

## Antikörper-Mikroarrays

# Vergleich von Blutproteinen immundefizienter und -kompetenter Mäuse

WENDY RODENBURG<sup>1</sup>, STEFANIE KUTSCHMANN<sup>2</sup>, JEROEN PENNING<sup>1</sup>, SIRAK KIFLE<sup>3</sup>, CHRISTOPH SCHRÖDER<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup>CENTRE FOR HEALTH PROTECTION, NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT, BILTHOVEN, NIEDERLANDE

<sup>2</sup>ABTEILUNG FUNKTIONELLE GENOMANALYSE, DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGS-ZENTRUM, HEIDELBERG

<sup>3</sup>TECAN TRADING AG, MÄNNEDORF, SCHWEIZ

<sup>4</sup>SCIOMICS GMBH, HEIDELBERG

Antibody microarrays are an important tool for proteomics studies, enabling multiplexed analysis of hundreds of proteins in parallel. This rapid, robust methodology, which can generate useful data from as little as 15 microlitres of serum or plasma, has been successfully used to investigate differences in protein abundances between FVB and NOD-SCID mouse strains.

DOI: 10.1007/s12268-013-0387-9  
© Springer-Verlag 2013

■ Mäuse werden häufig als Modellorganismen zum besseren Verständnis biomolekularer Mechanismen verwendet. Es steht eine große Auswahl an unterschiedlichen Stämmen zur Modellierung bestimmter Krankheitszustände oder Wirkmechanismen zur Verfügung. Dazu gehören auch NOD-SCID-Mäuse, denen ein Großteil des Immunsystems fehlt. Über die Zusammensetzung und den Gehalt ihrer Blutproteine ist bislang wenig bekannt.

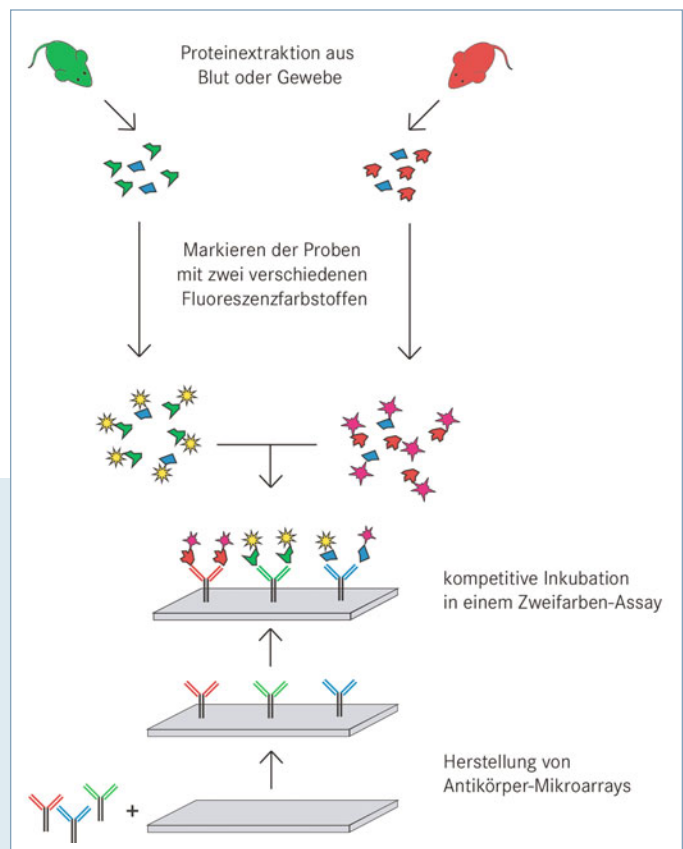
Dies haben wir mithilfe von Antikörper-Mikroarrays untersucht. Antikörper-Arrays sind nützliche Werkzeuge zur parallelen

Multiplexanalyse Hunderter bis Tausender Proteine. Aus nur 15 Mikrolitern Serum oder Plasma können umfassende Daten zum Proteinvorkommen generiert werden. Neben der geringen benötigten Probenmenge besteht ein weiterer Vorteil der äußerst robusten Technologie

darin, dass die Analysen ohne eine Anreicherung abundanter Proteine und ohne eine Probenfraktionierung durchgeführt werden können. Dies erleichtert die Anwendung und vermeidet Artefakte, die durch derartige Probenvorbereitungen entstehen können. Neben Blutuntersuchungen werden Antikörper-Mikroarrays zur Analyse der Proteinzusammensetzung im Urin, in Geweben sowie in Zellkulturexperimenten eingesetzt [1–3].

In diesem Artikel wurde der Serumproteingehalt zwischen dem immundefizienten NOD-SCID- und dem immunkompetenten FVB-Mausstamm verglichen. Eine schematische Darstellung der Durchführung des Antikörper-Mikroarray-Experiments ist in **Abbildung 1** dargestellt.

► **Abb. 1:** Schematischer Versuchsablauf eines Antikörper-Mikroarray-Experiments: In einem ersten Schritt (unten) werden unterschiedliche Antikörper auf einem Glasobjektträger an verschiedenen Punkten (Spots) durch einen Mikroarray-Roboter immobilisiert. Nach der Herstellung können die Arrays bis zu zwei Jahre gelagert werden. Zu Beginn einer Analyse mit Antikörper-Arrays werden Proteine aus Blutproben, Gewebe oder Zellkultur isoliert (oben). Zu vergleichende Proben werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen durch eine kovalente Ankopplung der Farbstoffe markiert und anschließend beide Proben auf einem Array inkubiert (Mitte). Nach dem Einlesen der Arrays mit einem Mikroarray-Scanner erlaubt das Verhältnis der Intensitäten der beiden Fluoreszenzfarbstoffe einen Rückschluss auf das Vorkommen der getesteten Proteine in den Ausgangsproben.



## Antikörper-Mikroarrays zur Untersuchung des Serumproteingehalts

Zum Einsatz kam ein Antikörper-Mikroarray, der gegen 741 unterschiedliche krebsrelevante Proteine gerichtet ist. Die ausgewählten Antikörper besitzen Affinitäten gegen humane Proteine, und der Array wurde bisher nur zur Untersuchung humaner Proben eingesetzt. Aufgrund der starken Homologie zwischen Mausproteinen und humanen Proteinen konnten mit den Antikörpern in den meisten Fällen Proteine in beiden Spezies nachgewiesen werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis für humane und Mausproben war dabei identisch.

Die Versuche wurden entsprechend den zuvor beschriebenen Protokollen und strengen Qualitätskontrollverfahren durchgeführt [4]. Serumproben wurden von zehn Wochen alten, weiblichen Mäusen des FVB/N-(Harlan)- und NOD.CB17-Prkdcscid/J-(Jax)-Stamms gewonnen und gepoolt. Jeder Probenpool wurde mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert und in einem Zweifarben-Assay mit Farbstoffwechsel (*dye swap*) auf acht Antikörper-Mikroarrays inkubiert. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Proben, die auf jedem Array miteinander um die Bindungsstellen der Antikörper kompetieren.

Alle Wasch-, Block-, Inkubations- und Trockenschritte wurden mit einer automatischen Hybridisierungsstation HS 4800™ Pro (Tecan) durchgeführt. Dadurch konnte die Versuchsdauer eines manuellen Protokolls ohne Mischen von 20 Stunden auf 4,5 Stunden reduziert werden. Da die Inkubationsstation zusätzlich eine exakte Kontrolle der Temperatur sowie der Wasch- und Trocknungsschritte ermöglicht, konnten Schwankungen zwischen verschiedenen Anwendern oder Versuchstagen minimiert und dadurch die Reproduzierbarkeit deutlich gesteigert werden.

Die Mikroarrays wurden an einem PowerScanner™ (Tecan) bei identischer Laserleistung und Photomultiplier-Verstärkung gescannt. Für die

Spot-Segmentierung wurde GenePix® Pro 6.0 Microarray Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices) verwendet, und die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem *limma* (*linear models for microarrays*)-R-Programmpaket unter Verwendung der Medianwerte der Signalintensitäten. Zur Normalisierung der Daten kam ein invariantes Lowess-Verfahren [5] zum Einsatz. Die Differenzanalyse der Proteinexpression wurde mit *limma* unter Verwendung eines einfaktoriellen linearen Modells durchgeführt. Durch eine Analyse von Poolproben kann die biologische Heterogenität nicht bewertet werden. Die Daten wurden daher basierend auf der logarithmischen Veränderung ( $\log_{FC}$ ) des Verhältnisses der Signalintensitäten gefiltert. Wir haben hierzu auf Grundlage unserer Erfahrung in anderen Studien ein Grenzwert von  $\log_{FC} \pm 0,75$  ausgewählt. Alle nach diesem Kriterium gewählten Proteine hatten nach einer Anpassung für multiples Testen einen berechneten p-Wert unter 0,05, was die technische Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse unterstreicht.

## Vergleich des Proteinvorkommens zwischen verschiedenen Stämmen

Für die meisten untersuchten Moleküle wurden reproduzierbar kleine Unterschiede zwischen den Serum-pools aus NOD-SCID- und FVB-Mäusen beobachtet. 56 Proteine zeigten ein deutlich unterschiedliches Vorkommen ( $\log_{FC} < -0,75$  oder  $\log_{FC} > 0,75$ ) im Plasma der beiden Mausstämmen. Die Mehrheit dieser Proteine – 54 von 56 – wurde in den immundefizienten NOD-SCID-Mäusen weniger stark exprimiert, während die beiden Proteine NFAC4 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4*) und PLK2 (*polo-like kinase 2*) höher exprimiert vorlagen (**Abb. 2, Tab. 1**). Der größte Unterschied wurde mit einem Antikörper gegen Maus-IgG beobachtet. Dies liegt daran, dass NOD-SCID-Mäuse durch das Fehlen aktiver B- oder T-Zellen keine Antikörper bilden

**Tab. 1:** Serumproteine mit unterschiedlichem Vorkommen in immundefizienten NOD-SCID- und immun-kompetenten FVB-Mäusen. Log-Fold-Change (logFC) bezeichnet den logfachen Unterschied in den Verhältnissen der Signalintensitäten der beiden Mausstämmen. Negative Werte stehen für ein verringertes Vorkommen in immundefizienten NOD-SCID-Mäusen im Vergleich zu immunkompetenten FVB-Mäusen, positive Werte für ein erhöhtes. Für die Proteine ist neben dem Namen das offizielle Proteinsymbol aus der UniProt-Datenbank angegeben. In dieser sind für jedes Protein vielfältige weitere Informationen und Links zu verschiedenen Datenbanken zu finden.

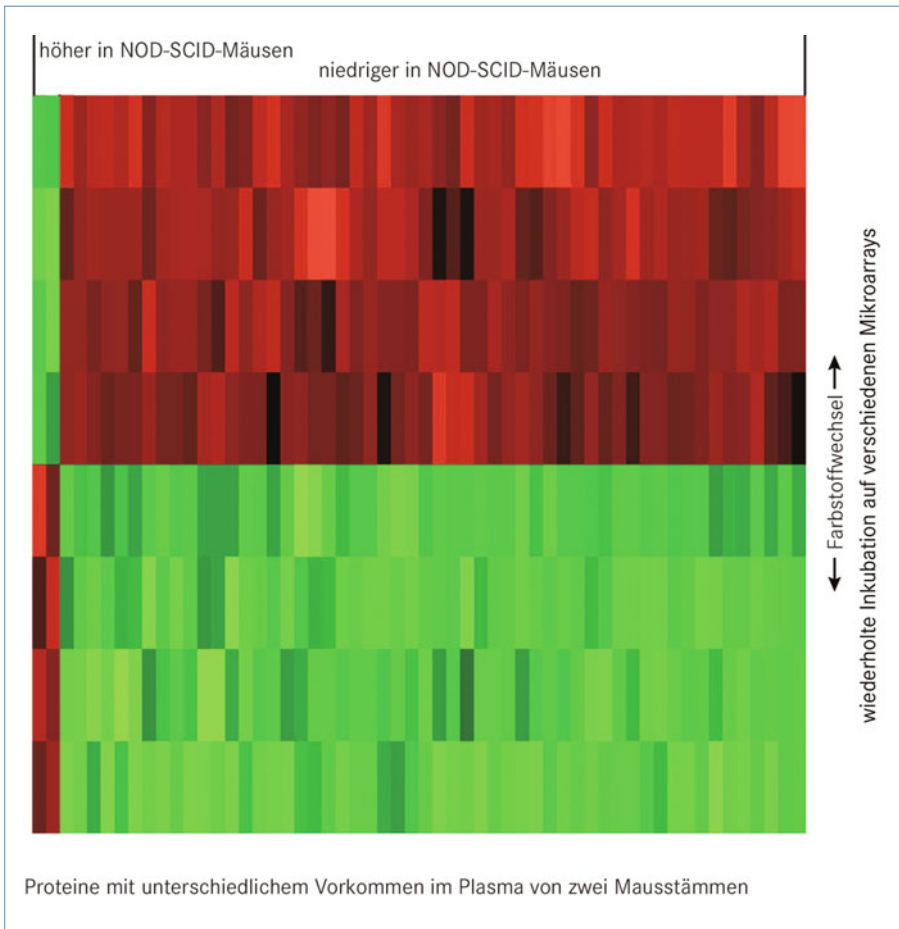
Gen	logFC	UniProt-Name	Proteinname
<i>na</i>	-5,68	na	Anti-Maus-Immunglobulin gamma
<i>Gja4</i>	-3,09	CXA4_MOUSE	<i>gap junction alpha-4 protein</i>
<i>Tnf</i>	-2,63	TNFA_MOUSE	Tumornekrosefaktor-alpha
<i>Pten</i>	-2,58	PTEN_MOUSE	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat-3-phosphatase und <i>dual-specificity protein phosphatase</i> PTEN
<i>Ifng</i>	-2,22	IFNG_MOUSE	Interferon-gamma
<i>Il15</i>	-2,19	IL15_MOUSE	Interleukin-15
<i>Chl1</i>	-2,17	CHL1_MOUSE	<i>neural cell adhesion molecule L1-like protein</i>
<i>Rpl8</i>	-2,14	RL8_MOUSE	<i>60S ribosomal protein L8</i>
<i>Npy4r</i>	-2,11	NPY4R_MOUSE	<i>neuropeptide Y receptor type 4</i>
<i>Mlph</i>	-2,09	MELPH_MOUSE	Melanophilin
<i>Tnfrsf23</i>	-2,03	TNR23_MOUSE	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 23</i>
<i>Mycl1</i>	-1,98	MYCL1_MOUSE	Protein L-Myc-1
<i>Ifng</i>	-1,89	IFNG_MOUSE	Interferon-gamma
<i>Mif</i>	-1,89	MIF_MOUSE	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
<i>Cdkn1c</i>	-1,77	CDN1C_MOUSE	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57Kip2)</i>
<i>Adcyap1</i>	-1,66	PACA_MOUSE	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1</i>
<i>Dlx4</i>	-1,64	DLX4_MOUSE	Homeobox-Protein DLX-4
<i>Rps15</i>	-1,60	RS15_MOUSE	<i>40S ribosomal protein S15</i>
<i>Runx3</i>	-1,56	RUNX3_MOUSE	<i>runt-related transcription factor 3</i>
<i>Rad52</i>	-1,45	RAD52_MOUSE	<i>DNA repair protein RAD52 homologue</i>
<i>Muc1</i>	-1,43	MUC1_MOUSE	Mucin-1
<i>Vegfa</i>	-1,42	VEGFA_MOUSE	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
<i>Cycs</i>	-1,38	CYC_MOUSE	Cytochrom c, somatic
<i>Il6</i>	-1,37	IL6_MOUSE	Interleukin-6
<i>Mmp7</i>	-1,34	MMP7_MOUSE	Matrilysin
<i>Pax2</i>	-1,32	PAX2_MOUSE	<i>paired box protein Pax-2</i>
<i>Hspa1a</i>	-1,30	HS71A_MOUSE	Hitzeschock-70-kDa-Protein 1A
<i>Spi1</i>	-1,28	SPI1_MOUSE	Transkriptionsfaktor PU.1
<i>Tgfb1</i>	-1,28	BGH3_MOUSE	<i>transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>
<i>Actn1</i>	-1,27	ACTN1_MOUSE	Alpha-Aktinin-1
<i>Ifitm2</i>	-1,26	IFM2_MOUSE	<i>interferon-induced transmembrane protein 2</i>
<i>Rpl6</i>	-1,22	RL6_MOUSE	<i>60S ribosomal protein L6</i>
<i>Tep1</i>	-1,20	TEP1_MOUSE	<i>telomerase protein component 1</i>
<i>Sele</i>	-1,19	LYAM2_MOUSE	E-Selectin
<i>Tf Trf</i>	-1,16	TRFE_MOUSE	Serotransferrin
<i>Cat</i>	-1,15	CATA_MOUSE	Katalase
<i>Il4</i>	-1,07	IL4_MOUSE	Interleukin-4
<i>Ddah2</i>	-1,06	DDAH2_MOUSE	N(G),N(G)-Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase 2
<i>Ggt7</i>	-1,00	GGT7_MOUSE	Gamma-Glutamyltransferase 7
<i>Il2</i>	-0,99	IL2_MOUSE	Interleukin-2
<i>Bnip3</i>	-0,95	BNIP3_MOUSE	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
<i>Zbtb22</i>	-0,94	ZBT22_MOUSE	<i>zinc finger and BTB domain-containing protein 22</i>
<i>Pou4f2</i>	-0,93	PO4F2_MOUSE	<i>POU domain, class 4, transcription factor 2</i>
<i>Gstp1</i>	-0,92	GSTP1_MOUSE	Glutathion-S-transferase P1
<i>Fgf7</i>	-0,90	FGF7_MOUSE	<i>fibroblast growth factor 7</i>
<i>Tnfrsf21</i>	-0,90	TNR21_MOUSE	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 21</i>
<i>Tnfrsf23</i>	-0,88	TNR23_MOUSE	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 23</i>
<i>Impdh1</i>	-0,85	IMDH1_MOUSE	Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase 1
<i>Top2a</i>	-0,84	TOP2A_MOUSE	DNA-Topoisomerase-2-alpha
<i>Cenpf</i>	-0,84	E9Q3P4_MOUSE	Protein Cenpf
<i>Ifit2</i>	-0,83	IFIT2_MOUSE	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i>
<i>Ccnb1</i>	-0,80	CCNB1_MOUSE	<i>G2/mitotic-specific cyclin-B1</i>
<i>Rpl29</i>	-0,80	RL29_MOUSE	<i>60S ribosomal protein L29</i>
<i>Dnah17</i>	-0,76	DYH17_MOUSE	<i>dynein heavy chain 17, axonemal</i>
<i>Nfatc4</i>	0,81	NFAC4_MOUSE	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4</i>
<i>Plk2</i>	0,93	PLK2_MOUSE	Serin/Threonin-Proteinkinase PLK2

können. Auch die geringeren Konzentrationen an den Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  (durch zwei verschiedene Antikörper bestätigt), IL-2, IL-4, IL-6, IL-15 und MIF können dadurch erklärt werden. Der Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen (zytoplasmatisch 4, NFATC4), der an der Bildung und Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist, wurde im NOD-SCID-Mausstamm in einem höheren Maße exprimiert, während die Tumorsuppressoren PLK2 und PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) erhöht oder verringert vorlagen. Zu den Proteinen, die in NOD-SCID-Mäusen geringer konzentriert waren, gehören auch: Transkriptionsfaktor PU.1 (SPI1), der an der Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen beteiligt ist; die ribosomalen Proteine RL29, RL6, RL8 und RS15; *tumor necrosis factor receptor superfamily member 21 (death receptor/Todesrezeptor 6)* und 23 (TRAIL-Rezeptor 1); die Wachstumsfaktoren FGF7 und VEGFA; RAD52, ein Protein, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist, und die Proteine GSTP1 und GGT7, die am Glutathion-Metabolismus mitwirken. Die Abnahme an GSTP1 und GGT7 könnte auf den genetischen NOD-Hintergrund der NOD-SCID-Mäuse zurückgeführt werden.

### Schlussfolgerung

Antikörper-Mikroarrays sind ein wertvolles Werkzeug für die hochparallele Analyse einer Vielzahl von Proteinen. Neben Blutproben können sie auch für die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Geweben eingesetzt werden. Binnen weniger als zwei Tagen kann eine komplette Studie mit dieser robusten Methode durchgeführt werden, um tiefere Einblicke in die Proteinzusammensetzung des Blutes oder des Gewebes zu bekommen. Eingesetzt werden können unterschiedliche Mausstämmen oder verschiedene Bedingungen oder Behandlungen des gleichen Mausstamms. Die Mikroarray-Technik hat hierbei den Vorteil, dass nur geringe Probenmengen (15 Mikroliter) Plasma oder Serum benötigt werden, was auch eine hochparallele Blutproteinanalyse von Zwischenproben (kleine Blutmenge durch Orbitalpunktion der Maus) vor dem Endpunkt einer Studie ermöglicht.

In dieser Studie wurde die erfolgreiche Anwendung von Antikörper-Mikroarrays zur Untersuchung von Unterschieden im Proteingehalt zwischen FVB- und NOD-SCID-Mausstämmen demonstriert. Es wurden mehrere Unterschiede im Serum der beiden Stämme beobachtet, die den genetischen Verän-



▲ **Abb. 2:** In der *Heatmap* sind die Verhältnisse der Signalintensitäten für Proteine mit unterschiedlichem Vorkommen zwischen immundefizienten NOD-SCID- und immunkompetenten FVB-Mäusen dargestellt. Jede Spalte definiert ein Protein, jede Zeile eine der wiederholten Messungen. Im oberen Bereich der Abbildung sind Proteine mit erhöhtem Vorkommen in NOD-SCID-Mäusen grün, mit verringertem Vorkommen rot dargestellt. Bei einem Wechsel der Farbstoffe (*dye swap*, unten) kommt es zu einer Umkehr des Expressionsmusters und der Farben. Die *Heatmap* wurde im Statistiksystem R mit dem Paket *heatmap.plus* basierend auf den normalisierten logarithmischen Signalverhältnissen des roten und grünen Farbkanaals erstellt.

derungen der NOD-SCID-Mäuse zugeordnet werden können. Neben den erwarteten Unterschieden im Vorkommen von Proteinen, die an der Immunreaktion beteiligt sind, wurde auch eine veränderte Expression vieler Proteine, die nicht direkt mit dem Immunsystem verbunden sind, beobachtet. Die nicht aus dem Genotyp ersichtlichen Veränderungen unterstreichen die Bedeutung einer umfassenden Charakterisierung des Proteinprofils verschiedener Mausstämmen für eine korrekte Interpretation erhobener Daten. ■

## Literatur

- [1] Hoheisel JD, Alhamdani MSS, Schröder C (2013) Affinity-based microarrays for proteomic analysis of cancer tissues. *Prot Clin Appl* 7:8–15
- [2] Alhamdani MS, Youns M, Buchholz M et al. (2012) Immunoassay-based proteome profiling of 24 pancreatic cancer cell lines. *J Proteomics* 75:3747–3759

- [3] Alhamdani MS, Schröder C, Hoheisel JD (2009) Oncoproteomic profiling with antibody microarrays. *Genome Med* 1:68
- [4] Schröder C, Jacob A, Tonack S et al. (2010) Dual-color proteomic profiling of complex samples with a microarray of 810 cancer-related antibodies. *Mol Cell Proteomics* 9:1271–1280
- [5] Sill M, Schröder C, Hoheisel JD et al. (2010) Assessment and optimisation of normalisation methods for dual-colour antibody microarrays. *BMC Bioinformatics* 11:556

## Korrespondenzadresse:

Dr. Christoph Schröder  
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Abteilung Funktionelle Genomanalyse  
Im Neuenheimer Feld 580  
D-69120 Heidelberg  
Tel.: 06221-42-4678  
Fax: 06221-42-4687  
christoph.schroeder@dkfz.de  
www.dkfz.de/funct\_genome

## AUTOREN



### Wendy Rodenburg

Jahrgang 1975. Studium der Biomedizin an der Universität Utrecht, Niederlande. 2008 Promotion an der Universität Wageningen, Niederlande. Seit 2008 Wissenschaftlerin am Nationalen Institut für Public Health (RIVM) in Bilthoven, Niederlande.



### Stefanie Kutschmann

Jahrgang 1981. Ausbildung zur biologisch-technischen Assistentin an den Dr.-von-Morgenstern-Schulen in Braunschweig. Seit 2007 am DKFZ, Heidelberg, in der Abteilung Funktionelle Genomanalyse. Seit 2010 spezialisiert auf den Bereich Proteomics und Analysen mit Antikörper-Microarrays.



### Jeroen Pennings

Jahrgang 1971. Studium der Chemie an der Universität Nijmegen, Niederlande. 1999 Promotion und Postdoc an der Universität Nijmegen. 1999–2001 Postdoc am Medizinischen Zentrum „St Radboud“ der Universität Nijmegen. Seit 2001 Wissenschaftler im Bereich Bioinformatik am Nationalen Institut für Public Health (RIVM) in Bilthoven, Niederlande.



### Sirak Kifle

Jahrgang 1966. Studium der Biologie an der LMU München. 1997 Promotion an der Universität Kiel. 1998–2001 Postdoc am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln. 2002–2007 Mitarbeiter bei der SCIENION AG, Berlin, Entwicklung und Produktion von Microarrays. Seit 2007 Mitarbeiter bei Tecan im Bereich Sales Development Detection in Europe & NEMEA.



### Christoph Schröder

Jahrgang 1978. Studium der Molekularen Biotechnologie an der Universität Bielefeld, Promotion am DKFZ, Heidelberg. Seit 2010 Wissenschaftler am DKFZ. Seit 2013 Gründer und Geschäftsführer der Sciomics GmbH, Heidelberg.