

Protein-Mikroarray-Verfahren

Protein-Mikroarray-Technologie – Prinzipien und neuere Entwicklungen

David S. Wilson und Steffen Nock*

Stichwörter:

Immunassays · Mehrfachanalysen · Proteine · Proteomik · Wirkstoff-Design

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms, die Entwicklung von DNA-Chips und die Bioinformatikprogramme ermöglichen, ganzheitliche Blicke auf biologische Systeme zu werfen und die natürlich vorkommenden genetischen Variationen zu untersuchen. Antikörper-Mikroarrays können die Konzentration vieler Proteine gleichzeitig und schnell messen. Mikroarrays genetisch kodierter Proteine ermöglichen Wissenschaftlern, das gesamte Genom nach Proteinen zu durchsuchen, die mit bestimmten Faktoren interagieren, bestimmte Reaktionen katalysieren oder als Substrate für Protein-modifizierende Enzyme sowie als Zielproteine bei einer Autoimmunreaktion dienen. Die neuartigen Protein-Mikroarray-Verfahren werden die Entdeckung und Entwicklung von Wirkstoffen sowie diagnostischen Biomarkern stark beschleunigen.

Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten haben Proteinbiochemiker die Molekularbiologen, die sich hauptsächlich mit Nucleinsäuren beschäftigten, um deren schnellen wissenschaftlichen Fortschritt – beispielsweise bei der Sequenzierung des menschlichen Genoms – beneidet. Einer der Erfolge in der Nucleinsäurebiotechnologie ist die Entwicklung von DNA-Mikroarrays, durch die die Expression von tausenden von Genen auf der Ebene der mRNA in einem einzigen Experiment erfasst werden können. Diese Erfolge sind im Wesentlichen auf Verbesserungen der Oligonucleotidsynthese, der DNA-Sequenzierung, der Detektion von DNA und RNA auf der Basis von Hybridisierungen und nicht zuletzt der Bioinformatik zurückzuführen. Speziell die Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung dieser Verfahren haben zu einer radikalen Beschleunigung der Datengewinnung geführt.

Trotz der technologischen Vorteile, die beim Analysieren von Nucleinsäuren anders als beim Analysieren von Pro-

teinen bestehen, sind Letztere die Produkte nahezu aller Gene und das Ziel pharmazeutischer Untersuchungen. Um mit den analytischen Methoden für Nucleinsäuren gleich zu ziehen, müssen neuartige Analysemethoden für Proteine entwickelt werden. Ein Schritt in diese Richtung ist die Ent-

wicklung von Protein-Mikroarrays, über die schon ausführlich berichtet wurde.^[1–5] Wie bei DNA-Arrays wird auch bei Protein-Arrays eine Miniaturisierung und Parallelisierung erreicht und damit die Zahl an gewonnenen Datenpunkten bezogen auf das Volumen der biologischen Probe drastisch erhöht. Wenn eine Probe von 100 µL auf eine Fläche mit 10000 räumlich und biochemisch unterschiedlichen Einheiten aufgebracht wird (beispielsweise ist jede Einheit mit einem unterschiedlichen Antikörper beladen – siehe Abbildung 1), dann können 10000 Einzeldaten in einem einzigen Experiment erhalten werden. Ein gewöhnlicher ELISA-Test auf einer 96er Titerplatte mit dem gleichen Probenvolumen würde hingegen nur einen einzigen Datenpunkt liefern.

Identifizierung molekularer Muster

Biologische Proteinproben sind oft sehr kostbar, nur in kleinen Volumina erhältlich und, anders als DNA-Proben, nicht vermehrbar. Die Möglichkeit, durch Protein-Mikroarrays die Zahl der Datenpunkte pro Probenvolumen zu maximieren, ist somit für Proteinexpressionsuntersuchungen unerlässlich. Durch den Einsatz von Protein-Mikroarrays können im Gegensatz zu konventionellen Methoden zahlreiche potenzielle molekulare Marker für pathologische Zustände identifiziert werden. Dies erhöht nicht nur die Wahr-

[*] S. Nock, D. S. Wilson
Department of Biochemistry
Zyomyx, Inc.
26101 Research Road, Hayward, CA 94545 (USA)
Fax: (+1) 510-784-2569
E-mail: snock@zyomyx.com

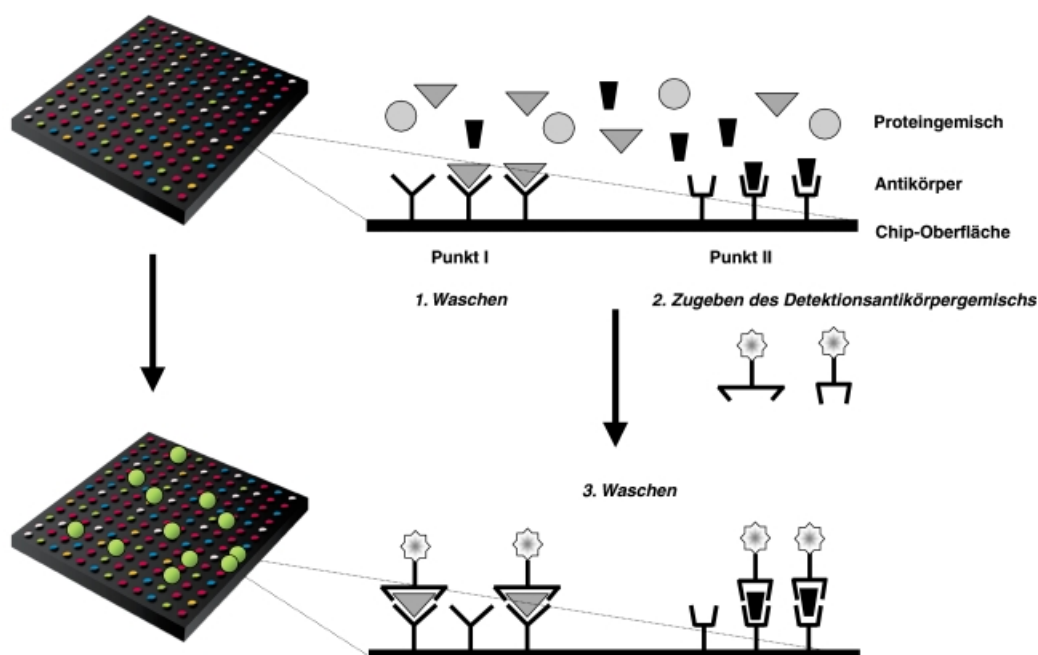


Abbildung 1. Einsatz von Protein-Mikroarrays bei der Proteinexpressionsmuster-Erkennung. Links oben wird eine schematische Darstellung eines 12×14-Antikörper-Arrays gezeigt. Jeder Punkt ist mit einem bestimmten Antikörper beladen (rechts oben). Dies ermöglicht, bis zu 168 Proteinen gleichzeitig zu messen. Zuerst wird eine komplexe Proteinmischung (die biologische Probe) mit dem Antikörper-Array in Kontakt gebracht. Jeder Punkt auf dem Array bindet eine Proteinspezies aus der komplexen Proteinmischung. Nach der Äquilibration wird der Array gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Sind die zu analysierenden Proteine mit fluoreszierenden Gruppen markiert, können die am Array gebundenen Proteine direkt gemessen werden (dies ist nicht gezeigt). Alternativ kann ein Gemisch von markierten Detektionsantikörpern zum Array gegeben werden, um an den Punkten, an welchen das zu analysierende Protein gebunden hat, „Sandwich-Komplexe“ zu bilden (unten rechts). Danach wird der Array gewaschen und das Fluoreszenzsignal auf den einzelnen Punkten quantifiziert.

scheinlichkeit, passende Marker zu finden, sondern ermöglicht zugleich, Proteinmuster (Biosignaturen) für die Diagnose zu ermitteln, die mit einem konventionellen Ansatz – hier wird die Menge einzelner Proteine bestimmten Krankheitsstadien zugeordnet – verfehlt werden könnten. Dass pathologische Zustände anders als einzelne Marker mit bestimmten Genexpressionsmustern korrelieren, wurde für verschiedene Krebsarten auf der Ebene der mRNA eindeutig nachgewiesen.^[6–12] Diese Arbeiten zeigen auch, dass durch die Bestimmung von Genexpressionsmustern histologisch nicht unterscheidbare Tumorarten taxonomisch weiter aufgeteilt werden können und dass dieser molekulare Unterschied mit

der Krankheitsprognose und der Wirkung der Therapie auf die Tumore gut korreliert.

Auch die Signalintensitäten von Proteinexpressionsmustern können Aussagen über pathologische Zustände ermöglichen. Petricoin et al.^[13] führten SELDI-massenspektrometrische Untersuchungen an hydrophob extrahierten Serumproteinen und -peptiden von Patientinnen mit Eierstockkrebs durch und verglichen die Muster der m/z -Signale mit denen von gesunden Personen (SELDI = Oberflächenverstärkte Laserdesorption/-ionisation, m/z = Masse/Ladung). Die Muster wurden mit einer neuartigen Mustererkennungsmethode analysiert. Diese Methode kombiniert genetische Algorith-



Steffen Nock, geboren 1967, studierte Biochemie an der Universität Bayreuth. 1993 begann er mit seiner Promotion über Guaninnucleotid-bindende Proteine in Prokaryoten unter Anleitung von Mathias Sprinzl in Zusammenarbeit mit Roger Goody am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund. Nach seiner Promotion im Jahr 1996 forschte er als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft am Department of Biochemistry der Stanford University. 1998 war er Mitbegründer der Zyomyx, Inc., einer Biotechnologie-Firma, die Protein-Mikroarrays entwickelt.



David S. Wilson wurde 1965 in New York geboren und erhielt seinen B.S. in Biochemie von der University of California, Berkeley. Seinen Ph.D. in Biochemie und Biophysik unter der Anleitung von Claude Desplan und John Kuriyan erhielt er von der Rockefeller University. 1996 erhielt er ein Postdoktorandenstipendium von der Cancer Research Foundation of the Damon Runyon-Walter Winchell Foundation, um im Labor von Jack W. Szostak am Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School zu forschen. Er wechselte im Jahr 2000 zu Zyomyx, Inc. und ist dort Manager of Protein Engineering.

men mit Algorithmen der Clusteranalyse, um die Muster der Signalintensitäten mit pathologischen Zuständen gleichzusetzen. Der neuartige Algorithmus deckte ein Muster mit fünf verschiedenen *m/z*-Verhältnissen auf, das es ermöglichte, bösartige Eierstocktumore an allen getesteten Patientinnen zu diagnostizieren mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 5 % für falsch-positive Ergebnisse. Dies ergab einen wesentlich höheren Prädiktionswert (94 %) als der für den üblicherweise genutzten Serumbiomarker für Eierstockkrebs, Krebs-Antigen 125 (CA125). CA125 hat einen Prädiktionswert von nur 10 %.

Die Untersuchung zeigt deutlich den Vorteil von Parallelmessungen zur Bestimmung von Proteinmustern. Die Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit, solche Vergleiche anzustellen und hat zudem den Vorteil, die Muster verschiedener *m/z*-Verhältnisse nutzen zu können, ohne die genaue Identität des Proteins zu kennen. Nachteile dieser Methode liegen in dem geringen Probendurchsatz bezogen auf immunologische Tests und in der genauen Identifizierung der molekularen Marker. Sind diese Marker jedoch identifiziert, können Antikörper entwickelt werden, welche dann in parallelen immunologischen Tests eingesetzt werden. Diese immunologischen Tests haben neben einer höheren Empfindlichkeit und einer genauen Quantifizierung auch einen deutlich höheren Probendurchsatz. Qualitative Methoden wie die Massenspektrometrie und quantitative Methoden wie immunologische Tests mit hohem Durchsatz, die tausende von Proben unterschiedlicher Patientengruppen testen können, ergänzen sich daher hervorragend.

Miniaturisierte Immunassays

Das Miniaturisieren und Parallelisieren immunologischer Assays zur Bestimmung von Proteinen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Übersichtsartikel.^[3–5] Schweitzer et al.^[14] haben einen Mikroarray mit Antikörpern vorgestellt, der 75 Cytokine (lösliche Signalproteine, die an der Immunantwort beteiligt sind) gleichzeitig messen kann. Antikörper mit bekannter Spezifität wurden dafür auf Glasobjektträger aufgebracht, mit biologischen Proben inkubiert, gewaschen und anschließend einer Mischung von Detektionsantikörpern ausgesetzt (Abbildung 1). Die Detektionsantikörper, deren Spezifität ebenfalls bekannt war, wurden so gewählt, dass sie an andere Regionen (Epitope) der Cytokine binden als die oberflächengebundenen Antikörper. Es ist daher möglich, Cytokine aus biologischen Proben zwischen den oberflächengebundenen Antikörpern und den Detektionsantikörpern zu binden – es entsteht ein stabiler „Sandwich-Komplex“. Die Detektionsantikörper sind gewöhnlich mit fluoreszierenden Stoffen markiert, die mit einem konfokalen Fluoreszenzscanner ähnlich den für die Auslese bei den DNA-Mikroarrays entwickelten detektiert werden können. Oft ist jedoch die Empfindlichkeit dieser Methode ungenügend und reicht nicht aus, geringe Proteinkonzentrationen beispielsweise von Cytokinen zu bestimmen.

Mit der neuartigen Signalverstärkungsmethode RCA kann die Empfindlichkeit erhöht werden (RCA = rolling circles amplification). Das Prinzip dieser Methode beruht

auch auf einem Sandwich-Immunassay. Die Detektionsantikörper sind in diesem Fall mit DNA-Sequenzen modifiziert. Nachdem die Detektionsantikörper an die Antigene auf dem Protein-Mikroarray gebunden haben, werden ihre DNA-Sequenzen direkt von einer DNA-Polymerase verlängert. Dadurch werden lange DNA-Polymere von bekannter Sequenz gebildet, die an dem jeweiligen Detektionsantikörper und somit auf dem dazugehörigen Punkt des Protein-Mikroarrays hängen. Nach dem Polymerisationschritt wird die verlängerte DNA-Sequenz mit komplementären, fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonucleotiden hybridisiert. Da die verlängerten DNA-Polymere sehr lang sind, werden mehrere Oligonucleotide und somit mehrere fluoreszierende Gruppen an jeden Antikörper gebunden.

Mit dieser RCA-Sandwich-Methode ist es Schweitzer et al.^[14] gelungen, Cytokine auch in physiologischen Konzentrationen, die im pico- und subpicomolaren Bereich liegen, zu detektieren. Diese Methode wurde verwendet, um die Expression von 51 Cytokinen in kultivierten Zellen nach der Stimulation mit Lipopolysacchariden oder dem Tumornekrosefaktor α zu verfolgen. Wenige Mikroliter des Zellkulturüberstandes waren ausreichend, um an mehreren Zeitpunkten nach der Induktion die Konzentration der Cytokine zu messen. Hätte man das gleiche Projekt auf konventionelle Weise mithilfe von gewöhnlichen Immunassays durchgeführt, wäre dafür ein tausendmal größeres Probenvolumen nötig gewesen. Den Autoren war es somit möglich, eine erhöhte Sekretion von zahlreichen Cytokinen in den Zellüberständen zu verfolgen. Die Daten wurden anschließend durch Vergleichsmessungen mit gewöhnlichen ELISA-Methoden bestätigt.

Eine Alternative zu der Nucleinsäure-gestützten Amplifikationsmethode besteht darin, einerseits die sekundären Detektionsantikörper mit einem stark fluoreszierenden Marker (Phycoerythrin) zu markieren und andererseits die Oberflächenchemie und die Orientierung des gebundenen Antikörpers zu verbessern (Abbildung 2). Auf diese Art und Weise können proteinabweisende Oberflächen mit einer dicht gepackten Einzelschicht von räumlich orientierten Antikörperfragmenten hergestellt werden, die nahezu 100 % aktiv sind.^[15]

Antikörper-Arrays mit hunderten von verschiedenen Antikörpern werden zur Zeit von BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA) und Hypermatrix (Millbury, MA) kommerziell zur Verfügung gestellt. Die Nutzung dieser Produkte erfordert jedoch eine direkte Markierung der biologischen Probe (z. B. mit einer fluoreszierenden Gruppe), bevor sie mit dem Array inkubiert wird. Danach wird der Array gewaschen und die gebundenen fluoreszenzmarkierten Proteine mithilfe eines Fluoreszenzscanners auf den jeweiligen Antikörperpunkt detektiert. Alternativ kann man auch zwei unterschiedliche Proben (z. B. eine physiologische und eine pathologische) mit verschiedenen fluoreszierenden Gruppen markieren, die Proben vereinigen und anschließend das Probengemisch auf den Array aufbringen^[16] (Abbildung 3). Unterschiede in der Konzentration der jeweiligen Proteine werden durch die relative Intensität der Fluoreszenz der beiden Fluorophore auf dem entsprechenden Antikörperpunkt des Arrays detektiert. Ein genereller Nachteil dieser

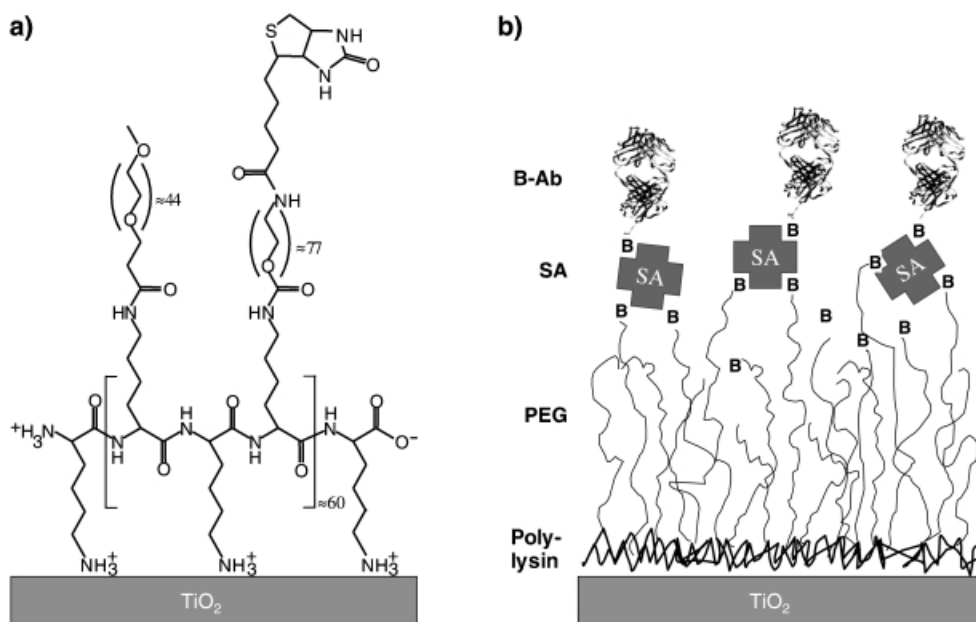


Abbildung 2. Eine Oberflächenchemie, die gegenüber nicht-spezifischer Proteinbindung resistent ist und gleichzeitig die Derivatisierung durch Antikörper ermöglicht. a) Die Struktur des Poly(L-lysin-PEG-biotin)-Copolymeren, das an eine negativ geladene Oberfläche wie TiO_2 adsorbiert. Die Methoxy-PEG- und Biotin-PEG-Ketten werden an 20 bzw. 9% der Lysin-Seitenketten angehängt. b) Eine schematische Darstellung dieser Oberfläche nach der Derivatisierung mit Streptavidin (SA). Da SA tetravalent ist, können biotinylierte Antikörper (B-Ab) oder PEG-Fragmente (wie gezeigt) an die freien Bindungsstellen des SA gebunden werden.

Methode liegt in der verhältnismäßig geringen Empfindlichkeit dieses Assays bezogen auf den ELISA-Test und einer oftmals stark variierenden Effizienz der Pobenmarkierung.

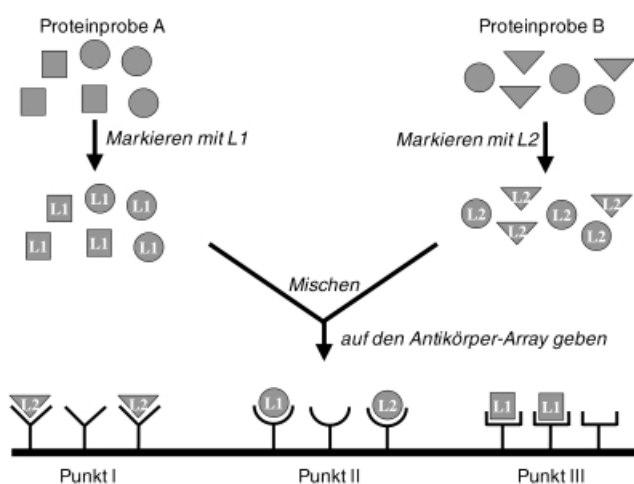


Abbildung 3. Differenzielle Proteinexpressionsmuster-Erkennung. Zwei verschiedene Proteinproben (physiologisch gegenüber pathologisch) werden mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Gruppen, L1 und L2, markiert. Die zwei Proben werden anschließend gemischt und auf einen Antikörper-Array gegeben. Die markierten Proteine der Probe binden an die verschiedenen Antikörper entsprechend ihrer Spezifität. Punkt I zeigt ein hohes Signal für L2 und ein niedriges für L1. Daraus kann geschlossen werden, dass in der Proteinprobe B die Konzentration des entsprechenden Proteins höher ist als in der Probe A. Die umgekehrte Situation findet man auf Punkt III. Punkt II zeigt die gleiche Fluoreszenzintensität für L1 und L2, was bedeutet, dass die Konzentrationen der entsprechenden Protein gleich hoch sind.

Proteine, die in geringer Konzentration in der Probe vorliegen, können hierbei oftmals nicht detektiert werden.^[16]

Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen können auch zum Testen der Immunantwort eines Patienten herangezogen werden. Dazu wird das Patientenserum auf Protein-Mikroarrays aufgebracht, die aus immobilisierten Antigenen bestehen (Abbildung 4). Diese Antigen-Mikroarrays können somit Aufschluss über einen möglichen Kontakt des Patienten mit pathogenen Keimen, das Vorliegen allergischer Reaktionen oder das Vorhandensein einer Autoimmunkrankheit geben. Robinson et al.^[17] entwickelten einen Mikroarray mit 196 bekannten Antigenen und testeten damit die Seren von Patienten mit sechs verschiedenen Autoimmunkrankheiten. Sie konnten dadurch Antikörpermuster identifizieren, die es ermöglichten, die unterschiedlichen Krankheiten zu unterscheiden. Diese Ergebnisse wurden durch konventionelle ELISA-Methoden bestätigt. Die verschiedenen Unterklassen der Autoimmunantikörper konnten sogar bestimmt werden, indem der Array anschließend mit verschiedenen Unterklassen-spezifischen Antikörpern inkubiert wurde, die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Gruppen markiert waren. Für die meisten Autoimmunantigene konnte mithilfe dieses Arrays die physiologische Konzentration der Autoimmunantikörper detektiert werden.

Die Nachweisgrenze des Arrays war auch hier ähnlich wie oder besser als bei konventionellen ELISAs. Einige der Antigene wurden jedoch von den Antikörpern nicht erkannt. Dies ist wahrscheinlich auf eine Oberflächen-induzierte Denaturierung der Antigene zurückzuführen. Zur Lösung dieses Problems schlagen die Autoren vor, die Oberfläche (Polylysin-beschichtetes Glas zur unspezifischen Physisorption der Proteine) durch ein biologisch kompatibleres Mate-

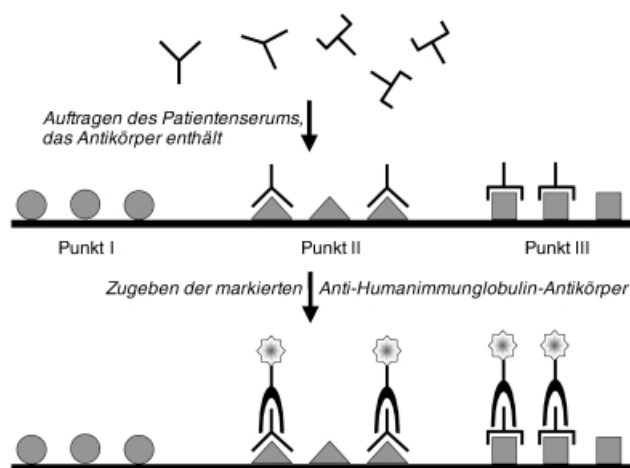


Abbildung 4. Antigen-Arrays zur Analyse von Immunantworten. Die Konfiguration der Arrays ist bezogen auf die in der vorherigen Abbildung gezeigten Arrays umgekehrt. Wird das Patientenserum, das Immunglobuline (Antikörper) enthält, mit einem Antigen-Array in Kontakt gebracht, binden die Antikörper im Serum spezifisch an die verschiedenen Antigene, die sich auf den einzelnen Punkten auf dem Array befinden. Nachdem die ungebundenen Immunglobuline abgewaschen sind, wird ein markierter Anti-Humanimmunglobulin-Antikörper dazugegeben. Dieser erkennt die gebundenen Humanantikörper auf dem Array. Dadurch wird indirekt die Antikörperantwort auf die unterschiedlichen Antigene im Patientenserum aufgedeckt.

rial zu ersetzen. Zum Testen von Immunantworten gegen Antigene, die hauptsächlich auf der Basis von Kohlenhydraten aufgebaut sind, wurden Nitrocellulose-beschichtete Objektträger erfolgreich eingesetzt.^[18] Dieser Erfolg ist besonders wichtig, da die immunogenen Gruppen von infektiösen Pathogenen häufig aus Polysacchariden bestehen.

Andere mögliche Anwendungsgebiete von Antigen-Arrays sind die Suche nach krebstpezifischen Autoimmunantigenen, die zur Entwicklung von neuartigen Diagnoseverfahren und Tumortheraeutika führen könnten. Antigen-Arrays könnten auch zur einer systematischeren Entwicklung von Impfmitteln eingesetzt werden.

Mikroarray-Formate

Protein-Mikroarrays können neben der Bestimmung von Protein- und Antikörperkonzentrationen in biologischen Proben auch zum Messen der Proteinaktivität genutzt werden. Zhu et al.^[19] haben nahezu alle 5800 Hefegene exprimiert, die entsprechenden Proteine in kleinen Mengen aufgereinigt und auf einen Glasobjektträger immobilisiert. Diese Proteom-Chips wurden anschließend mit markierten Molekülen inkubiert, um wechselwirkende Hefeproteine nachzuweisen. Die Experimente führten zur Identifizierung von mehreren Proteinen, die an das Protein Calmodulin und an bestimmte Lipide binden.

Auch die enzymatische Aktivität von Proteinen kann im Mikroarray-Format getestet werden. Arrays aus Substratpeptiden und Kinasen wurden beispielsweise dazu genutzt, die Spezifität von praktisch allen Hefekinasen zu bestimmen.^[20] Houseman et al.^[21] beschrieben eine Oberfläche, deren che-

mische Eigenschaften es ermöglicht, Enzym-Substrat-Wechselwirkungen quantitativ zu erfassen. Diese Oberfläche ist proteinabweisend und hat eine definierte Dichte, wobei die kovalent gebundenen Substrate homogen angeordnet sind. Eine solche Oberfläche wurde durch die Selbstorganisation von Polyethylenglycol(PEG)-terminierten Alkanthiolen zu organischen Dünnschichten auf Goldoberflächen gebildet. PEG-Gruppen sind für ihre proteinabweisende Eigenschaft bekannt. Darüber hinaus ist ein Teil der PEG-Gruppen auf dieser Oberfläche zusätzlich mit einer ω -Benzochinongruppe funktionalisiert. Diese Gruppe kann mit Cyclopentadien-konjugierten Peptiden eine kovalente Bindung eingehen. Dadurch ist es möglich, die Peptidsubstrate auf eine sehr homogene und gut charakterisierte Oberfläche zu binden. Dies minimiert einen möglichen negativen Einfluss der Oberfläche auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Die Autoren zeigten, dass die Peptide enzymatisch von einer Proteinkinase phosphoryliert werden können. Sie erhielten auch Informationen über die Substratspezifität und die Kinetik der Phosphorylierung. Die Phosphorylierung wurde dabei entweder direkt durch Inkubation der gebundenen Substrate mit der Kinase und radioaktiv markiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gemessen oder indirekt durch Reaktion des phosphorylierten Tyrosins mit einem fluoreszierenden Antikörper bestimmt (ATP = Adenosintriphosphat). Mithilfe dieses Systems konnten die Autoren auch die Inhibitionskonstanten von verschiedenen Kinaseinhibitoren bestimmen.

Eine der größten Herausforderungen für die Protein-Mikroarray-Technologie ist der Einsatz von Membranproteinen. Zu dieser Proteinklasse zählen mehr als 50 % der derzeitigen Zielverbindungen der Arzneimittelforschung.^[22] Erst vor kurzem wurde eine Methode zur Immobilisierung von Membranproteinen auf Mikroarrays beschrieben. Fang et al.^[22] gelang es, auf mit Aminopropylsilan behandelten Glasobjektträgern eine Membran aus einer Lipiddoppelschicht so aufzubringen, dass sie stabil gegenüber dem Waschen mit wässrigen Puffern sowie der Dehydratisierung ist und gleichzeitig ihre Fluidität behält. Die Autoren zeigten, dass G-Protein-gebundene Rezeptoren, die eine der wichtigsten Arzneimittelzielverbindungen sind, auf diese Glasobjektträger in ihrer aktiven Form gebunden werden können.

Ionenkanäle sind eine weitere wichtige Klasse von Membranproteinen. Chip-gestützte Methoden, die die Messung von Ionenströmen durch solche Kanäle ermöglichen, werden gerade entwickelt. Die dafür benötigten Membranen müssen so immobilisiert werden, dass ihre isolierenden Eigenschaften erhalten bleiben. Hierdurch wird sicher gestellt, dass die gemessene Leitfähigkeit des Systems auf die Aktivität der eingebetteten Kanalproteine und nicht auf Defekte in der Membranstruktur zurückzuführen ist.^[23] Arrays aus verschiedenen, in Membranen eingebetteten Ionenkanälen, bei denen jeder Punkt einzeln mit einer Mikroelektrode analysiert werden kann, können die Suche nach solchen Substanzen erleichtern, die die Leitfähigkeit der Kanalproteine beeinflussen.

Ein weiteres neuartiges Konzept für Protein-Mikroarrays wird als Affinitäts-Kontakt-Druck (affinity contact printing) bezeichnet.^[24] Diese Methode beruht auf dem Gebrauch eines dreidimensionalen Chips, bei dem flache Strukturen („Tafel-

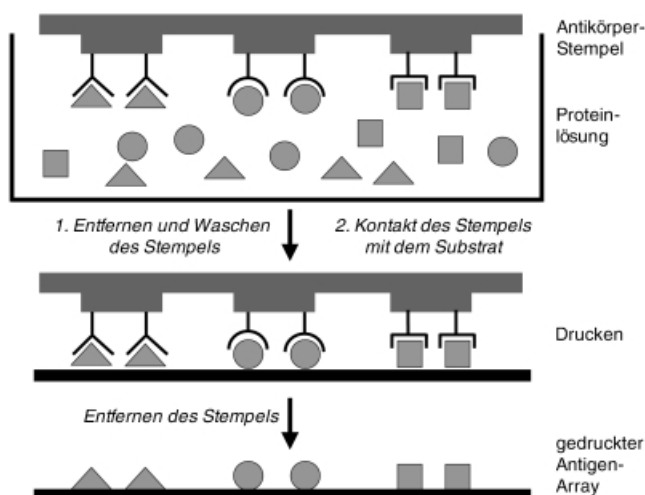


Abbildung 5. Affinitäts-Kontakt-Druck. Auf die hervorstehenden Strukturen eines Stempels werden Antikörper (oder anderen Affinitätsreagentien) kovalent gebunden. Dieser Stempel wird dann durch Eintauchen in eine Proteinlösung „eingefärbt“. Nach dem Waschen wird der eingefärbte Stempel mit einem Substrat, welches Proteine mit einer höheren Affinität als die der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung bindet, in Kontakt gebracht. Dieser beladene Stempel kann nun zur Erstellung definierter Druckmuster von Proteinen auf Substratoberflächen genutzt werden.

berge“) aus dem Chipsockel herausragen (Abbildung 5). Verschiedene Proteine können kovalent auf die erhobenen Strukturen gebunden werden. Der Chip wird anschließend in die Lösung eines Proteingemischs getaucht, was zur Folge hat, dass die kovalent gebundenen Proteine interagierende Proteine aus dem Gemisch auf den Flächen der „Tafelberge“ binden. Der Chip dient somit als Reinigungs- und Konzentrationsvorrichtung. Als nächstes wird der Chip aus der Proteinlösung entfernt, gewaschen und als Stempel genutzt: Er wird mit einer Oberfläche mit hoher unspezifischer Proteinbindungsaffinität in Kontakt gebracht. Die spezifisch gebundenen Proteine werden hierbei auf die Oberfläche transferiert (die „gedruckte Oberfläche“), während die kovalent gebundenen Proteine am Stempel zurück bleiben. Die gedruckte Oberfläche kann mithilfe der Massenspektrometrie oder anderen Methoden analysiert werden. Einige der gedruckten Proteine behalten sogar ihre biologische Aktivität bei.

Protein-Mikroarrays in der Arzneimittelentwicklung

Die technologischen Fortschritte in der Genom- und Proteomforschung haben zur Entdeckung von zahlreichen potenziellen Wirkstoffen geführt. Nahezu alle Zielmoleküle sind Proteine. Diese potenziellen Wirkstoffe müssen validiert und nach Wichtigkeit geordnet werden. Um dies effizient durchführen zu können, müssen neuartige Hilfsmittel entwickelt werden. Diese Hilfsmittel müssen so konzipiert sein, dass sie auch für andere Engpässe in der Arzneimittelentwicklung nützlich sind – z. B. sollten sie helfen, vorklinische und klinische Studien effizienter zu gestalten. Protein-Mikroarrays werden entscheidend dazu beitragen, die Entwicklung von therapeutischen und diagnostischen Biomarkern effizient voranzutreiben. Abbildung 6 zeigt die verschiedenen Stadien dieser Prozesse und hebt insbesondere die Gebiete heraus, bei denen Protein-Biochips häufig eingesetzt werden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt haben Protein-Mikroarrays auf die frühe Phase der Arzneimittelentwicklung wenig Einfluss. Dies ist auf die limitierte Zahl validierter Antikörper zurückzuführen, die für Expressionsuntersuchungen potenzieller Arzneimittel herangezogen werden können. Für das Auffinden solcher Zielverbindungen sind andere Genom- und Proteomverfahren besser geeignet, z. B. DNA-Arrays zum Messen der mRNA-Expression und zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit Massenspektrometrie zur Proteinidentifizierung. Sind diese potenziellen Wirkstoffe jedoch identifiziert, müssen sie in einen biologischen Zusammenhang gebracht werden (beispielsweise bestimmten Signaltransduktionswegen zugeordnet werden). Um diese Zusammenhänge aufzudecken, können Protein-Chips entwickelt werden, die mit diesen Substraten beladen sind. Diese agieren dann als „Köderproteine“. Hierbei wechselwirken sie mit Proteinen in der Probe und bilden auf dem Chip einen Protein-Komplex. Mithilfe der Massenspektrometrie werden diese Komplexe identifiziert und die Rolle der Proteine in zellulären Signaltransduktionswegen entschlüsselt. Ist das biologische Umfeld eines potenziellen Wirkstoffs charakterisiert, werden zur statistischen Validierung verschiedene Zellarten zahlreicher Patienten auf diese Wechselwirkungen untersucht. Für solche Messungen können Proteinexpressions-Chips, die auf einer einfachen, quantitativen Detektionsmethode wie der Fluoreszenz beruhen, die weniger quantitativen und arbeitsintensiven Methoden wie zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit Massenspektrometrie verdrängen.

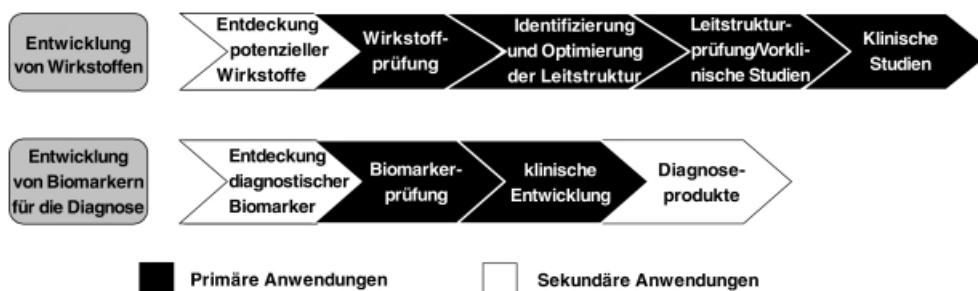


Abbildung 6. Der Einsatz von Protein-Mikroarrays bei der Entwicklung von Arzneimitteln und Biomarkern für die Diagnose.

Weitere Anwendungen von Protein-Mikroarrays liegen in der Identifizierung von pharmakologischen Leitstrukturen und in den nachgeschalteten Prozessen wie Leitstrukturoptimierung und -Validierung. Systeme, die auf Chips beruhen, können auch zur Charakterisierung von inhibitorischen Eigenschaften dieser Leitstrukturen in Bezug auf die katalytische Aktivität einzelner Enzyme oder Enzymklassen herangezogen werden.^[21,25,26] Der Vorteil dieser miniaturisierten und parallelen Systeme liegt in der Zeitersparnis und dem geringen Verbrauch von wertvollen Reagentien. Chips zur Messung von toxischen Nebeneffekten von Medikamenten im Frühstadium ihrer Entwicklung können auf eventuelle Misserfolge in späteren klinischen Studien hindeuten.

Bei der Biomarkeridentifizierung, die sehr eng an den Medikamentenentwicklungsprozess gebunden ist, können Protein-Mikroarrays auch eine große Bedeutung haben. Biomarker können die vorklinischen und klinischen Phasen der Medikamentenentwicklung unterstützen, bei der Klassifizierung von Patientengruppen mit unterschiedlicher Reaktion auf bestimmte Medikamente helfen sowie die Wirkung und Toxizität von Medikamenten zeigen. Protein-Chips, die zur Biomarkeridentifizierung bei Autoimmunkrankheiten^[17] und Krebsleiden^[13] verwendet werden können, wurden bereits beschrieben. Mit der Entwicklung und Anwendung von Antikörper-Arrays zur Bestimmung von Cytokinen und anderen Faktoren der Immunantwort hoffen sowohl wir als auch andere Forschungsgruppen, Expressionsmuster zu erkennen, die für die Diagnose und Behandlung von Entzündungskrankheiten von Bedeutung sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Protein-Mikroarrays das Potenzial haben, die unterschiedlichen Stadien der Arzneimittel- und Biomarkerentwicklung zu revolutionieren. Dies führt zu einer drastischen Einsparung von Kosten, Zeit und Reagentien. Darüber hinaus wird der Einsatz von Protein-Chips die pharmazeutische Industrie in die Lage versetzen, Medikamente individuell auf die unterschiedlichen Patientengruppen anzupassen.

Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten zwei bis drei Jahren haben Protein-Mikroarrays zweifellos an Popularität gewonnen. Dies zeigt sich besonders deutlich in der steigenden Zahl von wissenschaftlichen Publikationen (siehe Zitate in Lit. [1–5]). Besonders für die Expressionsmuster-Erkennung wurden zahlreiche Chip-Formate entwickelt. Die große Herausforderung für die Zukunft liegt nun hauptsächlich in der Entwicklung geeigneter biologischer Substanzen, mit denen diese Chips beladen werden. Bei der Erstellung von Expressionsprofilen von Proteinen wird für die Messung jedes Proteins mindestens ein spezifischer Antikörper benötigt. Da wahrscheinlich polyklonale Antikörper für parallele Immunassays nicht spezifisch genug sind, muss auf die langwierige (etwa 6 Monate) und teure Entwicklung monoklonaler Antikörper zurückgegriffen werden. Eine Alternative dazu ist die Phagen-Display-Methode von rekombinanten Antikörperfragmenten. Hierbei handelt es sich um einen künstlichen In-vitro-Selektionsprozess, bei dem hoch affine bindende Rea-

gentien aus große, natürlichen Bibliotheken (Phagen-Bibliotheken) erhalten werden.^[28–31] Die Zeitspanne, die für die Selektion dieser Antikörperfragmente benötigt wird, ist wesentlich kürzer als diejenige, die für eine langwierige Immunisierung von Tieren benötigt wird. Der In-vitro-Selektionsprozess kann zudem auch zur Selektion von bindenden Reagentien gegen toxische und körpereigene Proteine eingesetzt werden.

Es gibt weitere solcher künstlicher Selektionsmethoden, z.B. die Mikrobe-Display^[32] und Ribosomen-Display-Methode^[33] von Antikörperfragmenten, die mRNA-Display-Methode von künstlichen Protein-Bibliotheken,^[34] das Zwei-Hybrid-System^[35] und das SELEX-Verfahren von Nucleinsäure-Bibliotheken (SELEX = systematische Entwicklung von Liganden durch exponentielle Anreicherung).^[36,37] Jede dieser neuartigen Methoden eignet sich für die Automatisierung.

Bevor die Methoden zur Herstellung von bindenden Reagentien eingesetzt werden können, muss jedoch erst das Zielprotein synthetisiert und gereinigt werden. Viele Säugetierproteine können in relativ großen Mengen entweder in dem Bakterium *E. coli* direkt oder in *E. coli*-Extrakten in vitro exprimiert werden. Oftmals sind diese Proteine jedoch nicht richtig gefaltet und liegen daher als unlösliche Präzipitate vor. Für die meisten menschlichen Proteine müssen somit alternative Expressionssysteme identifiziert oder Verfahren zur Rückfaltung der unlöslichen Proteine entwickelt werden.

Ein einfacherer Weg zur Gewinnung von Antigenen wäre die Synthese und Anwendung von kurzen Peptiden. Antikörper gegen kurze Peptide haben jedoch normalerweise eine schlechtere Bindungsaffinität als diejenigen gegen gefaltete Proteine. Innovation ist auch im Bereich der Detektionsmethoden für Antikörper-Arrays mit hunderten oder tausenden von verschiedenen Antikörperspezifitäten gefragt. Eine Möglichkeit besteht in der chemischen Markierung aller Proteine in einem komplexen Probengemisch durch einen Fluoreszenzfarbstoff. Der Nachteil dieses Ansatzes liegt in der geringen Empfindlichkeit wegen des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses der Messung. Gerade wichtige Signale wie Cytokine liegen in milliardenfach niedrigerer Konzentration vor als andere Proteine im gleichen Gemisch. Selbst der Einsatz von qualitativ hochwertigen Antikörpern ermöglicht oftmals keine Detektion wegen des unspezifischen Bindens anderer Proteine. Das Signal-Rausch-Verhältnis kann durch die Anwendung eines Sandwich-Assays drastisch verbessert werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass zwei hoch spezifische bindende Reagentien entwickelt werden müssen.

In den letzten Jahren hat sich einiges in der Entwicklung von Protein-Mikroarrays getan. Bis diese Technologie aber routinemäßig in der Grundlagenforschung und für die Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden kann, sind noch weitere Verbesserungen nötig.

Eingegangen am 16. Juli 2002 [M1587]

-
- [1] R. E. Jenkins, S. R. Pennington, *Electrophoresis* **2001**, *1*, 13–29.
 - [2] T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105–115.

- [3] D. J. Cahill, *J. Immunol. Methods* **2001**, 250, 81–91.
- [4] D. S. Wilson, S. Nock, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 81–85.
- [5] D. Stoll, M. F. Templin, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer, T. O. Joos, *Front. Biosci.* **2002**, 7, c13–c32.
- [6] T. R. Golub, D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield, E. S. Lander, *Science* **1999**, 286, 531–537.
- [7] A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, L. M. Staudt, *Nature* **2000**, 403, 503–511.
- [8] C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein, *Nature* **2000**, 406, 747–752.
- [9] T. Sorlie, C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, L. P. Eystein, A. L. Borresen-Dale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10869–10874.
- [10] S. M. Dhanasekaran, T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin, A. M. Chinnaiyan, *Nature* **2001**, 412, 822–826.
- [11] T. O. Nielsen, R. B. West, S. C. Linn, O. Alter, M. A. Knowling, J. X. O'Connell, S. Zhu, M. Fero, G. Sherlock, J. R. Pollack, P. O. Brown, D. Botstein, M. van de Rijn, *Lancet* **2002**, 359, 1301–1307.
- [12] S. L. Pomeroy, P. Tamayo, M. Gaasenbeek, L. M. Sturla, M. Angelo, M. E. McLaughlin, J. Y. Kim, L. C. Goumnerova, P. M. Black, C. Lau, J. C. Allen, D. Zagzag, J. M. Olson, T. Curran, C. Wetmore, J. A. Biegel, T. Poggio, S. Mukherjee, R. Rifkin, A. Califano, G. Stolovitzky, D. N. Louis, J. P. Mesirov, E. S. Lander, T. R. Golub, *Nature* **2002**, 415, 436–442.
- [13] E. F. Petricoin, A. M. Ardekani, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, L. A. Liotta, *Lancet* **2002**, 359, 572–577.
- [14] B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. T. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca, S. F. Kingsmore, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 359–365.
- [15] a) L. A. Ruiz-Taylor, T. L. Martin, F. G. Zaugg, K. Witte, P. Indermuhle, S. Nock, P. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 852–857; b) P. Peluso, D. S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, P. Wagner, S. Nock, *Anal. Biochem.* **2003**, 312, 113–124.
- [16] B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol.* **2001**, 2, research0004.1–0004.13.
- [17] W. H. Robinson, C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriver, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, P. J. Utz, *Nat. Med.* **2002**, 8, 295–301.
- [18] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 275–281.
- [19] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, 293, 2101–2105.
- [20] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, 26, 283–289.
- [21] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 270–274.
- [22] Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2394–2395.
- [23] G. Wiegand, N. Arribas-Layton, H. Hillebrandt, E. Sackmann, P. Wagner, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 4245–4254.
- [24] A. Bernard, D. Fitzli, P. Sonderegger, E. Delamarche, B. Michel, H. R. Bosshard, H. Biebuyck, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 866–869.
- [25] C. B. Cohen, E. Chin-Dixon, S. Jeong, T. T. Nikiforov, *Anal. Biochem.* **1999**, 273, 89–97.
- [26] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.* **2000**, 278, 123–131.
- [27] A. Abbott, *Nature* **2002**, 415, 112–114.
- [28] T. J. Vaughan, A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Osbourn, A. R. Pope, J. C. Earnshaw, J. McCafferty, R. A. Hodits, J. Wilton, K. S. Johnson, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 309–314.
- [29] M. D. Sheets, P. Amersdorfer, R. Finnern, P. Sargent, E. Lindquist, R. Schier, G. Hemingsen, C. Wong, J. C. Gerhart, J. D. Marks, E. Lindqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6157–6162.
- [30] H. J. de Haard, N. van Neer, A. Reurs, S. E. Hufton, R. C. Roovers, P. Henderikx, A. P. de Bruïne, J. W. Arends, H. R. Hoogenboom, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18218–18230.
- [31] A. Knappik, L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellenhofer, A. Hoess, J. Wölle, A. Plückthun, B. Virnekäs, *J. Mol. Biol.* **2000**, 296, 57–86.
- [32] K. D. Wittrup, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 395–399.
- [33] J. Hanes, C. Schaffitzel, A. Knappik, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1287–1292.
- [34] D. S. Wilson, A. D. Keefe, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3750–3755.
- [35] P. Colas, B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy, R. Brent, *Nature* **1996**, 380, 548–550.
- [36] E. N. Brody, L. Gold, *J. Biotechnol.* **2000**, 74, 5–13.
- [37] M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 650–655.