

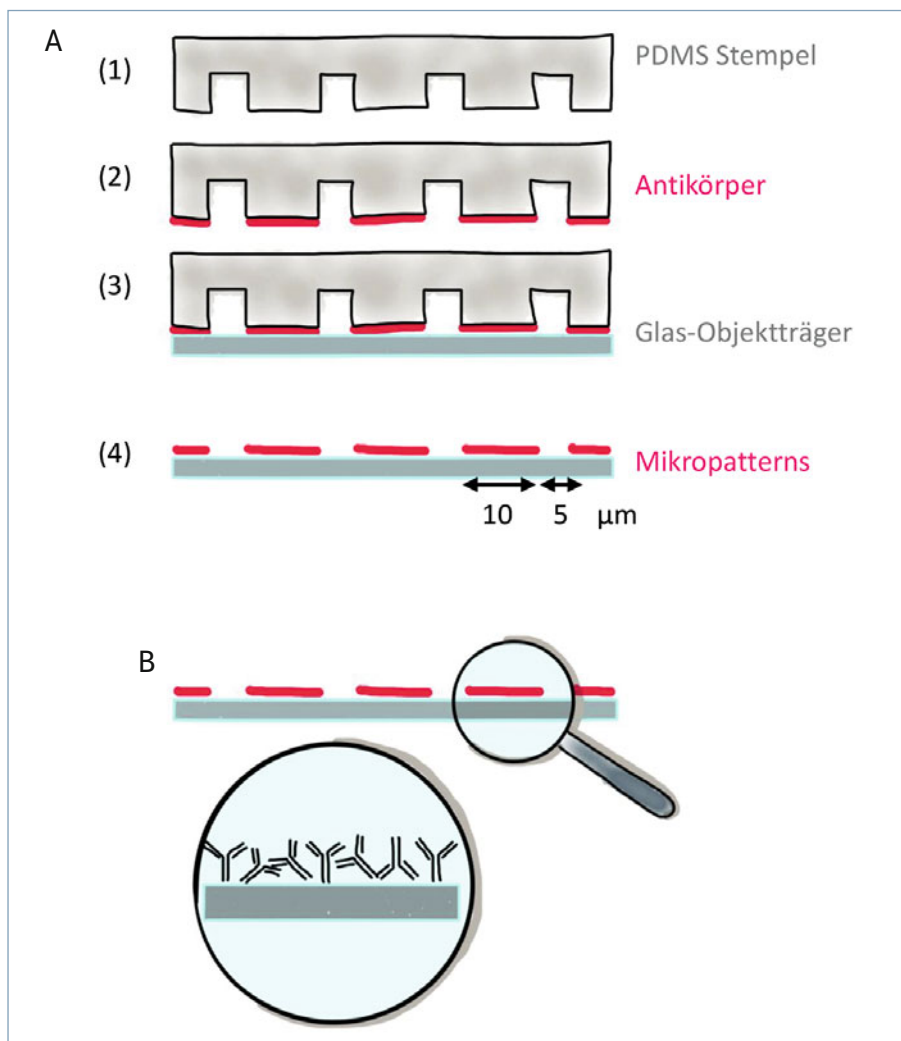
## Array-Entwicklung

# Antikörper-Mikropatterns zur Analyse von Proteininteraktionen in Zellen

CINDY DIRSCHERL, MARIA IOSSIFIDOU, SEBASTIAN SPRINGER  
DEPARTMENT OF LIFE SCIENCES AND CHEMISTRY, JACOBS UNIVERSITY BREMEN

The study of protein-protein and protein-ligand interactions at the cell surface is especially important for understanding many processes that are central to the life of the cell. Here, we present a novel two-hybrid assay based on antibody micropatterns that allows the visualization, measurement, and quantification of such interactions in the natural environment of the cell. We demonstrate the potential of our micropatterns with an immunological example.

DOI: 10.1007/s12268-018-0936-3  
© Springer-Verlag 2018

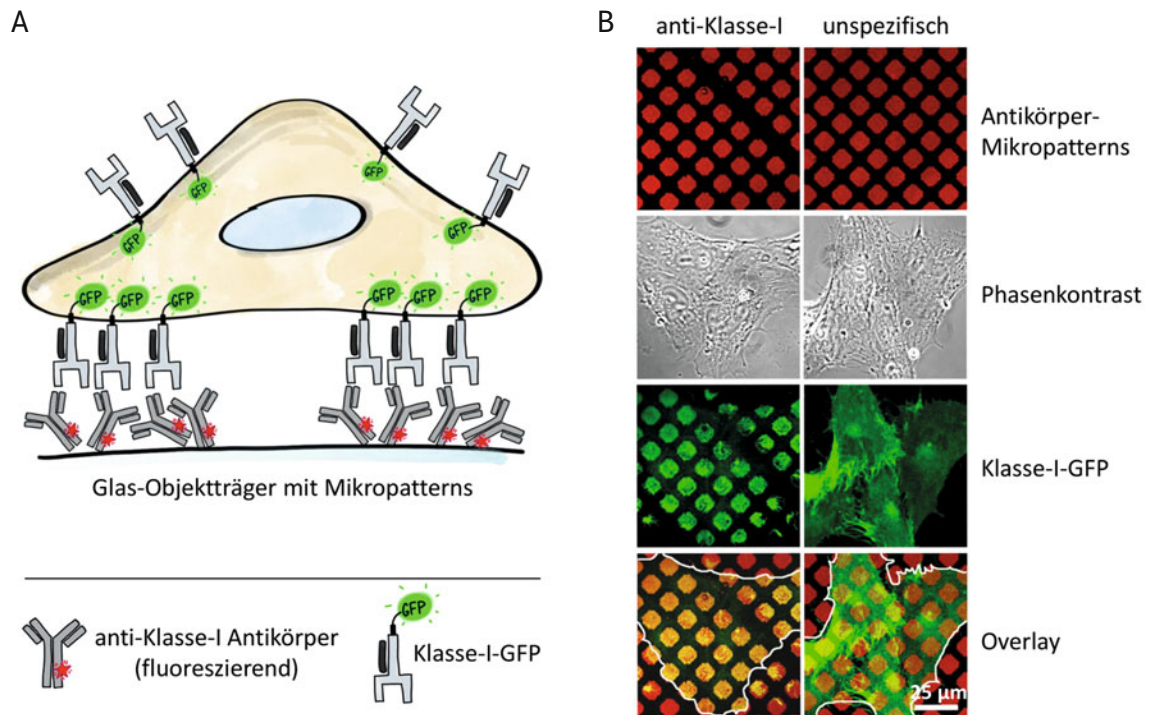


■ Unsere Arbeitsgruppe entwickelt und verwendet gemusterte Proteinoberflächen, die Protein-Mikropatterns, für einen *two-hybrid*-Assay, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erforschen. Hierfür werden Antikörper gegen zelluläre Membranproteine in geometrischen Mustern auf biokompatible Oberflächen gedruckt. Die Membranproteine binden an die Antikörper und werden dadurch entsprechend der Mikropatterns in der Plasmamembran angeordnet. Interaktionspartner der Membranproteine werden ebenfalls in die Mikropatterns rekrutiert und mikroskopisch nachgewiesen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Untersuchung der Interaktionen im zellulären Umfeld erfolgt; Proteinfaltung, Lipidumgebung und Interaktionspartner sind naturgemäß. Für die spezifische Untersuchung von MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I-Proteinen haben wir diesen *two-hybrid*-Assay nun weiterentwickelt und können sogar konformations-spezifische Wechselwirkungen untersuchen.

### Drucken von funktionellen Protein-Mikropatterns

Protein-Mikropatterns werden als Proteinarrays oder Biochips zur Wirkstoffentdeckung oder für Zellscreenings genutzt [1]. Sie werden durch eine Vielzahl von Techniken hergestellt. Die älteste und einfachste Methode ist das Drucken von Proteinen mit Poly(dimethylsiloxan)(PDMS)-Stempeln [2]. Damit lassen sich simple Proteinmuster in Mikro- und Nanometerdimensionen direkt auf Glasobjektträger drucken (Abb. 1). Auf solchen biokompatiblen Oberflächen können dann lebende Zellen

◀ **Abb. 1:** Herstellung von Antikörper-Mikropatterns. **A**, Ein PDMS(Poly(dimethylsiloxan))-Stempel (1) mit dem gewünschten Muster wird in eine Antikörperlösung getaucht (2) und auf eine unbehandelte Glasoberfläche gedrückt (3). Nach Ablösen des Stempels bleibt auf der Glasoberfläche der Antikörper in dem gewünschten Muster zurück (4). **B**, Die Anordnung der gedruckten Antikörper ist zufällig.



▲ **Abb. 2:** Prinzip der Mikropatterns. **A,** Durch die Antikörper-Antigen-Interaktion werden die Membranproteine in Mustern angeordnet. GFP: grün fluoreszierendes Protein. **B,** Funktionalität der Mikropatterns: Zellen, die ein GFP-markiertes Protein (grün) exprimieren, werden auf dem Mikropattern aus spezifischem Antikörper (rot) ausgesät. Bei spezifischem Antikörper (anti-Klasse-I) wird das Protein im Muster des Antikörper-Mikropatterns angeordnet. Ist der Antikörper nicht spezifisch für das Beuteprotein, sieht man kein GFP-Muster (verändert nach [3]).

direkt auf die Mikropatterns ausgesät werden. Die gedruckten Antikörper haften durch physikalische Adsorption auf der Glasoberfläche. Sie sind vermutlich zufällig ausgerichtet, aber dennoch verbleiben im Allgemeinen genug in der richtigen Orientierung, um zelluläre Proteine entsprechend der Antikörpermuster in der Plasmamembran anzuordnen [3, 4]. Da manche Antikörper beim Druck denaturieren, ist es nötig, die Antikörper individuell für diese Anwendung zu testen.

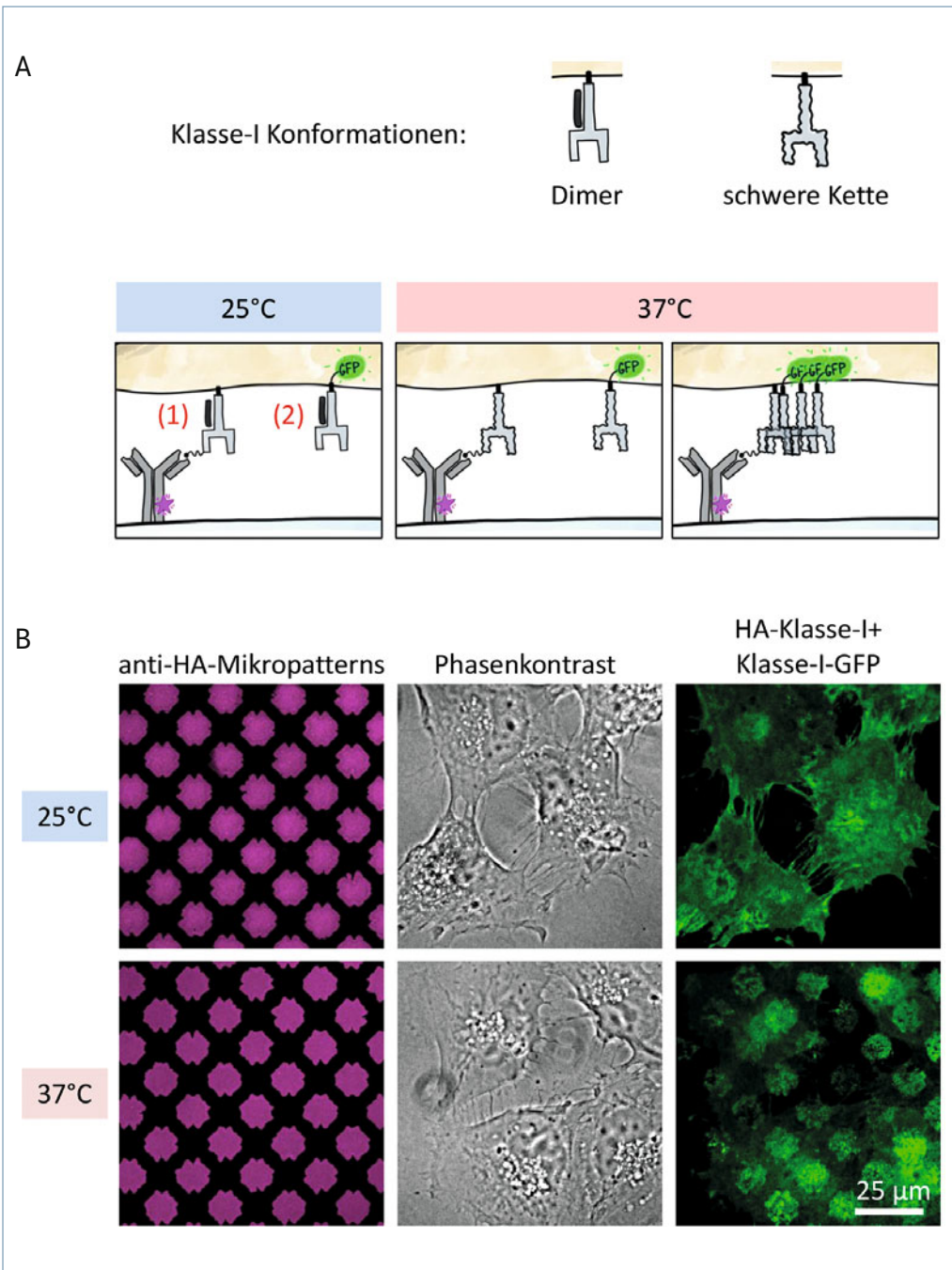
### Kombination von Protein-Mikropatterns mit lebenden Zellen

Für unseren Assay drucken wir zunächst einen fluoreszenzmarkierten Antikörper in einem Mikromuster auf ein Mikroskopiedeckglas. Darauf werden menschliche Fibroblasten ausgesät, die unser Zielprotein exprimieren, welches der Antikörper bindet. Das Zielprotein, das zunächst frei in der Plasmamembran diffundiert, wird durch die Antikörper-Antigen-Interaktion in den Mikropatterns „eingefangen“ und so in der Plasmamembran neu angeordnet. Wenn das Zielprotein mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) fusioniert ist, kann seine neue Anordnung mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen werden. **Abbildung 2** zeigt, dass unser Zielprotein in den Antikörper-Mikropatterns angeordnet wird, indem es durch die Antikörper-Antigen-Interaktion mechanisch

an der Oberfläche festgehalten wird, sofern der gedruckte Antikörper auch spezifisch für das Protein ist.

### Nachweis konformationsspezifischer Interaktionen

Wir haben das Prinzip der Antikörper-Mikropatterns nun verwendet, um einen *two-hybrid*-Assay zu entwickeln, der es erlaubt, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, die nur zwischen bestimmten Proteinkonformationen auftreten. Als Modellproteine verwenden wir MHC-Klasse-I-Proteine (Klasse-I-Proteine), die eine zentrale Rolle im adaptiven Immunsystem spielen. Homotypische Wechselwirkungen zwischen Klasse-I-Proteinen in *cis*, das heißt, wenn beide Proteine auf derselben Membran befindlich sind, sind schon länger vermutet, aber nie eindeutig gezeigt worden. Die funktionelle Form des MHC-Klasse-I-Proteins ist nämlich ein Trimer aus einer schweren Kette (die eine Transmembrandomäne besitzt), einer leichten Kette und einem Peptidliganden von neun bis zehn Aminosäuren. Die leichte Kette ist nicht-kovalent mit der extrazellulären Domäne der schweren Kette assoziiert, sodass sowohl Dimere (schwere und leichte Kette) als auch freie schwere Ketten an der Zelloberfläche existieren [3]. Um die



▲ **Abb. 3:** Die schweren Ketten von MHC-Klasse-I-Proteinen interagieren miteinander. **A,** Für diesen *two-hybrid*-Assay wurden Zellen mit zwei Klasse-I-Konstrukten transfiziert: Klasse-I mit einem extrazellulären HA-Tag (1) und Klasse-I mit einer intrazellulären GFP-Domäne (2). **B,** Zellen wurden auf anti-HA-Mikropatterns bei 25 und 37 °C inkubiert. Die Rekrutierung von Klasse-I-GFP zu den anti-HA-Mikropatterns erfolgt nur bei 37 °C (siehe Text).

Frage zu untersuchen, ob und welche dieser beiden Formen an der Zelloberfläche miteinander wechselwirken, ist es notwendig, die beiden Formen getrennt zu betrachten. Hier lag bisher das technische Problem der Forschung, denn die schwere Kette

alleine hat an der Zelloberfläche nur eine kurze Verweildauer, bevor sie endozytiert und degradiert wird. Daher konnten die vermuteten Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Klasse-I-Proteinen bislang nie zweifelsfrei gezeigt werden [5].

Wir haben deswegen die Antikörper-Mikropatterns zu einem optischen *two-hybrid*-Assay weiterentwickelt, um die Frage zu klären, ob die schweren Ketten von Klasse-I-Proteinen miteinander wechselwirken können.

Hierfür haben wir in derselben Zelllinie zwei verschiedene Fusionsproteine der schweren Kette von Klasse-I-Proteinen exprimiert: Das erste Fusionskonstrukt trägt einen extrazellulären HA-Epitop-Tag (HA-Klasse-I) und das zweite Fusionsprotein eine intrazelluläre GFP-Domäne (Klasse-I-GFP). In der verwendeten Zelllinie ist die Beladung mit Peptidliganden beeinträchtigt, sodass hauptsächlich leere Dimere, aber auch freie schwere Ketten an der Zelloberfläche existieren (**Abb. 3A**). Durch die Temperatur kann man den Anteil von freien schweren Ketten und Dimeren beeinflussen; bei 25 °C findet man vorwiegend Dimere an der Zelloberfläche, während die leichte Kette bei 37 °C von der schweren Kette dissoziiert und vorwiegend freie schwere Ketten zu finden sind [3].

Sät man diese Zellen auf einem Mikropattern aus anti-HA-Antikörpern aus und inkubiert sie bei 25 °C oder 37 °C, so werden die HA-Klasse-I-Proteine entsprechend der Antikörpermuster angeordnet (wie in **Abb. 2**, nur dass die Anordnung nicht erkennbar ist, da die Proteine keine Fluoreszenzmarkierung tragen). Betrachtet man hingegen Klasse-I-GFP, erkennt man einen klaren Unterschied: Bei 25 °C (vorwiegend Dimere) ist keine Musterung zu erkennen. Bei 37 °C (vorwiegend freie schwere Ketten) erkennt man eine klare Verteilung auf die Mikropatterns (**Abb. 3B**). Die freien schweren Ketten von Klasse-I-GFP wechselwirken also mit den freien schweren Ketten von HA-Klasse-I und binden so in die Mikropatterns. Zwischen den Dimeren (bei 25 °C), das heißt, solange die leichte Kette gebunden ist, ist keine Wechselwirkung erkennbar. Wir vermuten, dass die Wechselwirkung der schweren Ketten von MHC-Klasse-I-Proteinen eine Signalwirkung für ihre Endozytose und Degradation hat.



## Ausblick

Wir stellen hier einen neuen *two-hybrid*-Assay vor, der auf Antikörper-Mikropatterns basiert und es erlaubt, Ligandenbindung und Protein-Protein-Wechselwirkungen von Membranproteinen im Kontext der lebenden Zelle zu untersuchen. Dabei ist auch die Untersuchung konformationsabhängiger Wechselwirkungen möglich. Der Assay ist einfach durchzuführen, kostengünstig und universell einsetzbar. Zudem kann er in verschiedene Richtungen weiterentwickelt werden. Eine Möglichkeit wäre, niedriger konzentrierte Interaktionspartner zu identifizieren, die durch die Patterns angereichert werden.

Um auch die Dynamik von Wechselwirkungen zu messen, lässt sich der Assay prinzipiell mit FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Messungen kombinieren. Dabei ist auch ein automatisches *readout* durch eine Software, die die Patternelemente von den Zwischenräumen unterscheiden kann, denkbar. Dies würde die parallele und automatische quantitative Analyse erleichtern. Eine weitere Entwicklungsmöglichkeit ist die Zellyse auf dem Pattern und die anschließende massenspektrometrische Analyse der Mikropatterns, um unbekannte Bindungspartner zu identifizieren.

In der Zukunft könnten auch Patterns mit mehreren Antikörpern funktionalisiert werden. Im Prinzip ist es möglich, nicht nur Antikörper, sondern auch andere Proteine und Liganden jeder Art zu drucken. ■

## Literatur

[1] Dirscherl C, Springer S (2018) Protein micropatterns printed on glass: novel tools for protein-ligand binding assays in live cells. *Eng Life Sci* 18:124–131

- [2] Wilbur JL, Kumar A, Biebuyck HA et al. (1994) Microfabrication by microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnol* 7, doi: 10.1088/0957-4484/7/4/028
- [3] Dirscherl C, Palankar R, Delcea M et al. (2017) Specific capture of peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules by antibody micropatterns allows for a novel peptide-binding assay in live cells. *Small* 13, doi: 10.1002/sml.201602974
- [4] Löchte S, Waichman S, Beutel O et al. (2014) Live cell micropatterning reveals the dynamics of signaling complexes at the plasma membrane. *J Cell Biol* 207:407–418
- [5] Capps G, Robinson BE, Lewis KD et al. (1993) *In vivo* dimeric association of class I MHC heavy chains. Possible relationship to class I MHC heavy chain-beta 2-microglobulin dissociation. *J Immunol* 151:159–169

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sebastian Springer  
Department of Life Sciences and Chemistry  
Jacobs University Bremen  
Campus Ring 1  
D-28759 Bremen  
Tel.: 0421-200-3243  
s.springer@jacobs-university.de

## AUTOREN



### Cindy Dirscherl

Jahrgang 1985. 2005–2012 Bachelor- und Masterstudium Biologie und Zellbiologie an den Universitäten Oldenburg und Osnabrück. Seit 2013 Promotionsstudentin in Zellbiologie an der Jacobs University Bremen.



### Sebastian Springer

Jahrgang 1966. 1985–1992 Biochemiestudium an der Universität Tübingen. 1992–1996 Promotion in Oxford, UK. 1996–2001 Postdoc an der University of California, Berkeley, USA. Seit 2001 Professor der Biochemie und Zellbiologie an der Jacobs University Bremen.



### Maria Iossifidou

Jahrgang 1994. 2013–2016 Biochemie- und Zellbiologiestudium an der Jacobs University Bremen. 2016–2018 Masterstudium der Immunologie an der University of Cambridge, UK.