



Doctoral Thesis

Reinventing Protein Microarrays: Multiplexed Analysis in Clinical Samples

Author(s):

Lange, Victoria E. de

Publication Date:

2015

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010536389> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22761

Reinventing Protein Microarrays: Multiplexed Analysis in Clinical Samples

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

VICTORIA EMILY DE LANGE

MSc. ETH Zurich

born on 29.07.1985

citizen of Canada

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. János Vörös, examiner

Dr. Lance Liotta, co-examiner

Dr. Michael Pawlak, co-examiner

2015

Abstract

Proteins are our window into the physiological state of cells. Most are entwined in a complex biochemical network or pathway, where the activity of one depends on the concentration of those around it. Microarrays help us to understand these protein interactions, invaluable information in disease detection and treatment.

Simple and inexpensive, the FoRe microarray simultaneously tests several μl samples for multiple proteins. Its innovative three-dimensional (3D) design combines the high signal-to-noise and multiplexing of microarrays with the speed and sensitivity of immunofiltration.

Protein microarrays allow us to monitor many biorecognition reactions in parallel. Miniature test sites immobilised on a planar surface are insensitive to sample volume errors, have high signal-to-noise and throughput, but suffer from long incubation times when detecting dilute analytes. Immunofiltration assays are a complimentary technique, perfectly suited for rapidly analysing dilute samples. Instead of test sites on a planar support, the analyte flows through membranes dense with capture probes. However, difficulties isolating samples results in mm-test sites with limited multiplexing and lower signal-to-noise.

The FoRe array merges these two technologies by bringing immunofiltration from the milli-scale to the micro-scale and combining microarray multiplexing with rapid low-concentration sensing.

The concept of the FoRe microarray is “stack-and-separate.” Capture antibodies are passively adsorbed to membranes, which are then stacked to form a multiplexed affinity column. The device is easily customisable—any combination of test sites can be assembled. As the sample flows through the stack, target proteins are specifically adsorbed on the different layers. To analyse several samples in parallel we introduced hydrophobic

wax barriers around the antibody-loaded spots on each layer. Wax-patterning allows us to restrict the channel diameter to $\sim 400\ \mu\text{m}$, reducing the minimum required volume (from 100s of μl for commercial immunofiltration assays to $<1\ \mu\text{l}$), and to confine the capture probes to a smaller area for increased signal-to-noise.

Similar to a reverse phase array, this approach analyses small volumes from multiple samples; however, it has the added advantage of testing each sample for multiple targets, like a forward phase array. By combining forward and reverse phase microarrays into a novel 3D format, FoRe exploits the advantages and eliminates several drawbacks of the traditional approaches (*i.e.*, large sample volumes, protein loss, and cross-reactivity between detection antibodies). We successfully performed 3D multiplexing using a model system with mouse and rabbit IgG. Binding proved to be independent of the position in the stack, and the limit of detection for a mouse IgG sandwich assay was $7.3\ \text{pM}$ in BSA and $15\ \text{pM}$ in human plasma.

Our model system demonstrates that the FoRe array is sensitive to the *amount* of antigen, unlike microarrays which are typically concentration limited systems. This provides a unique opportunity to tune the sensitivity of a microarray, depending on the available sample volume. We found that the decrease in the limit of detection mirrors the increase in sample volume. To take full advantage of analyte re-concentration during flow-through we developed a novel inlet system to analyse larger volumes without compromising the FoRe's small spot size or dense microarray layout.

The micron test sites suffered from clogging with more complex clinical samples (*e.g.* whole blood). We solved this problem with a quick and simple technique for multiplexed analysis in blood, using the μl -volumes expected from an infant heel prick. We spiked rabbit IgG and recombinant TNF- α into blood and achieved limits of detection of $21\ \text{fM}$ and $18\ \text{pM}$, respectively. With a direct labelled assay we demonstrated that the combined sample and analyte multiplexing works in such complex solutions.

The FoRe microarray makes it possible to identify protein expression patterns across several minute volume samples; for example, it could be used to analyse cell lysate in drug response studies or blood from small animal studies. In collaboration with the Universitäts-Kinderspital we applied the concept to monitoring enzyme kinetics. The FoRe system was modified to record real-time absorption, indicative of enzyme activity. This was applied to a model system detecting HRP; the limit of detection is $0.88\ \text{pM}$, based on the rate of substrate conversion.

The primary aim of FoRe is to make protein microarrays more accessible. We have carefully chosen inexpensive and easily customisable fabrication techniques which open the door to a range of applications from biomarker detection to analysing contaminated water.

Zusammenfassung

Proteine geben uns—wie keine anderen Moleküle—Einblick in das biochemische Innenleben von Zellen. Eingebettet in komplexe, biochemische Netzwerke hängt die Aktivität eines einzelnen Proteins oft stark von dessen Konzentration und den Interaktionen mit anderen Proteinen ab. Mikroarrays helfen uns diese Proteininteraktionen zu verstehen und tragen damit in erheblichem Maße zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten bei.

Das FoRe Mikroarray ist eine einfache und kostengünstige Neuentwicklung, welche gleichzeitig mehrere Proteine in mehreren winzigen Proben nachweisen kann. Durch das innovative, dreidimensionale Design kombiniert diese neue Art von Mikroarray den hohen Parallelisierungsgrad und das exzellente Signalrauschverhältnis von klassischen Mikroarrays mit der Geschwindigkeit und Sensitivität von Immunofiltrationsassays.

Proteinmikroarrays ermöglichen es, eine größere Anzahl von biochemischen Bindungsprozessen zeitgleich zu detektieren. Durch die Verwendung von extrem kleinen Teststellen auf einer planaren Oberfläche sind sie unempfindlich gegenüber Schwankungen im Probenvolumen und besitzen ein hervorragendes Signalrauschverhältnis. Im Fall von niederkonzentrierten Proben benötigen sie jedoch oft lange Inkubationszeiten. Dieser Nachteil wird von Immunofiltrationsassays umgangen, indem die Proteinbindungsstellen aktiv von der Probenflüssigkeit umspült werden. Damit ermöglichen Immunofiltrationsassays eine schnelle Analyse von verdünnten Proben, jedoch sind eine Miniaturisierung und ein Multiplexing der Teststellen meist nur sehr begrenzt möglich. Außerdem weisen Immunofiltrationsassays im Vergleich zu Proteinmikroarrays ein schlechteres Signalrauschverhältnis auf.

Das FoRe Mikroarray vereint die Vorteile dieser beiden Technologien, indem es die Miniaturisierung und Multiplextechnik eines Proteinmikroarrays mit der hohen Auslesegeschwindigkeit eines Immunofiltrationsassays verbindet.

Das zentrale Konzept des FoRe Mikroarrays ist eine “schichtweise Unterteilung”. Capture-Antikörper werden passiv an Membranen gebunden, welche dann schichtweise aufeinander gestapelt werden und damit eine Mehrfachdetektionsaffinitätssäule bilden. Das Konzept der Mehrfachdetektionsaffinitätssäule ist leicht anpassbar—jede beliebige Kombination von Proteinbindungsstellen kann zusammengesichtet werden. Beim Durchfluss der Probenflüssigkeit durch den Membranstapel binden die Zielproteine dann jeweils spezifisch an die verschiedenen Schichten. Um mehrere Proben parallel analysieren zu können, verwenden wir auf jeder Schicht hydrophobe Wachsbarrieren um die mit Antikörper beladenen Teststellen herum. Diese Wachsstrukturierung erlaubte es uns, die Säulendurchmesser bis auf 400 μm zu verkleinern, wodurch das erforderliche Mindestprobenvolumen deutlich reduziert (von $>100 \mu\text{l}$ für kommerzielle Immunfiltrationsassays auf $<1 \mu\text{l}$) und ein besseres Signalrauschverhältnis erreicht werden konnte.

Ähnlich zu einem Reverse-Phase-Array werden im FoRe Mikroarray kleinste Teststellen mit Proteinen von mehreren verschiedenen Proben verwendet. Zusätzlich ermöglicht es diese Form von Mikroarray jedoch, jede einzelne Testsäule auf verschiedene Zielproteine hin zu untersuchen, wie dies bei einem Forward-Phase-Array der Fall ist. Diese neuartige Kombination von Forward- und Reverse-Phase-Mikroarray verbindet damit die Vorteile der beiden traditionellen Ansätze und beseitigt deren Nachteile (große Probenvolumina, Proteinverlust, Kreuzreaktionen zwischen den Nachweisantikörpern). Außerdem konnten wir unter Verwendung eines Maus/Kaninchen Modellsystems erfolgreich demonstrieren, dass sich das FoRe Mikroarray zum dreidimensionalen Multiplexen eignet. Die Effizienz der Proteinbindung war unabhängig von der Position der jeweiligen Membran im Membranstapel und die Nachweisgrenze für den Maus-IgG-Sandwich-Assay betrug 7.3 pM in BSA und 15 pM in menschlichem Blutplasma.

Messungen mit unserem Modellsystem zeigten, dass das FoRe Array die Gesamtmenge an Zielprotein detektiert, was im Gegensatz zu klassischen Mikroarrays steht, welche typischerweise die Konzentration des Zielproteins nachweisen. Dies stellt eine einzigartige Möglichkeit dar, die Sensitivität dieses Mikroarrays abhängig vom verfügbaren Probenvolumen zu optimieren. Eine Verbesserung der Nachweisgrenze kann damit einfach durch eine Erhöhung des verwendeten Probenvolumens erreicht werden. Um diese Art der Zielproteinkonzentrierung optimal auszunutzen, entwickelten wir ein neuartiges Injektionssystem, welches die Verwendung größerer Probenvolumina erlaubt, ohne die kleinen Teststellendimensionen des FoRe Arrays vergrößern zu müssen.

Die Verwendung von komplexeren klinischen Proben (z.B. Blut) führte anfangs zu einer Verstopfung der Nanometer großen Membranporen. Um mit den minimalen Blutvolumina arbeiten zu können, wie sie beispielsweise nach einer Fersenblutentnahme bei einem Säugling zur Verfügung stehen ($\sim 4 \mu\text{l}$), haben wir eine schnelle und einfache Methode zur Multiplexanalyse in Blut entwickelt. Mit dieser neuen Methodik konnten wir Nachweisgrenzen von 21 fM für Kaninchen-IgG und 18 pM für rekombinantes TNF- α in Blut erreichen. In einem "direct label assay" konnten wir außerdem zeigen, dass unter Verwendung eines FoRe Arrays gleichzeitiges Multiplexing von Teststellen und Zielproteinen auch in solch komplexen Proben möglich ist.

Da das FoRe Mikroarray es ermöglicht, Proteinexpressionsmuster zeitgleich in mehreren kleinsten Probenvolumina zu bestimmen, könnte es beispielsweise dazu verwendet werden, Blutproben von Kleintieren oder Zelllysate in Arzneimittelwirkungsstudien zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit dem Universitäts-Kinderspital Zürich verwendeten wir das FoRe Mikroarray, um Enzymkinetiken zu messen. Hierzu haben wir ein Konzept entwickelt, um Enzymaktivitäten in Echtzeit messen zu können. In einem Modellsystem gelang uns damit der Nachweis von HRP mit einer Nachweisgrenze von 0,88 pM, bezogen auf die Geschwindigkeit der Substratumwandlung.

Die primäre Zielsetzung des FoRe Mikroarray ist es, Proteinmikroarrays leichter zugänglich zu machen. Es repräsentiert ein preiswertes und leicht anpassbares Konzept, welches die Tür zu einer Reihe von Anwendungen öffnet, vom Nachweis von Biomarkern bis zur Analyse von kontaminiertem Wasser.