

7. Summary

7.1 Summary in English

The performance of proteins and antibody microarrays is dependent on various factors, one of which is the use of an appropriate microarray surface for the immobilisation of either protein or antibody sample. For optimisation of the technology an evaluation of the properties of 8 optimised surfaces was conducted in the context of its use in both, protein and antibody microarray technology. The comparison was performed under the same conditions as earlier studies with HSA and polyclonal anti-fibrinogen antibodies as model interaction partners. The functionality of all new slide coatings was demonstrated and the mean signal to spotted concentration ratio as well as the detection limits and the coefficients of variation were evaluated. Moreover, new concepts for slide coatings such as dendrimer and PEG-epoxy slides were assessed and improved qualities of such slide surfaces were observed. Optimal slide coatings for antibody and protein chips were proposed and the requirements for both technologies were discussed.

Based on these optimisations, a new technology for the multiplex analysis for compounds on microarrays was developed, since current solutions, such as conventional microarrays, microfluidic systems and chips bearing microwells lack the possibility to screen several analytes on different immobilised binders at a time or require complicated liquid handling, surface modifications, or additional equipment. In the new approach, an immunoassay was performed using standard surfaces and machinery already available for microarray technology for multiplex analysis on a standard microscope slide without the requirement for wells or tubes to separate the samples. The new multiple spotting technique (MIST) comprises immobilisation of a binder onto a surface and subsequent spotting of the second compound, comprised in a hygroscopic buffer, on the same spot, on top of the immobilised binder. It was shown, that the analytes bind their ligands immediately, within the confined space of separate droplets on the chip surface, thereby eliminating the need for extra incubation time. Furthermore, the feasibility of the new technique was illustrated by spotting dilution rows of proteins or monoclonal and polyclonal antibodies on top of their immobilised interaction partners with a sensitivity of as little as 400 zeptomoles (240,000 molecules) of analyte. Specificity and compatibility to commonly used techniques such as total incubation was displayed by specific recognition of a protein by an equimolar mixture of antibodies and subsequent detection by a total incubation with labelled secondary antibodies.

The same approach was used to facilitate the identification of high-affinity binders from a great variety of phage display-derived recombinant antibodies. While the selection process for phage displayed antibody fragments itself has been automated, the bottleneck was shifted further downstream to the identification of monoclonal binders obtained from the selections. Using the new approach recombinant antibody fragments were expressed in a single inoculation and expression step and subjected without purification directly to their immobilised antigens. Since immobilisation of the scFv's was not possible so far due to loss of functionality, the multiplex assay represents a major improvement and allows automated high-throughput screening of phage-display derived selections with comparable sensitivity to the commonly used ELISA. Moreover, manual interaction steps were minimised and the technique was streamlined to be accessible within the automated selection procedure.

The multiple spotting technique was also applied to perform enzymatic assays on microarrays to meet the demand for the highly parallel screening of thousands of samples. The approach allowed multiplex enzymatic assays in nanolitre volumes on conventional flat surface microchips with unprecedented detection limits of 35 enzyme molecules. Additionally, assays of inhibition were conducted, and the activity of cathepsin D, an enzyme that serves as a prognostic marker in breast cancer was measured. The incubation times could be avoided, due to limited diffusion within the reaction volumes, which enabled rapid processing. In addition, a first experiment was performed, which displayed the potential of enzymatic signal amplification on a microarray, with a shift of dynamic range of three orders of magnitude and a detection limit of 822 anti-HSA antibody molecules. In addition to the enzymatic assays that were performed using MIST, fibrinogenolysis was shown on polyacrylamide slides. Although no assay of inhibition could be conducted successfully, the specific enzyme-dependent attachment of fluorescently labelled fibrinogen on immobilised fibrinogen was shown.

As an alternative to microarray technology, the potential of nanowell technology for the expression and characterisation of large protein libraries was evaluated. Since such applications require miniaturised high-throughput tools for rapid and cost-effective expression and screening, nanowell arrays, consisting of an array of wells with sub-microlitre volumes, are predestined to meet these demands. Within this approach, the combination of nanowell chip technology and cell-free transcription and translation of proteins could be shown. Using piezoelectric dispensers, protein solutions could be transferred into nanowells and fluorescence could be detected successfully down to volumes of 100 nl. Furthermore, cell-free

expression of proteins could be demonstrated at the same scale using commercially available coupled transcription and translation systems. Additionally, the feasibility to dilute the coupled *in vitro* transcription and translation mix prior to expression was displayed and an inhibition assay was performed in nanowells to anticipate further applications, such as the high-throughput screening of drug candidates, or the identification of novel enzymes for biotechnology.

Based on these findings, it can be expected that most technologies, which are commonly performed in microtitre plates, can be transferred into a miniaturised format for high-throughput studies to allow the rapid screening of large sample pools with minimized consumption of reagents. The choice of the suitable platform for miniaturisation will thereby be mainly dependent on the level of miniaturisation, with the microarray technology being the technology with the higher degree of miniaturisation. Nevertheless, optimisation of each assay with regard to its specific demands such as temperature, susceptibility for buffer ingredients and mechanical stress is a key requirement.

7.2 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Die Qualität von Protein- und Antikörper-Mikroarrays ist von vielen Faktoren abhängig. Ein wichtiger Faktor hierbei ist die Oberflächenchemie, welche spezifisch die jeweiligen Proteine oder Antikörper an die Oberfläche bindet. Zur Optimierung der Mikroarray-Technologie wurde ein Vergleich von acht für Protein und Antikörper Mikroarray optimierte Oberflächenchemien mit HSA und polyklonalen anti-Fibrinogen Antikörpern als Modellprotein bzw. Modellantikörper unter den gleichen Bedingungen wie frühere Studien durchgeführt. Die Funktionalität aller Oberflächen konnte gezeigt werden, und das Verhältnis von Signal zu aufgebrachtener Konzentration, sowie die Detektionslimits und Variationskoeffizienten wurden analysiert. Weiterhin wurden neue Konzepte zur Herstellung der Oberflächenkopplungschemie wie PEG-Epoxy-Oberflächen und Dendrimer-Oberflächen untersucht und verbesserte Eigenschaften festgestellt. Optimale Oberflächenkopplungschemien wurden erläutert und im Hinblick auf die Anforderungen von Protein- und Antikörper-Mikroarrays diskutiert.

Auf der Basis der Oberflächenoptimierung wurde weiterhin eine neue Technologie zur multiplexen Analyse von Substanzen auf Mikroarrays entwickelt, da es mit konventionellen Mikroarrays, mikrofluidischen Systemen und Nanowell-Chips entweder nicht möglich ist,

gleichzeitig mehrere Analyte auf verschiedenen Bindern zu testen, oder weil hierfür komplizierte Apparaturen zur Leitung des Flüssigkeitsstroms oder zur Herstellung der Nanowells benötigt werden. In dem neuen Ansatz wurden multiplexe Immunoassays auf Mikroarray-Oberflächen ohne Vertiefungen mit Hilfe von konventionellen Spotting-Robotern durchgeführt. Das Verfahren, benannt "Multiple Spotting Technique" (MIST), umfasst hierbei die Immobilisierung des Binders auf einer Oberfläche und den anschließenden Transfer des Analyten mit Hilfe der gleichen Roboter auf die gleiche Stelle des Mikroarrays und somit auf den immobilisierten Binder. Da der Analyt sich hierbei in einem hygroskopischen Puffer befindet, entsteht ein Mikroreaktionsvolumen, in welchem der Analyt ohne zusätzliche Inkubationszeiten vom Binder gebunden wurde. Die Durchführbarkeit des Konzepts konnte durch den Transfer von Verdünnungsreihen monoklonaler und polyklonaler Antikörper auf deren immobilisierte Antigene und die anschließende Detektion der spezifischen Antikörper-Antigen Komplexe gezeigt werden. Hierbei wurden Detektionslimits von 400 Zeptomol (240.000 Antikörpermoleküle) gemessen. Die Spezifität, sowie die Kompatibilität zu gängigen Mikroarray-Techniken, wie der Gesamtinkubation, wurden durch die Aufbringung einer äquimolaren Antikörpermischung auf ein Antigen und anschließenden Gesamtinkubation mit markierten Sekundärantikörpern gezeigt, welches zur spezifischen Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen führte.

Der gleiche Ansatz wurde auch zur Untersuchung von rekombinanten Antikörperpools von „Phage Display“-Selektionen angewandt. Während die eigentliche Selektion von rekombinanten Antikörpern mittlerweile automatisiert wurde, stellt die anschließende Identifikation positiver Binder bis heute noch einen großen Arbeitsaufwand dar. In dem neuen Ansatz werden die Antikörperfragmente-produzierenden Zellen in einem einzigen Inokulations- und Induktionsschritt im 384er Maßstab kultiviert und anschließend mit Hilfe der Multiple Spotting Technique auf die Antigene aufgebracht. Gleichzeitig wurden alle Antikörperfragmente auf Kreuzreaktivität mit Milchpulver untersucht, wodurch unspezifische Binder identifiziert werden konnten. Ein entscheidender Vorteil der MIST war hierbei, dass zusätzliche Inkubationszeiten durch die eingeschränkten Diffusionsmöglichkeiten innerhalb der Reaktionseinheiten ausgelassen werden konnten. Eine solche Untersuchung mit Hilfe von Mikroarrays war bisher nicht möglich, da die scFv's ohne Funktionsverlust nicht immobilisiert werden konnten. Der Vergleich des neuen Verfahrens mit ELISA zeigte, dass der MIST-basierte Ansatz schneller vergleichbare Sensitivitäten mit geringerem Antigenverbrauch lieferte. Weiterhin kann der neuartige Ansatz in die bestehende

Automatisierung integriert werden, so dass eine schnellere Produktion von spezifischen rekombinanten Antikörpern möglich ist.

Ein weiteres Anwendungsfeld, in dem die Multiple Spotting Technique zur Anwendung gelangte, war die Untersuchung von Enzymen im Hochdurchsatzverfahren auf Mikroarrays. Hier erlaubte die MIST die Durchführung von enzymatischen Tests im Nanoliterformat und ermöglichte die Detektion von bis zu 35 Enzym-Molekülen. Weiterhin wurden Inhibitionsstudien durchgeführt, sowie die Aktivität von medizinisch relevanten Enzymen wie Cathepsin D bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde ein erstes Experiment zur enzymatischen Signalamplifikation durchgeführt. Hierbei konnte eine Verschiebung des dynamischen Bereichs von drei Größenordnungen im Vergleich zum konventionell durchgeführten Test beobachtet werden. Das Detektionslimit verschob sich gleichzeitig von 55.600 hin zu 822 Antikörpermolekülen.

Neben diesen Untersuchungen auf Basis der MIST wurde auch die Fibrinogenolyse auf Polyacrylamid beschichteten Objektträgern mit Hilfe der konventionellen Mikroarray-Technologie gezeigt. Zwar konnte hierbei kein Inhibitionstest erfolgreich durchgeführt werden, jedoch wurde spezifische und enzymabhängige Aggregation von markiertem Fibrinogen auf immobilisiertem Fibrinogen gezeigt.

Als ein alternativer Ansatz zur Mikroarray Technologie wurde das Potential der Nanowell Technologie im Bereich der Proteinexpression und Charakterisierung evaluiert. Die Nanowell Technologie stellt hierbei ein hochdurchsatztaugliches Verfahren dar, welches die kostengünstige und schnelle Expression von Proteinen im Sub-Mikrolitermaßstab erlaubt. In ersten Versuchen konnte die zellfreie Expression zweier Proteine gezeigt werden. Mit Hilfe von piezoelektrischen Dispensionseinheiten wurden diese in Nanowell-Chips transferiert und erfolgreich bis zu einem Volumen von 100 nl detektiert. Weiterhin konnte die zellfreie Expression in gleichen Volumina innerhalb der Nanowell-Chips mit Hilfe kommerziell erhältlicher Expressionssysteme gezeigt werden. Parallel zeigte sich, dass die zellfreien Expressionssysteme in diesem Versuch zur kostengünstigen Produktion verdünnt werden konnten. Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe wurden Inhibitionstests mit der β -Galaktosidase durchgeführt, welches zellfrei in dem Nanowell-System exprimiert worden war. Hierbei war es möglich, den spezifischen Inhibitor PETG bis zu einer Konzentration von 66 pmol/ml nachzuweisen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse ist es voraussehbar, dass weitere Techniken, welche heute in standardmäßig in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, in Zukunft in ein miniaturisiertes Format überführt werden. Dieses Format erlaubt dann die schnelle Hochdurchsatzanalyse von mehreren tausend Proben mit minimalem Verbrauch von Reagenzien. Welche der beiden Plattformen hierfür verwendet wird, ist hierbei abhängig vom Grad der benötigten Miniaturisierung, wobei die Mikroarray-Technologie die Plattform mit dem höheren Grad der Miniaturisierung darstellt. Eine grundlegende Voraussetzung beider Plattformen bleibt jedoch die Optimierung jeder Untersuchungsmethode hinsichtlich verschiedener Parameter, wie beispielsweise die spezifischen Anforderungen an Temperatur, Wechselwirkungen mit Pufferzusätzen und mechanischer Belastbarkeit.