Heiner Gorris^{1*}

¹Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg,

²Fakultät für Mikrosystemtechnik, Hochschule Regensburg

Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei den meisten biochemischen Prozessen, die in unserem Körper ablaufen. In traditionellen Enzymexperimenten wird das durchschnittliche Verhalten einer ganzen Population mit tausenden von individuellen Molekülen beobachtet und analysiert, so dass wir über ein detailliertes Verständnis der Enzymkinetik im Ensemblemaßstab verfügen. Das Verhalten einzelner Enzymmoleküle und ihr Beitrag zur Dynamik einer Enzympopulation bleiben dabei jedoch verborgen. Für ein vollständiges Verständnis des zeitlichen Ablaufs von Enzymreaktionen ist daher nicht nur die Kinetik der Enzympopulation als Ganzes, sondern auch der Anteil jedes einzelnen Enzymmoleküls an der Ensemblereaktion von Bedeutung. Der individuelle Beitrag einzelner Moleküle zur Enzymkinetik eines Ensembles ist bis heute noch wenig erforscht und daher Kernthema vieler wissenschaftlicher Arbeiten¹. So wurden zum Beispiel kinetische Details, wie eine breite Aktivitätsverteilung innerhalb einer Enzympopulation (statische Heterogenität)², Fluktuationen der Enzymaktivität in aufeinanderfolgenden Zyklen (dynamische Heterogenität)³ sowie Subpopulationen entdeckt.

Dieser Artikel befasst sich mit Einzelenzymstudien, die auf der Umsetzung eines farblosen Substrats in ein fluoreszierendes Produkt beruhen. Alternative optische Methoden, wie beispielsweise der Einsatz von FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Paaren zur Detektion von Einzelmolekülen und nicht-optische Detektionsmethoden der Einzelenzymanalytik, werden aufgrund der großen Methodenvielfalt nicht behandelt. Die Fluoreszenzmikroskopie ist neben der Radioanalytik eine der empfindlichsten Detektionsmethoden, die der biochemischen Forschung zur Verfügung steht. Durch die Entwicklung moderner CCD- und CMOS-Detektoren eignet sie sich hervorragend für die schnelle und hochaufgelöste Aufnahme einzelner Analytmoleküle in sehr kleinen Volumina. In Einzelenzymstudien wird häufig nur eine

kleine Anzahl von Fluorophoren gebildet und beobachtet. Daher ist eine Reduktion des Detektionsvolumens essentiell, so dass das Hintergrundsignal aufgrund von Autofluoreszenz und Raman-Streuung des Mediums minimiert wird.

Einzelenzymdetektion in mikroskopisch kleinen Reaktionsgefäßen

Viele Einzelenzymexperimente erfordern die Immobilisation der Enzymmoleküle an einer Oberfläche⁴, wodurch die Substratzugänglichkeit und die Aktivität des Enzyms beeinflusst werden. Außerdem kann meist nur eine kleine Anzahl an Analytmolekülen parallel beobachtet werden. Individuelle Enzymmoleküle in mikroskopisch kleinen Kammern mit einem Volumen von nur einigen Femtolitern (μm^3) einzuschließen, hat den entscheidenden Vorteil, dass das Enzym nicht an einer Oberfläche fixiert werden muss. Durch die Isolierung der Enzymmoleküle in winzigen, abgeschlossenen Gefäßen wird außerdem gewährleistet, dass Enzym und Produkt immer an derselben Stelle nachweisbar sind.

Abbildung 1 zeigt den Übergang von konventionellen Ensembleexperimenten zur Einzelenzymanalytik in extrem kleinen Femtoliter-Reaktionsgefäßen. Die Femtoliter-Gefäße werden mit einer so stark verdünnten Enzymlösung beladen, dass nicht genügend Enzymmoleküle vorhanden sind, um jedes Reaktionsgefäß zu besetzen. Daher ist der Substratumsatz auf einzelne Gefäße beschränkt und das fluoreszierende Produkt der Enzymreaktion kann nur in den belegten Gefäßen detektiert werden. Anhand der Poisson-Verteilung lässt sich eine geeignete Enzymkonzentration berechnen, bei der die Zahl von Reaktionsgefäßen, die nur ein einzelnes Enzymmolekül enthalten, maximiert wird. Die Poisson-Verteilung beschreibt die Wahrscheinlichkeit $P_\mu(x)$, dass genau x Enzymmoleküle in einer bestimmten Reaktionskammer eingeschlossen sind. Die Größe μ ist dabei die durchschnittliche Anzahl von Enzymen pro Femtoliter-Gefäß (Gleichung 1):

$$P_\mu(x) = \frac{e^{-\mu} \mu^x}{x!}$$

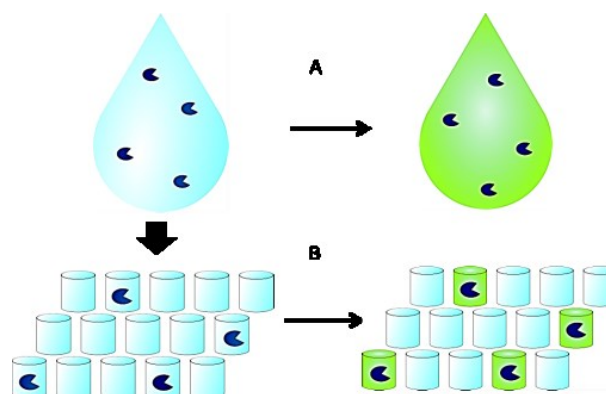


Abb. 1. Aktivitätsbestimmung von Enzymen (dunkelblau) über die Umsetzung eines farblosen Substrats (hellblau) zum fluoreszierenden Produkt (grün).

A Traditionelles Ensembleexperiment: Detektion der Aktivität einer ganzen Enzympopulation.

B Parallele Beobachtung der individuellen Enzymaktivitäten durch die Isolation einzelner Moleküle in den Femtoliter-Reaktionsgefäßen.

Das erste Einzelenzymexperiment, das auf dem Prinzip der Kompartimentierung einer Enzymlösung in winzigen Gefäßen beruht, wurde bereits in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts von Boris Rotman beschrieben⁵. Hierfür wurde das Enzym β -Galactosidase in winzige, durch Emulsion definierte Wasser-in-Öl-Tropfchen eingeschlossen. So ließ sich zeigen, dass Enzyminaktivierung durch Hitzeeinwirkung zu einer Mischung aus aktiven und inaktiven Enzymmolekülen statt zu einer Teilaktivierung aller Moleküle führt, was zuvor in

Ensemble-Messungen verborgen geblieben war. Weitere Möglichkeiten der Mikrokompartimentierung einzelner Enzymmoleküle bieten Lipid-Vesikel oder auch Viruskapside. Im Kapsid des Pflanzenvirus CCMV wurde die Meerrettichperoxidase auf der Einzelmolekül-Ebene analysiert.⁶

Ein etwas anderes Prinzip der Isolierung von Einzelmolekülen beruht auf der Kapillarelektrophorese. In diesem Fall wird eine dünne Kapillare (innerer Durchmesser: 5 μm) mit einzelnen frei beweglichen Enzymmolekülen und einem fluorogenen Substrat so befüllt, dass die Diffusionszonen des fluoreszierenden Produkts nicht überlappen. Am Fluoreszenzdetektor wird das angesammelte Produkt jedes einzelnen Enzymmoleküls quantitativ bestimmt. Auf diese Weise wurde insbesondere das Modellenzym β -Galactosidase analysiert.^{7,8}

Während Miniaturgefäße aus Wasser-in-Öl-Emulsionen, Lipid-Vesikeln oder Virushüllen zufällig angeordnet sind, erlauben moderne Ätztechniken eine gezielte Strukturierung von Oberflächen. Auf diese Weise lassen sich tausende von homogen angeordneten Femtoliter-Kammern herstellen, die einen sogenannten Femtoliter-Array bilden. Beispielsweise wurden Femtoliter-Arrays in das Ende von optischen Glasfaserbündeln geätzt, die aus tausenden einzelnen Glasfaserkernen bestehen.⁹ Das Kernmaterial lässt sich im Gegensatz zur Glasfasermatrix spezifisch ätzen, so dass ein homogener Array aus 50.000 Reaktionsgefäßen entsteht. Jede dieser Kammern ist daraufhin mit einer Glasfaser verbunden, die als Lichtleiter für das Anregungs- und Emissionslicht dient. In diesen Glasfaser-Arrays wurden beispielsweise die statische Heterogenität² und die Inhibition¹⁰ von β -Galactosidase sowie das Redox-Enzym Meerrettichperoxidase¹¹ analysiert.

Einzelmoleküldetektion in planaren Femtoliter-Arrays

In unserer Arbeitsgruppe werden Arrays aus 62.500 Femtoliter-Kammern mittels Photolithographie und anschließendem Ätzen in der Oberfläche von planaren Quarzglascheiben verwendet (Abbildung 2). Die Arrays bestehen aus homogenen, zylindrischen Reaktionsgefäßen mit einem Durchmesser von 4 μm und einer Tiefe von etwa 3 μm , was ein Reaktionsvolumen von circa 40 μm^3 (bzw. Femtoliter) definiert.

In die Gefäße des Femtoliter-Arrays wird eine hochverdünnte Enzymlösung gegeben und mittels einer mechanischen Dichtung fest eingeschlossen. Wird eine Enzymkonzentration von 36 pM gewählt, so ist – entsprechend der Poisson-Verteilung (Gleichung 1) –

im Mittel ein Enzymmolekül pro Kammer vorhanden ($\mu = 1$). Allerdings enthalten bei dieser Verteilung einige Kammern mehrere, andere dagegen kein Enzymmolekül. Um tatsächlich nur ein Enzymmolekül in den Kammern zu beobachten, muss die Enzymkonzentration noch weiter reduziert werden. Bei einer Enzymkonzentration von 1,8 pM ($\mu = 0.05$) ist im Mittel nur jede 20. Kammer besetzt ($P_{0.05}(1) = 5\%$). In diesem Fall bleibt zwar ein Großteil der Reaktionsgefäße leer ($P_{0.05}(0) = 95\%$), die besetzten Kammern enthalten jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nur ein einziges Enzymmolekül ($P_{0.05}(> 1) = 0.1\%$). Bei einem Femtoliter-Array, der aus 62.500 Kammern besteht, können auch bei einer Belegung von nur 5% der Kammern noch immer über 3.000 Einzelmoleküle parallel verfolgt werden. Der hohe Grad der Parallelisierung ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu anderen Einzelmolekül-Techniken, weil sich eine statistisch repräsentative Population individueller Moleküle analysieren lässt. Eine empfindliche fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Einzelmolekülkinetik im Femtoliter-Array erfolgt durch eine CMOS (complementary metal oxide semiconductor) Kamera.

Femtoliter-Arrays lassen sich nicht nur durch Photolithographie in Glas herstellen, sondern auch indem man PDMS (polydimethylsiloxan) auf eine Negativform gießt. Die PDMS-Folie kann nach dem Aushärten von der Negativform abgezogen und für Einzelmessungen verwendet werden.¹² Femtoliter-Arrays aus PDMS bieten den Vorteil, dass sie, aufgrund der Wiederverwendbarkeit der Negativform kostengünstig und mit niedrigem Aufwand in großer Anzahl hergestellt werden können. Allerdings ist PDMS im Gegensatz zu Quarzglas nicht

starr, sondern kann sich beim Verschließen des Arrays unter mechanischem Druck verformen. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, ist es erforderlich, den Druck sehr genau einzustellen.

Das Modellenzym β -Galactosidase ist aufgrund seiner großen Stabilität und seines hohen Substratumsatzes besonders gut für Einzelenzymstudien geeignet. In den Reaktionskammern des Femtoliter-Arrays, in denen sich ein β -Galactosidase-Molekül befindet, wird das farblose Substrat Resorufin- β -D-Galactopyranosid zu β -Galactose und fluoreszierendem Resorufin umgesetzt, das unter dem Fluoreszenzmikroskop nachweisbar ist. Auf diese Weise konnten wir die statische Heterogenität innerhalb einer Population von β -Galactosidase-Molekülen sowohl in Femtoliter-Arrays aus Quarzglas als auch in Arrays aus PDMS bestimmen und somit Hinweise auf die strukturelle Flexibilität dieses Enzyms erhalten.

Die hohe Sensitivität der Messungen in planaren Quarzglas-Arrays ermöglichte es uns ebenfalls, das weniger aktive Redox-Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) auf der Einzelmolekül-Ebene zu beobachten¹³. In einer komplexen Enzymreaktion durchläuft die Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum von HRP einen dreistufigen Redox-Zyklus (Abbildung 3). Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert den Grundzustand der Häm-Gruppe in einem konventionellen zwei-Elektronentransferschritt. Die Reduktion zurück zum Grundzustand erfolgt über ein Intermediat in zwei aufeinander folgenden Ein-Elektronentransferschritten. Dabei wird das Substrat Amplex Red zu zwei nicht-fluoreszierenden Radikalmolekülen oxidiert, welche anschließend in Amplex Red und das fluoreszierende

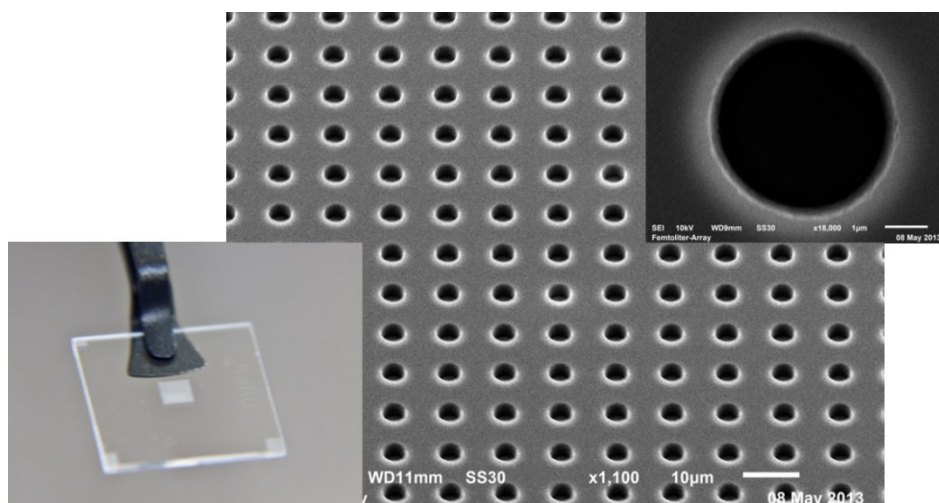


Abb. 2. Ansicht eines Femtoliter-Arrays unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM). Der Array besteht aus homogenen zylindrischen Reaktionsgefäßen mit einem Durchmesser von 4 μm und einer Tiefe von 3 μm (Vergrößerte Ansicht rechts oben). Aufgrund der gezielten Strukturierung der Glasoberfläche gelingt eine gleichmäßige Anordnung der Kammern im Zentrum des Glasplättchens (links unten).

Resorufin dismutieren. Bei jedem Umsatz eines H_2O_2 -Moleküls im katalytischen Zyklus der HRP entsteht dementsprechend ein Molekül Resorufin.

Schließlich bietet die Forschung auf der Einzelenzymebene auch die Aussicht, das ultimative Ziel der Analytik zu erreichen: den Nachweis eines einzigen Analyt-Moleküls in einer Probe. Normalerweise wird die Konzentration eines Analyten im konventionellen Ensemble-Maßstab bestimmt, wobei Millionen von Molekülen erforderlich sind, um die Nachweisgrenze zu erreichen. In Femtoliter-Arrays hingegen kann ein einzelnes Enzymmolekül eine ausreichend hohe lokale Konzentration an fluoreszierendem Produkt für eine fluoreszenzmikroskopische Detektion generieren. Der prozentuale Anteil belegter Reaktionskammern korreliert dabei mit der Enzymkonzentration und ist bei niedrigen Konzentrationen Poisson-verteilt (Gleichung 1). Somit lässt sich durch einfaches Auszählen („ja/nein“-Antwort) der belegten Reaktionskammern die Enzymkonzentration digital bestimmen, und zwar weit unterhalb der Nachweisgrenze traditioneller Methoden.¹⁴ Diese Art der digitalen Konzentrationsbestimmung durch Einzelenzym-Detektion kann zum Beispiel auch für die Entwicklung von Immunoassays im Einzelmolekül-Maßstab verwendet werden. Hierbei steht nicht die Enzymkinetik im Fokus der Betrachtung, sondern das Enzym wird als Antikörper-Konjugat zum Nachweis von Proteinen in Blut oder Urin eingesetzt. Da die Aktivität eines einzelnen Enzymmoleküls detektierbar ist, ist im Prinzip auch ein einzelnes Analytmolekül nachweisbar, an das das Antikörper-Enzym-Konjugat gebunden hat.

Zusammenfassung

Femtoliter-Arrays aus tausenden von parallel angeordneten und homogenen Reaktionsgefäßen lassen sich durch Photolithographie und anschließendem Ätzen in Quarzglas herstellen. Sie bieten eine vielseitig einsetzbare Plattform zur Isolierung einzelner Enzymmoleküle und zur Analyse der individuellen Enzymdynamik in biochemischen Prozessen. Darüber hinaus ermöglichen Femtoliter-Arrays den Aufbau eines sogenannten digitalen Immunoassays, mit dem beispielsweise Proteine in biologischen Proben auf der Einzelmolekül-Ebene nachgewiesen werden können. Auf diese Weise lässt sich die Nachweisgrenze im Vergleich zu konventionellen Immunoassays drastisch senken.

Das Projekt „Femtoliter-Arrays für die Analyse von Einzel-Molekül-Mechanismen von Enzymen (GO 1968/3-1)“ wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt

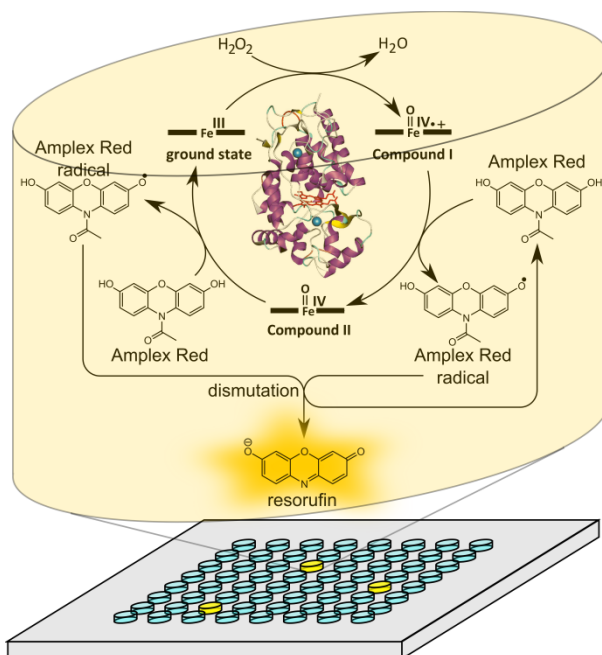


Abb. 3. Substratumsatz individueller HRP-Moleküle in einem Array aus homogen angeordneten Femtoliter-Kammern. Durch Einsatz einer sehr niedrigen HRP-Konzentration, wird gewährleistet, dass sich in jedem besetzten Reaktionsgefäß nur ein Enzymmolekül befindet. HRP katalysiert die Bildung von nicht-fluoreszierenden Amplex Red-Radikalen, woraus anschließend in einer Disproportionierungs-Reaktion fluoreszierendes Resorufin gebildet wird. Die Aufnahme der Einzelmolekülkinetik erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop (Copyright RSC, 2013)¹³

Literatur

- (1) Gorris, H. H.; Walt, D. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 3880-3895.
- (2) Rissin, D. M.; Gorris, H. H.; Walt, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 5349-5353.
- (3) English, B. P.; Min, W.; van Oijen, A. M.; Lee, K. T.; Luo, G.; Sun, H.; Cherayil, B. J.; Kou, S. C.; Xie, X. S. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2, 87-94.
- (4) Claessen, V. I.; Engelkamp, H.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Nolte, R. J. M.; Blank, K.; Rowan, A. E. *Annual Reviews of Analytical Chemistry* **2010**, 3, 319-340.
- (5) Rotman, B. *Proceeding of the National Acadademy of Sciences USA* **1961**, 47, 1981-1991.
- (6) Comellas-Aragones, M.; Engelkamp, H.; Claessen, V. I.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Rowan, A. E.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Verduin, B. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 635-639.
- (7) Craig, D. B.; Nachtigall, J. T.; Ash, H. L.; Shoemaker, G. K.; Dyck, A. C.; Wawrykow, T. M.; Gudbjartson, H. L. *Journal of Protein Chemistry* **2003**, 22, 555-561.
- (8) Craig, D. B.; Morris, T. T.; Ong-Justiniano, C. M. Q. *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 4598-4602.
- (9) Gorris, H. H.; Blicharz, T. M.; Walt, D. R. *FEBS Journal* **2007**, 274, 5462-5470.
- (10) Gorris, H. H.; Rissin, D. M.; Walt, D. R. *Proceeding of the National Acadademy of Sciences USA* **2007**, 104, 17680-17685.
- (11) Gorris, H. H.; Walt, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 6277-6282.
- (12) Rondelez, Y.; Tresset, G.; Tabata, K. V.; Arata, H.; Fujita, H.; Takeuchi, S.; Noji, H. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 361-365.
- (13) Ehrl, B. N.; Liebherr, R. B.; Gorris, H. H. *Analyst* **2013**, in press.
- (14) Rissin, D. M.; Kan, C. W.; Campbell, T. G.; Howes, S. C.; Fournier, D. R.; Song, L.; Piech, T.; Patel, P. P.; Chang, L.; Rivnak, A. J.; Ferrell, E. P.; Randall, J. D.; Provuncher, G. K.; Walt, D. R.; Duffy, D. C. *Nature Biotechnology* **2010**, 28, 595-599.