

**Entwicklung
eines partikelbasierten Verfahrens
für den parallelen Nachweis von Proteinen**

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
Dissertation

von

Nora Theilacker, M.Sc.

aus Heilbronn

Referent: Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb

Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Hubbuch

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 2011

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der genannten Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht und die Quellen angegeben. Die dem Verfahren zu Grunde liegende Promotionsordnung der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH) vom 9. Mai 2011 ist mir bekannt.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie dass ich mich weder anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe noch einen solchen bereits besitze.

Ich versichere, dass die hier vorliegende Dissertation mit dem eingereichten und genehmigten Prüfungsexemplar der Doktorarbeit übereinstimmt.

Heilbronn, den 7.7.2011

Nora Theilacker

Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2007 bis 2011 am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) des Karlsruher Instituts für Technologie und am Department of Bioengineering der University of San Diego, California. Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Sonja Berensmeier, die mir die Möglichkeit bot, meine Doktorarbeit am IFG durchzuführen, und Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb für die engagierte Betreuung und Unterstützung sowohl des in Karlsruhe als auch des in San Diego durchgeführten Teils meiner Arbeit. Das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, und der Freiraum, den er mir bei Bearbeitung des Themas ließ, trugen maßgeblich zum Erfolg meiner Arbeit bei.

Bei Prof. Dr. Jürgen Hubbuch bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

I am especially grateful to Dr. Xiaohua Huang for the opportunity to freely pursue my research in his group and for providing excellent guidance during this time. Due to helpful discussions with him and his group I could successfully finish this research project and broaden my scientific knowledge.

Meinen Arbeitsgruppen verdanke ich viele hilfreiche Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsklima. Auch bei Yvonne Serve und Franziska Zosel möchte ich mich an dieser Stelle nochmals für ihre engagierte Arbeit und große Hilfe im Rahmen ihrer Praktika bedanken.

Zudem danke ich dem Karlsruhe House of Young Scientists für die finanzielle Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes an der University of California, San Diego.

Zusammenfassung

Die Analyse von Krankheitsmarkern in Blutserum ist für die Frühdiagnostik und Therapie vieler Krankheiten wie Zystischer Fibrose, Arthritis und verschiedener Krebsvarianten unerlässlich. Krankheitsmarker dienen sowohl als Indikatoren für den Krankheits- bzw. Therapieverlauf als auch der Überwachung normaler physiologischer Vorgänge im Körper. Die Standardmethode hierfür ist der enzymgekoppelte Immunsorptionsassay (ELISA), bei dem allerdings pro Testdurchlauf jeweils nur ein Krankheitsmarker untersucht werden kann. Die Motivation der vorliegenden Arbeit war der Wunsch nach der Entwicklung eines Verfahrens zur parallelen Analyse mehrerer Proteine (Krankheitsmarker). Zunächst wurde versucht, das von Mirkin veröffentlichte Biobarcode-Verfahren mit im Hause hergestellten magnetischen Mikropartikeln zu etablieren. Bei diesem Verfahren werden mit spezifischen Antikörpern modifizierte Mikropartikel mit der zu analysierenden Probenlösung in Kontakt gebracht. Nachdem das Zielprotein an das Partikel gebunden hat, wird der Komplex magnetisch separiert, wobei andere Probenbestandteile entfernt werden. Die Detektion erfolgt mit Goldnanopartikeln, welche ebenfalls mit Antikörpern und mit „Barcode-DNA“ versehen sind. Der Antikörper auf dem Goldpartikel dient der Erkennung des Zielproteins und die Barcode-DNA dient als Reportermolekül. Hierbei wird eine Art „Sandwich“ aus Magnetpartikel, Zielprotein und Goldpartikel geformt. Dieser Komplex wird magnetisch separiert und daraufhin wird die Barcode-DNA als indirekter Nachweis für die Präsenz des Zielproteins detektiert. Die Barcode-DNA wird durch Amplifizieren (Vervielfältigung) der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Dieser Schritt dient der Signalverstärkung. Das PCR-Produkt wird dann durch Gelelektrophorese analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das Biobarcode-Verfahren Magnetpartikel mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen modifiziert, um eine maximale Antikörperbeladung zu erhalten. Goldnanopartikel wurden hergestellt und mit Barcode-DNA und Antikörpern funktionalisiert, um dann im Biobarcode-Test zusammen mit den funktionalisierten Magnetpartikeln eingesetzt zu werden. Daraufhin wurde das Verfahren mit Hilfe eines Magnetseparationsmoduls automatisiert. Die PCR ist eine sehr effiziente Methode für den Nachweis von DNA, bei der selbst wenige DNA-Moleküle exponentiell vervielfältigt und damit nachgewiesen werden können. Dies kann allerdings auch zu Problemen führen, da selbst geringe unspezifische Wechselwirkungen

zwischen den Magnetpartikeln und den mit Barcode-DNA funktionalisierten Goldpartikeln detektiert werden. Mittels PCR können daher im Prinzip selbst geringste Mengen an Zielprotein im Biobarcode-Assay nachgewiesen werden, aber die Methode ist auch extrem anfällig für falsch positive Ergebnisse. In dieser Arbeit stellte das Auftreten unspezifischer Bindungen eine nicht zu unterdrückende Fehlerquelle dar, die letztendlich die zuverlässige Etablierung dieser Methode verhinderte.

Als Alternative zum Biobarcode-Verfahren wurde daher eine weitere Methode entwickelt, die auf mit Fluoreszenz-Farbstoffen kodierten Mikropartikeln basiert. Hierzu wurden biotinylierte Fluoreszenzfarbstoffe an die Oberfläche von Streptavidin-funktionalisierten Mikropartikeln gekoppelt. Der Kodierungsprozess wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Fluorophore auf den Partikeln innerhalb einer Population hin optimiert. Es wurde gezeigt, dass 27 eindeutig unterscheidbare Partikelpopulationen mit drei Fluoreszenzfarbstoffen in drei Intensitätsniveaus kodiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie unterschieden werden können. Die Entschlüsselung der Partikelcodes und das Auslesen der Reportersignale wurden mit einer für ImageJ entwickelten Software automatisiert. Jede eindeutig kodierte Population kann dabei für die quantitative Analyse eines Zielproteins im Multiplex-Verfahren eingesetzt werden. Die für den Immunnachweis eingesetzten Antikörper wurden biotinyliert und an jeweils eine kodierte Partikelpopulation gekoppelt. Für die Analyse von vier Proteinen wurden vier, mit Antikörpern versehene, Populationen gemischt und in einer Flusszelle immobilisiert. Die Flusszelle besteht aus einem derivatisierten Deckglas, einer doppelseitig klebenden Silikondichtung mit Aussparungen für die Probenkammern und einer beschichteten Aluminiumplatte mit Verbindungen für den Anschluss von Schläuchen für ein- und ausgehende Lösungen. Die Immobilisierung der Mikropartikel, die Zugabe der Proben, verschiedener Reagenzien und alle Waschschrte erfolgten automatisiert mit einer Computer-gesteuerten Spritzenpumpe. Die ermittelten Nachweisgrenzen für die Krankheitsmarker in der Multiplex-Analyse sind vergleichbar mit den Nachweisgrenzen konventioneller Methoden, obwohl im Vergleich zu klinisch etablierten Immunassays nur ein dreißigstel des Probenvolumens benötigt wird. Das hier vorgestellte Verfahren stellt daher eine wertvolle Alternative zu derzeit existierenden immunologischen Nachweismethoden dar, die oftmals zeit- und kostenintensiv sind.

Summary

The analysis of human serum for different biomarkers holds promise for the early detection, diagnosis, and treatment of a variety of diseases, such as cystic fibrosis, arthritis, and multiple types of cancer. Serum biomarkers can be used to monitor the state of disease and therapy progression or simply the functioning of normal biological processes within the human body. For routine analysis of only one or a few analytes, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) remains the workhorse method for protein analysis in basic research and clinical diagnostics. In this study we developed a method for multiplexed analysis of proteins using two different methods. Preliminary we tried to establish the Biobarcode-Assay that was first published by Chad Mirkin using custom made magnetic microbeads. Here, antibody-conjugated magnetic microbeads are incubated with the target protein containing sample and separated magnetically to remove any remaining supernatant. For detection of the captured target protein, antibody and barcode-DNA conjugated gold nanoparticles are used. The antibody allows for binding of the nanoparticle to the protein and the barcode-DNA allows for protein detection and identification. After magnetic separation of the sandwich formed between magnetic bead, protein and nanoparticle the conjugated barcode-DNA is amplified by polymerase chain reaction (PCR) and visualized by gel electrophoresis. For this, antibodies were conjugated to magnetic beads using different coupling chemistries in order to maximize the density of coupled antibodies. Also, gold nanoparticles were synthesized and conjugated with Barcode-DNA and antibodies for sensitive protein detection. The assay was automated using a magnetic separation module developed by collaborators. PCR is a very powerful method, allowing for even a very small number of DNA molecules to be amplified and detected. This can pose problems, however, as even small nonspecific interactions between magnetic beads and DNA-conjugated gold nanoparticles will be detected as well. PCR results in very sensitive protein detection, but is nonetheless susceptible to false positives. In this study nonspecific interactions leading to false positives limited the efficacy of our assay.

As an alternative to the Biobarcode-Assay we established a method for multiplexed protein analysis based on fluorescently encoded microbeads. The microbeads were pre-

functionalized with streptavidin and externally labelled with biotinylated fluorophores. We demonstrated that twenty-seven uniquely encoded microbead populations can be prepared using three intensity levels for each of three different fluorescent dyes, each allowing for detection of a unique protein. Capture antibodies were biotinylated and coupled to four encoded microbead populations for multiplexed detection of four disease markers by fluorescence microscopy. We developed a custom written macro for decoding of the fluorescently labelled microbeads and subsequent signal analysis. The bead populations were combined and immobilized in a flow cell for multiplexed analysis of the four proteins. The immobilization of the encoded beads and all downstream processes are performed within the flow cell. Each channel of the flow cell is formed by a derivatized glass cover slip attached to a silica coated aluminium plate by a double sided cohesive silicone gasket with cut-out channels. The custom-built aluminium plate includes ports that allow for tubing connections. Samples and reagents and washing solutions are introduced into the flow channel using a computer-controlled syringe pump. Proteins can be analyzed with sensitivities comparable to standard protein immunodiagnostic methods, yet only 5 μ L sample volume is needed. This multiplexed approach provides a useful and potentially superior alternative to existing immunological assays which are often cost- and labour intensive.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	i
Danksagung	iii
Zusammenfassung.....	v
Summary.....	vii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretischer Teil.....	4
2.1 Auswahl verschiedener Krebsmarker als Modellproteine	4
2.2 Verfahren für den immunologischen Nachweis von Proteinen	6
2.2.1 ELISA	6
2.2.2 Antikörperarrays.....	7
2.2.3 Partikelbasierte Verfahren	8
2.3 Das Biobarcode-Verfahren für den parallelen Nachweis von Proteinen	13
2.3.1 Prinzip des Verfahrens.....	13
2.3.2 Nachweis der Barcode-DNA	14
2.4 Kodierte Mikropartikel für den parallelen Nachweis von Proteinen	18
3 Experimenteller Teil	21
3.1 Teil I: Das Biobarcode-Verfahren.....	21
3.1.1 Herstellung von magnetischen Mikro- und Gold-Nanopartikeln.....	21
3.1.2 Der Biobarcode-Assay.....	30
3.2 Teil II: Paralleler Proteinnachweis mittels kodierter Mikropartikel	34
3.2.1 Kodierung von Mikropartikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen	34
3.2.2 Funktionalisierung der Mikropartikel mit Antikörpern.....	35
3.2.3 Die fluidische Analysezelle	37

3.2.4	Epi-Fluoreszenzmikroskopie.....	41
3.2.5	Dekodierung der Mikroartikel.....	42
3.2.6	Immunassays	43
4	Ergebnisse und Diskussion	48
4.1	Teil I: Das Biobarcode-Verfahren.....	48
4.1.1	Synthese und Funktionalisierung von magnetischen Mikropartikeln	48
4.1.2	Synthese und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln.....	52
4.1.3	Automatisierung des Assays mit einem Magnetseparationsmodul	55
4.1.4	Optimierung der Versuchsparameter	56
4.1.5	Nachweis von PSA durch SDS-PAGE und Western Blot	71
4.1.6	Resümee zum Biobarcode-Assay und Vergleich mit Literaturergebnissen ..	76
4.2	Teil II: Kodierte Mikropartikel für den parallelen Proteinnachweis	80
4.2.1	Kodierung von Mikropartikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	80
4.2.2	Dekodierung der Mikroartikel.....	86
4.2.3	Funktionalisierung der Mikroartikel mit Antikörpern.....	91
4.2.4	Immunassays	98
5	Resümee und Ausblick	125
6	Anhang	129
7	Literaturverzeichnis	145
	Lebenslauf	150

1 Einleitung und Zielsetzung

Viele Krankheiten zeichnen sich durch ein bestimmtes Proteinexpressionsmuster aus, das heißt der Körper des Patienten produziert entweder mehr oder weniger eines bestimmten Proteins als ein gesunder Mensch [1, 2]. Darum wird die Diagnose vieler Krankheiten durch klinische Tests unterstützt, bei denen Blut- oder Serumproben des Patienten auf bestimmte Krankheitsmarker hin untersucht werden. Diese Tests umfassen den Nachweis von Krebs, Allergien, Infektions- und Autoimmunkrankheiten, um nur einige davon zu nennen [3]. Oft geben bereits geringste Konzentrationsunterschiede an Krankheitsmarkern Aufschluss über den Verlauf der Krankheit oder auch über den Verlauf einer Therapie. Studien belegen, dass eine frühe Diagnose von Krankheiten wie Krebs die Überlebenschance des Patienten erhöht. In frühen Stadien liegen spezifische Krankheitsmarker aber oft in nur sehr geringen Konzentrationen vor [4, 5]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Diagnosen, die auf dem Auftreten mehrerer Krankheitsmarker beruhen, sich weniger häufig als falsch herausstellen als solche, die sich nur auf einen Krankheitsmarker stützen [6, 7]. Um Krankheiten möglichst früh diagnostizieren zu können, werden daher möglichst empfindliche und spezifische Tests gebraucht, die im Idealfall mehrere Krankheitsmarker gleichzeitig selbst in geringen Konzentrationen nachweisen können.

Der derzeit gängigste klinische Test für den Nachweis von Proteinen ist der enzymgekoppelte Immunsorptionstest (englisch: enzyme linked immuno assay bzw. ELISA) [8]. Nachteile dieses Verfahrens sind die zeitaufwändige Etablierung und Durchführung des Tests sowie der niedrige Durchsatz [9]. Pro Analysereihe kann jeweils nur ein Krankheitsmarker quantitativ bestimmt werden. Zudem geht der Test im Gegensatz zu mikrofluidischen Systemen mit einem hohen Konsum an kostspieligen Reagenzien und, je nach Umfang der zu testenden Probenbestandteile, auch mit einem hohen Bedarf an Patientenproben (z.B. Blutproben) einher.

Die Motivation dieser Arbeit war der Wunsch nach der Entwicklung eines Multiplex-Verfahrens als Ersatz für die bisher unzuverlässige Diagnose von Prostatakrebs, welche auf dem immunologischen Nachweis des umstrittenen Krankheitsmarkers Prostata-

Spezifisches-Antigen (PSA) basiert [10, 11]. „Multiplex“ bedeutet in diesem Fall, dass mehrere Krankheitsmarker gleichzeitig während nur eines Versuchsdurchlaufs und im gleichen Reaktionsgefäß analysiert werden. Aus Forschungen des Instituts für Toxikologie und Genetik (Karlsruher Institut für Technologie) gingen vier potentielle Krankheitsmarker für eine eindeutigere Diagnose des Prostatakarzinoms hervor. Einer dieser Marker ist das sekretorische Glykoprotein CRISP3. Neben CRISP3 wurden noch weitere Proteine als Modellproteine bei der Etablierung des partikelbasierten Proteinnachweisystems verwendet. Ziel dieser Arbeit war aber nicht das Auffinden neuer Krankheitsmarker oder die Bewertung deren Tauglichkeit, sondern die Entwicklung eines universellen Verfahrens, das es erlaubt, eine hohe Anzahl an Krankheitsmarkern gleichzeitig zu analysieren.

Ein Verfahren, das in dieser Arbeit Anwendung finden sollte, ist das von Chad Mirkin entwickelte „Biobarcode-Verfahren“, bei dem mehrere Proteine oder auch Nukleinsäuren gleichzeitig nachgewiesen werden können. Zwei verschiedene Partikel werden bei dem Nachweisverfahren verwendet. Magnetische Mikropartikel (MP) werden mit spezifischen Fangantikörpern versehen, um das Zielprotein aus der Lösung zu extrahieren und Goldnanopartikel (Au-NP) werden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Detektionsantikörper versehen, um mit dem Zielprotein ein „Sandwich“ zu bilden. Das Zielprotein wird dabei mit Hilfe der beiden Antikörper von dem Goldpartikel und dem Magnetpartikel eingeschlossen. Auf dem Goldpartikel befinden sich neben dem Detektionsantikörper hunderte thiolmodifizierte „Barcode“-Oligonukleotide (Barcode-DNA). Nach der Reaktion mit dem Analyten wird der Komplex aus MP, Zielprotein und Au-NP magnetisch separiert, die Barcode-DNA wird daraufhin abgelöst, vervielfältigt und dient als indirekter Nachweis für die Präsenz des Zielproteins [12]. Zunächst sollte das Biobarcode-Verfahren für PSA etabliert und getestet werden. Hierzu mussten magnetische Mikropartikel und Nanopartikel hergestellt, chemisch aktiviert und mit Antikörpern (Ak) und Barcode-DNA modifiziert werden. Nach einer manuellen Etablierung sollte der Nachweistest auf ein Hochdurchsatz-Verfahren übertragen werden, welches auf dem „chemagic Prepito“, einer Robotereinheit mit integrierter Magnetseparation des Kooperationspartners *chemagen Biopolymer-Technologie AG*, basiert. Hierzu waren eigens für das Biobarcode-Verfahren Betriebsprotokolle für die Robotereinheit zu

erstellen und das Versuchsprotokoll den Gegebenheiten des Magnetseparationsystems anzupassen.

Als alternatives „Multiplex“-Verfahren sollte in Kooperation mit Prof. X. Huang von der *University of California, San Diego* eine weitere Technik zum parallelen Nachweis von Proteinen entwickelt und erprobt werden. Diese basiert auf dem optischen Nachweis eines markierten Detektionsantikörpers, im Gegensatz zum indirekten Nachweis des Biobarcode-Verfahrens. Der Test wird in einer fluidischen Analysezelle an Mikropartikeln durchgeführt, die daraufhin fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Für dieses Verfahren müssen Mikropartikel optisch kodiert, mit Antikörpern versehen und danach in einer fluidischen Kammer immobilisiert werden. Jeder Farbkode steht dabei für eine Art Fang-Antikörper, der z.B. gegen den Krankheitsmarker „A“ gerichtet ist. Vereinfacht gesagt bedeutet ein optisches Signal des Detektionsantikörpers auf „roten“ Partikeln, dass eine Patientenprobe den Krankheitsmarker „A“ aufweist, ein Signal des Detektionsantikörpers auf den „blauen“ Partikeln weist den Marker „B“, nach, etc.. Theoretisch können Partikel mit tausenden Farbkodierungen hergestellt und gleichzeitig verwendet werden, und damit können genau so viele verschiedene Krankheitsmarker gleichzeitig analysiert werden wie Farbcodes vorhanden sind. Die Reaktionskammer der Analysezelle sollte nur ein Volumen von ca. 3 μL - 5 μL umfassen. Zu- und Ablauf aller Reagenzien sollten über eine automatisierte Spritzenpumpe erfolgen. Das angestrebte Format erlaubt daher eine erhebliche Reduktion an Verbrauchsmaterialien wie Antikörpern, Probenvolumen, Waschlösungen, etc. gegenüber dem ELISA-Format.

Zur Realisierung dieses zweiten Verfahrens war eine fluidische Analysezelle, die als Reaktionsplattform dient, zu entwerfen. Weitere Ziele umfassten die Generierung mehrerer mit Fluoreszenzfarbstoffen kodierter Partikelpopulationen sowie die Programmierung einer Bildauswertungssoftware, die in der Lage sein sollte, den Farbkode der Partikel anhand von Aufnahmen eines Fluoreszenzmikroskops zu dekodieren. Als Beleg der Funktion des Verfahrens waren Mikropartikel mit verschiedenen Antikörpern zu funktionalisieren und der gleichzeitige Nachweis verschiedener Krankheitsmarker zu führen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Auswahl verschiedener Krebsmarker als Modellproteine

Obwohl PSA als Prostata-Tumormarker weitgehend akzeptiert ist, ist auch bekannt, dass PSA zwar spezifisch für das Prostata-Gewebe, aber nicht tumorspezifisch bei malignen Veränderungen des Gewebes ist. PSA-Werte steigen auch bei Männern mit gutartigen Prostatahyperplasien (BPH) oder Prostataentzündungen [13]. Diese nicht unbedeutende Überlappung der PSA-Werte im Serum von Männern mit nicht-malignen Erkrankungen der Prostata mit den PSA-Werten im Falle von Prostatakarzinomen ist der limitierende Faktor beim Einsatz von PSA als Tumormarker. Dennoch ist die Bestimmung des Serumspiegels von PSA der am besten geeignete und akzeptierte Test. Seit der Einführung dieses Testes in den 90er Jahren wurden zur Früherkennung stichprobenartig Untersuchungen von Männern ohne Symptome durchgeführt, die jedoch aus mehreren Gründen nicht erfolgreich waren. Zum einen wird nur etwa ein Viertel bis ein Drittel aller Männer ohne Symptome, aber mit hohem PSA-Wert, an Prostatakrebs erkranken. Bis zu zwei Drittel aller Männer mit erhöhtem PSA-Wert erkrankt nicht an Prostatakrebs, leidet aber unter der Angst zu erkranken und den Unannehmlichkeiten und Risiken der Untersuchungen [14]. Zum anderen haben 20% - 30% aller Männer mit Prostatakrebs einen normalen PSA-Wert (< 4 ng/ml [15]).

Die letzten Jahre haben zur Identifizierung hunderter Gene geführt, von denen angenommen wird, dass sie eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Prostatakarzinoms spielen. Diese Ergebnisse lieferten nicht nur mehr Einblick in die Tumorentstehung und -progression, sondern haben auch gezeigt, dass Prostatakrebs eine sehr inhomogene Erkrankung ist. Durch die multifokale Natur dieser Erkrankung können verschiedene Prostatatumore in der Prostata eines einzelnen Patienten auftreten. Jeder dieser Tumoren kann beachtliche Unterschiede bezüglich der Genexpression und seines Verhaltens aufweisen. Wie auch jüngste Studien belegen, ist es deshalb nötig, für eine spezifische Diagnose neben PSA noch weitere Krankheitsmarker einzubeziehen [16, 17]. Zur Etablierung eines Multiplex-Systems wurden hier neben PSA das vom Institut für Toxikologie und Genetik als Prostatakrebs-Marker vorgeschlagene Protein CRISP3 (engl.:

cysteine-rich secretory protein 3) als Modellprotein eingesetzt. CRISP-3 ist ein Glykoprotein mit bislang unbekannter Funktion. In-situ-Hybridisierungsexperimente zeigen, dass es spezifisch in Epithelien vorkommt und in Adenokarzinomen der Prostata im Vergleich zum normalen Prostatagewebe stark überexprimiert wird [18]. Antikörper gegen CRISP3 sind kommerziell erhältlich. Da die Antikörper gegen weitere vom Institut für Toxikologie und Genetik vorgeschlagene Kandidaten bisher nicht kommerziell erhältlich sind, wurde stattdessen auf die bereits als Krebsmarker etablierten und kommerziell erhältlichen Proteine ErbB2 und TNF-alpha und die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 zurückgegriffen. Der Rezeptor ErbB2 (engl.: human epidermal growth factor receptor 2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. ErbB2 spielt eine Rolle bei der Diagnose von Brustkrebs. In etwa 20% aller Brustkarzinome ist das Protein überexprimiert [19]. Die Überexpression dieses Proteins wird auch mit weiteren Krebsarten in Verbindung gebracht [20]. TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha) ist ein Zytokin, welches als Signalstoff bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt. Das von Makrophagen produzierte TNF-alpha reguliert die Aktivität weiterer Immunzellen und kann die Apoptose, Zellproliferation und Zelldiversifikation anregen. Eine Fehlregulation der Expression von TNF-alpha wurde mit verschiedenen Krankheiten und auch mit Krebs in Verbindung gebracht [21]. IL-6 (Interleukin-6) und IL-8 (Interleukin-8 oder auch CXCL8) spielen bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. IL-6 tritt in erhöhten Konzentrationen bei Infektionskrankheiten auf und eine erhöhte Serumkonzentration dieses Proteins wird mit einer Reihe weiterer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [22, 23].

2.2 Verfahren für den immunologischen Nachweis von Proteinen

2.2.1 ELISA

Seit seiner Erfindung vor fast 40 Jahren hat sich der enzymgekoppelte Immunsorptionsstest ELISA als quantitative Analysemethode für Proteine heute in jedem modernen Labor etabliert. Da es sich bei den meisten Krankheitsmarkern um Proteine handelt, können diese immunologisch, d.h. durch den Einsatz spezifischer Antikörper, nachgewiesen werden. Bei einem „Sandwich-ELISA“ wird zunächst ein Fangantikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Danach erfolgt die Zugabe der zu untersuchenden Probe mit unbekannter Menge Antigen (das Zielprotein). Hiernach wird ein für das Antigen spezifischer Antikörper zugegeben, an den ein Enzym gekoppelt ist. Die Intensität einer Farbreaktion, die durch das am Antikörper gebundene Enzym katalysiert wird, gibt Aufschluss über die Menge an Antigen, die in der Probe vorhanden war. Es gibt verschiedene Abwandlungen des ELISAs, je nachdem ob es sich bei dem Zielprotein um ein Antigen oder einen Antikörper handelt und je nach Natur der zu untersuchenden Probe. Die Nachweisgrenze für Immunassays liegt typischerweise im nanomolaren Bereich [24]. Abbildung 1 stellt schematisch den Ablauf eines Sandwich-ELISAs dar. Dabei agiert das nachzuweisende Protein als Antigen und bindet an zuvor immobilisierte Fangantikörper. Der Detektionsantikörper ist mit einem Enzym markiert, welches als Signalreporter dient.

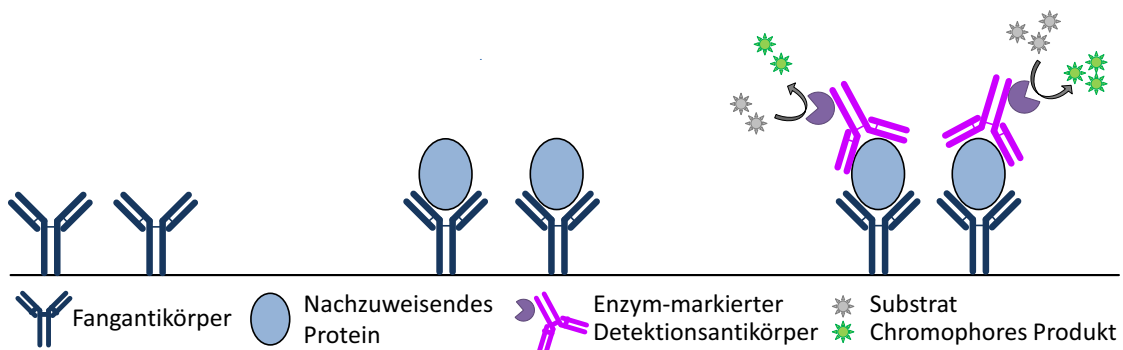


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines "Sandwich-ELISAs"

Der größte Nachteil dieses Verfahrens ist der niedrige Durchsatz, da pro Testdurchlauf jeweils nur ein Krankheitsmarker quantitativ bestimmt werden kann. Normalerweise werden verschiedene Verdünnungen einer Patientenprobe auf einer Mikrotiterplatte in

mindestens dreifacher Ausführung untersucht. Daneben müssen Reaktionskammern für Kontrollen und eine Standardkurve, beides ebenfalls in mehrfacher Ausführung, eingeplant werden. Das heißt, dass pro Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (ELISA-Standardformat) maximal vier Patientenproben auf einen Krankheitsmarker untersucht werden können. Um dem Abhilfe zu schaffen, wurden diverse Analysegeräte entwickelt, die in der Lage sind, die Probenvorbereitung, Pipettierarbeiten, photometrische Messungen und die Auswertung von Mikrotiterplatten-Tests automatisiert zu übernehmen. Diese Geräte beanspruchen mehrere Quadratmeter in einem Labor und sind entsprechend kostspielig [25, 26].

2.2.2 Antikörperarrays

Sollen viele Analyten gleichzeitig untersucht werden, so ist derzeit die flächige Anordnung von Sondenmolekülen in Mikroarrays das Verfahren der Wahl [27-31]. In diesen Arrays werden Fangmoleküle wie Antikörper, Oligonukleotide oder Wirkstoffkandidaten gitterförmig auf Trägern platziert. Eine Farbreaktion gibt Auskunft über Qualität und Quantität tausender Inhaltsstoffe einer zu testenden Probe [31, 32]. Um die Sensitivität der Arrays zu verbessern, können auch Aptamere zur Detektion der Proteine auf den Arrays eingesetzt werden [33]. Die Identität des Zielmoleküls wird durch die Position im Array bestimmt. Vor allem DNA-Mikroarrays für die Genforschung sind seit den 90er Jahren weit verbreitet [34], mittlerweile sind aber auch einige Proteinarrays kommerziell erhältlich [35]. So wurde beispielsweise eine Studie veröffentlicht, in der Seren von Prostatakrebs-Patienten mit Proben gesunder Menschen mit Hilfe von Antikörper-Arrays untersucht wurden. In dieser Studie wurden einige schon bekannte Alternativmarker zu PSA bestätigt und weitere neue Marker gefunden [36].

Ein Nachteil von Antikörperarrays liegt in deren Herstellungsweise. Die Sondenmoleküle müssen alle unter Verwendung derselben oberflächenchemischen Methoden aufgebracht werden, obwohl diese Bedingungen nicht für alle Moleküle gleichermaßen geeignet sind [37]. Zudem sind die Analysengeschwindigkeit und die Qualität der Ergebnisse von den Eigenschaften der Arrayoberfläche abhängig und der Nutzer muss sich mit der Auswahl an Sondenmolekülen, die der Hersteller anbietet, abfinden. Oligonukleotide sind im

Vergleich zu Proteinen robuster und unterscheiden sich im Gegensatz zu Proteinen nur in der Basensequenz. Sie eignen sich daher erheblich besser für die Verwendung in Mikroarrays. Proteine können auf der planaren Oberfläche des Arrays denaturieren und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist stärker von den Lagerungsbedingungen und der Natur der Proteine selbst abhängig, als dies bei DNA-Arrays der Fall ist [35, 38].

2.2.3 Partikelbasierte Verfahren

Da planare Oberflächen für die Aufbringung von Proteinen nicht optimal geeignet sind, bieten manche Hersteller Mikropartikel an, die mit verschiedenen Sondenmolekülen gekoppelt sind und der Verbraucher kann sich, je nach Interessensgebiet, seine eigene „Bibliothek“ an Partikeln zusammen stellen [37, 39, 40]. Der Hersteller kann durch die Verwendung von Partikeln als Festphase die Bedingungen für die Bindung jedes Sondenmoleküls einzeln optimieren und somit dem Verbraucher eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garantieren. Mikropartikelbasierte Verfahren bieten mehrere Vorteile gegenüber Antikörper-Arrays. Durch das größere Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erzeugen die Partikel ein stärkeres Signal als planare Flächen. Weitere Aspekte sind die im Gegensatz zur Festphasenkinetik schnellere Fluidphasenkinetik, die für Reaktionen in Suspension gilt ebenso wie eine größere Präzision, da für jeden Analyten mehrere Hundert Partikel ausgelesen werden [41-43]. Je nach gewünschter Anwendung können die Partikel mit spezifischen Liganden chemisch modifiziert werden und erreichen dabei eine hohe Selektivität und Affinität bezüglich einer bestimmten Zielsubstanz. Die Mindestgröße der Partikel ergibt sich aus den Anforderungen der Trenn- und Waschschriffe. Magnetseparation, Zentrifugieren und Filtration sind hierbei die wichtigsten Trennmethode. Kleine Partikel laufen Gefahr, beim Zentrifugieren irreversibel zu verklumpen. Bei der Filtration müssen die Mikropartikel deutlich größer als die Reportermoleküle sein, um eine effiziente Trennung der Partikel von allen weiteren Komponenten der Lösung zu gewährleisten. Magnetische Partikel bieten den Vorteil, dass spezifisch an der Oberfläche der Partikel gebundene Zielmoleküle aus einem komplexen Medium zusammen mit den Partikeln magnetisch separiert werden können. Die Separation ist unabhängig von der Größe weiterer Komponenten in der Lösung. Alle nichtmagnetischen Bestandteile der Lösung werden verworfen. Das erspart

aufwendige Vorreinigungsschritte wie Zentrifugieren oder Filtration, um beispielsweise Zellen aus einer Blutprobe zu entfernen. Die Zielmoleküle können danach entweder eluiert oder im Falle immunologischer Nachweisverfahren direkt qualitativ und quantitativ analysiert werden. Mehrere partikelbasierte Verfahren zur quantitativen Analyse von Proteinen wurden bereits erfolgreich angewandt. Die am häufigsten angewandte Methode ist der Nachweis des Zielproteins mit Hilfe eines fluoreszierenden oder Enzym-gekoppelten Antikörpers [44, 45]. Die Reaktion des Analyten mit dem Partikel erfolgt dabei in Suspension, gefolgt von der Zugabe spezifischer markierter Antikörper, deren Signal meist in Durchflusscytometern ausgelesen wird. Ein weiteres, oft empfindlicheres, aber auch arbeitsintensiveres Verfahren ist die partikelbasierte Detektion des Reportermoleküls mittels Amplifikation von Nukleotidsequenzen durch Real-Time PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion). Hierfür können entweder Aptamere (kurze Oligonukleotidsequenzen zur Erkennung kleiner Proteine oder anderer Moleküle), mit einem Oligonukleotid gekoppelte Antikörper oder sogenannte „Proximity Ligation Probes“ an Stelle fluoreszierender Antikörper verwendet werden. Aptamere können direkt mittels Real-Time PCR amplifiziert und quantifiziert werden. Proximity Probes bestehen aus zwei mit kurzen Oligonukleotidsequenzen versehenen Antikörpern, die jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft (Proximity) an ein Epitop des nachzuweisenden Proteins binden. Eine zu beiden Nukleotidsequenzen komplementäre Sequenz verbindet die beiden Oligonukleotide (Ligation) und das Produkt, also die Kombination beider Oligonukleotide, wird nur dann vervielfältigt, wenn beide Antikörper gleichzeitig und in unmittelbarer Nähe voneinander an das nachzuweisende Protein gebunden haben [9, 46, 47].

Eine Methode, bei der kodierte nichtmagnetische Mikropartikel in einem Multiplex-Nachweis Einsatz finden, ist das xMap-Flüssiganalysesystem von Luminex [48]. Bei dieser Methode werden Polymerpartikel mit zwei organischen Farbstoffen in verschiedenen Farbintensitäten kodiert. Jede Partikelpopulation wird dann vom Anwender mit spezifischen Sondenmolekülen versehen. Die verschieden farbigen Partikelsets werden gemischt und ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyten, wobei die Identität der einzelnen Analyten durch die Farbkodierung der einzelnen Partikel und die Konzentration des Analyten durch ein Reportermolekül angezeigt wird. Die Analyse

erfolgt in speziellen Filterplatten und erfordert einen höheren Bedarf an Reagenzien und Probenmaterial als die Analyse von Proben in fluidischen Kanälen. Die Auswertung der Partikel erfolgt automatisiert in einem Flusscytometer durch Anregung der Partikel mit verschiedenen Lasern. Mit diesem System können sowohl Proteine als auch Oligonukleotide quantifiziert werden [49]. Der Anwender muss zur Nutzung dieses Systems über einen kostspieligen mit mehreren Lasern ausgestatteten Flusscytometer (Fabrikpreis der FLEXMAP 3D® ist derzeit US\$ 150.000) mit Datenverarbeitungssoftware sowie über eine geeignete Filtrationsausrüstung für die Probenvorbereitung verfügen.

2.2.3.1 Kodierungsmethoden für Multiplex-Analysen

Um Mehrfachanalysen durchzuführen, müssen die Sondenmoleküle auf die eine oder andere Weise kodiert werden. Im Falle der zweidimensionalen Arrays geschieht dies durch die Position im Gitter, doch im Falle von mobilen Partikeln müssen die Partikel selbst kodiert werden. Verschiedene Eigenschaften von Mikropartikeln wurden zur Kodierung bereits eingesetzt [50, 51]. Im Folgenden werden nur die am häufigsten angewandten Methoden beschrieben.

Um Mikropartikel optisch zu kodieren, werden diese meist mit einem oder mehreren Farbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Polymerpartikel quellen in organischen Lösungsmitteln, was die Diffusion von Farbstoffen in das Innere der Partikel erlaubt. In einem wässrigen Medium schrumpfen die Partikel wieder und die Farbstoffmoleküle bleiben im Polymer eingeschlossen. Durch die Kombination von Farbstoffen mit verschiedenen Farbspektren und verschiedenen Konzentrationen, erhält man $n \cdot I^C$ verschiedene Codes (n =Anzahl der Codes, I =Anzahl der Intensitäten und C = Anzahl der Farben). Theoretisch könnten mit diesem Verfahren Millionen verschiedener Codes produziert werden, doch praktisch überlappen die Spektren der Farbstoffe und auch die Anzahl der unterscheidbaren Intensitäten eines einzelnen Farbstoffs ist begrenzt. Je mehr Farbstoffe und Intensitäten verwendet werden, desto schwieriger wird der Kodierungsprozess und desto komplizierter wird auch die Entschlüsselung des Codes. Im Falle von Fluoreszenzfarbstoffen werden, um mehrere Anregungsspektren für die verschiedenen Farbstoffe abzudecken, Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen benötigt. Dabei können Energieübertragungsphänomene

zwischen den Farbstoffen auftreten, was zu Komplikationen bei der Dekodierung führt. In Multiplexsystemen muss zudem ein Spektralbereich für das Reportermolekül ausgespart werden. Dieser Bereich steht also nicht für die Kodierung zu Verfügung. Das Auslesen der Partikel erfolgt meist in einem Flusscytometer, der mit Lasern für die Anregung der kodierenden Farbstoffe und mit einem Laser für die Anregung des Reportermoleküls ausgestattet sein muss. Eine weitere Methode ist der Einsatz von Halbleiter-Quantendots an Stelle organischer Fluorophore oder Farbstoffe [52, 53]. Die Größe der Quantendots bestimmt deren Emissionsspektrum. Verschieden farbige Quantendots können mit derselben Wellenlänge angeregt werden und besitzen schmale Emissionsspektren. Etwa 10 Farben können spektral ohne große Überlappung ausgelesen werden. Zudem sind Quantendots im Gegensatz zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen resistent gegen Ausbleichen. Mit einem Durchmesser zwischen 5 nm und 50 nm sind sie im Vergleich zu organischen Farbstoffen aber auch deutlich größer, was die Einlagerung in Mikropartikel erschwert. Größere Mikropartikel können aber durchaus mit Quantendots oder anderen spektral unterscheidbaren Nanopartikeln kodiert werden [38, 54].

Eine weitere Kodierungsmethode besteht im graphischen Kodieren. Mikropartikel werden mit Mustern versehen, die genau wie herkömmliche Strichcodes ausgelesen werden können. So wurden beispielsweise Metallnanostäbe aus Aluminiumoxid hergestellt und mit Gold- und Silberstreifen versehen. Beide Edelmetalle reflektieren unter Anregung mit einer Wellenlänge von 405 nm, jedoch unterschiedlich stark. Gold und Silber können zudem leicht mit Sondenmolekülen funktionalisiert werden. Der Code dieser Metallstäbchen kann lichtmikroskopisch unter Verwendung einer Mustererkennungssoftware ausgelesen werden, die nachzuweisenden Biomoleküle können durch Fluoreszenz detektiert werden [55].

Zur chemischen Kodierung von Mikropartikeln bieten sich vor allem DNA-Oligonukleotide wegen ihrer hohen Informationsspeicherkapazität an. Durch Variationen in der Sequenz können viele verschiedene Codes kostengünstig hergestellt werden. Nanopartikel und Mikropartikel mit solchen Barcode-Sequenzen wurden von Mirkin und Kollegen für die parallele Analyse mehrerer DNA-Fragmente und auch Proteine eingesetzt. Die

Auswertung der Barcodes erfolgt per PCR oder auf zweidimensionalen Arrays [56]. Diese Methode wird im Folgenden noch genauer beschrieben.

Auch physikalische Eigenschaften wie die Partikelgröße oder der Brechungsindex können zur Kodierung verwendet werden. Diese Eigenschaften allein sind meist nicht für Multiplexanalysen geeignet, doch in Kombination mit optischen Verfahren können physikalische Eigenschaften die Anzahl möglicher Codes vervielfältigen. Beispielsweise wurde eine Kombination aus der Partikelgröße, der Helligkeit der Lumineszenz (phosphoreszierender Farbstoff) und der Abklinggeschwindigkeit der Lumineszenz zur Kodierung von Mikropartikeln verwendet [57].

2.2.3.2 Entschlüsselung des Kodes

Photolumineszierende Partikel können genauso wie fluoreszierende Zellen in einem Flusscytometer ausgelesen werden. Die Zellen oder Partikel passieren einen Laser, der die Fluoreszenzstoffe anregt. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich ein Sensor, der die Emission der Farbstoffe misst. Einige Flusscytometer registrieren auch physikalische Eigenschaften wie die Partikelgröße oder die Form durch Auswertung des Streulichts. Ein Strömungssystem leitet die Partikel so durch Kanäle, dass sie den Fokus der Lichtquelle mit nur geringer Abweichung passieren. Es ist möglich, die Analysen ohne Trennschritte durchzuführen, da der Fokus des Lasers auf ein sehr kleines Flüssigkeitsvolumen gerichtet ist. Dadurch wird die Hintergrundfluoreszenz minimiert. Das Signal wird meist mit Photomultipliern umgewandelt und verstärkt [40].

Ein weiteres Verfahren zur Auswertung kodierter Partikel sind bildgebende Verfahren. Durch die Kopplung eines Epi-Fluoreszenzmikroskops mit einer CCD-Kamera und Bilderkennungssoftware können graphisch kodierte Partikel dekodiert werden. Die Bilderkennungssoftware muss die Orientierung graphisch kodierter Partikel ebenso wie die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs auswerten können. Eine Schwierigkeit besteht darin, die Partikel auf einem flachen Substrat zu immobilisieren, um viele Partikel gleichzeitig im Fokus abzulichten. Gelingt dies nicht, so müssen mehrere Aufnahmen in unterschiedlichen Ebenen gemacht werden, was die Auswertung zusätzlich verkompliziert [38].

2.3 Das Biobarcode-Verfahren für den parallelen Nachweis von Proteinen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des Biobarcode-Verfahrens mit im Hause hergestellten magnetischen Mikropartikeln anstelle kommerzieller magnetischer Partikel zum Nachweis des Proteins PSA. Das Biobarcode-Verfahren ist ein von Chad Mirkin im Jahre 2006 patentiertes Verfahren zum parallelen Nachweis von Biomolekülen [58]. Das Verfahren kann sowohl zur quantitativen Analyse von Nukleinsäuren als auch von Proteinen eingesetzt werden [59].

2.3.1 Prinzip des Verfahrens

Das Biobarcode-Verfahren basiert auf der Interaktion von magnetischen Mikropartikeln mit Goldnanopartikeln, wobei die Interaktion nur dann zu Stande kommt, wenn das Zielmolekül in der Probe vorliegt. Das Zielmolekül stellt bei der Nachweisreaktion die Verbindung zwischen dem Magnetpartikel und dem Goldpartikel her. Die Goldnanopartikel werden zuvor mit sogenannter Barcode-DNA markiert, die als Reportermolekül agiert und in einem weiteren Schritt vervielfältigt und nachgewiesen wird. Die Sequenz der DNA gibt Aufschluss über die Identität des Zielmoleküls und die Menge der DNA gibt Aufschluss über dessen Konzentration. Mit diesem Verfahren können geringere Konzentrationen an Krankheitsmarkern als mit ELISA nachgewiesen werden und zudem ist das Verfahren parallelisierbar [60, 61]. Das Prinzip des Verfahrens ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

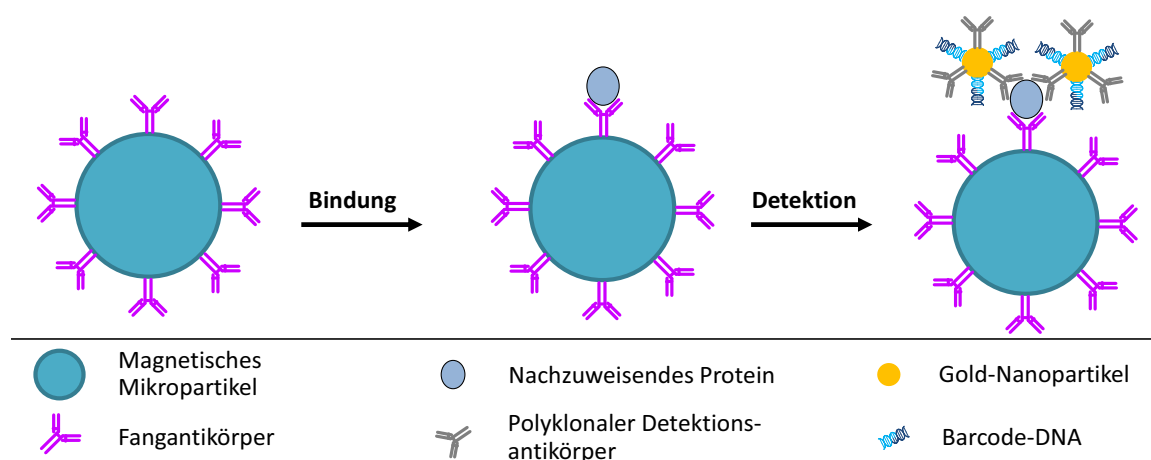


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Biobarcode-Verfahrens

Detaillierter beschrieben erfolgt im ersten Schritt die Inkubation der Probe mit magnetischen Mikropartikeln. Die Probe kann eine Blut- oder Serumprobe eines Patienten mit dem nachzuweisenden Krankheitsmarker oder auch ein Zelllysat sein. Im Falle eines Immunnachweises bindet der Krankheitsmarker spezifisch an auf dem Magnetpartikel immobilisierte Antikörper. Durch Magnetseparation werden alle nicht gebundenen Bestandteile der Probe abgetrennt. Zu dem Antigen-Mikropartikel-Komplex werden im nächsten Schritt mit Antikörpern und Barcode-DNA funktionalisierte Goldpartikel gegeben, die an das nachzuweisende Protein binden. Nach einer weiteren Inkubationsphase folgen einige Waschschrte mittels Magnetseparation. Nicht gebundene Goldpartikel werden so aus der Probe entfernt. Der resultierende Komplex aus Magnetpartikel, Krankheitsmarker und Goldpartikel wird durch Erhitzen denaturiert. Auf diese Weise geht ein Strang der Barcode-DNA in die Lösung über. Nach erneuter Magnetseparation kann die Barcode-DNA aus dem Überstand quantifiziert und identifiziert werden.

2.3.2 Nachweis der Barcode-DNA

Die Detektion des Zielmoleküls erfolgt indirekt durch den Nachweis der Barcode-DNA. Jedes Set an Goldpartikeln wird nur mit einer Art Detektionsantikörper und einer spezifischen Barcode-Sequenz versehen. Die Barcode-DNA wird entweder durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Silberverstärkung sichtbar gemacht.

2.3.2.1 Nachweis der Barcode-DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird die Barcode-DNA in mehreren Zyklen enzymatisch amplifiziert (kopiert) und entweder nachträglich in einem Gel nach der Größe aufgetrennt oder zeitgleich per Real Time PCR quantifiziert. Das bei dieser Reaktion verwendete Enzym ist eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase), die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen wird. Zwei zur Zielsequenz komplementäre Primer (kurze komplementäre DNA-Segmente) markieren die Startposition der Polymerase. Die Größe des zu amplifizierenden Segments entspricht der Länge der beiden Primer und der Länge der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. In jedem Zyklus wird die doppelsträngige DNA zunächst getrennt (Denaturierung). Danach binden die

beiden Primer jeweils an einen Einzelstrang der DNA (Hybridisierung) und die Polymerase vervollständigt in einem dritten Schritt (Elongation) den einzelsträngigen Teil der DNA-Sequenz mit ihr zur Verfügung stehenden Nukleotiden zu einem Doppelstrang. Die Anzahl der DNA-Segmente wird in jedem Zyklus verdoppelt. Ausgehend von 10 DNA-Segmenten kann daher nach 25 Zyklen eine Vervielfältigung der DNA um den Faktor 10^8 erfolgen. Die Vervielfältigung der Barcode-DNA ermöglicht einerseits die Identifikation des Krankheitsmarkers in einem Multiplex-System, andererseits dient dieser Schritt der Signalverstärkung, wodurch die Nachweisgrenze für das Antigen theoretisch bis in den attomolaren Bereich reicht [60].

Nach der PCR wird die amplifizierte DNA auf ein Gel aufgetragen. Durch Elektrophorese werden die DNA-Stränge in dem Polymergel der Größe nach aufgetrennt und durch einen Farbstoff sichtbar gemacht. Die DNA-Banden auf dem Gel können dann qualitativ ausgewertet werden. Die Auswertung der DNA mittels eines Agarose- oder Acrylamidgels kann höchstens als semi-quantitativ bezeichnet werden. Ein Vergleich der Intensität der Banden gibt Auskunft darüber, ob in einer Probe mehr oder weniger Ausgangs-DNA vorhanden war als in einer anderen. Die DNA-Sequenzen können zudem durch ihre Größe unterschieden werden, dies jedoch nur, wenn die Längen der DNA-Segmente sich signifikant unterscheiden. Nur eine sehr geringe Anzahl von Krankheitsmarkern könnte so parallel nachgewiesen werden, da die Auflösung der DNA-Segmente auf einem Gel nur in begrenztem Umfang möglich ist.

Für den Nachweis der Barcode-DNA im Biobarcode-Verfahren mittels PCR muss zunächst ein DNA-Strang der an den Goldpartikeln immobilisierten doppelsträngigen Barcode-DNA durch Erhitzen oder andere Methoden denaturiert werden. Ein Strang geht hierdurch in Lösung und kann dann per PCR amplifiziert werden (siehe Abbildung 3). Die Zielsequenz wird nur amplifiziert, wenn die für sie komplementären Primer zugegeben werden. Im Falle der Biobarcode-Methode könnte die DNA des Überstands in Aliquots aufgeteilt werden und jedem Aliquot wird nur ein spezifisches Primerpaar bei der PCR zur Verfügung gestellt. So kann festgestellt werden, welche DNA-Sequenz im Überstand vorhanden war, bzw. ob verschiedene DNA-Sequenzen vorhanden waren. Soll die PCR

aber als quantitativer Nachweis dienen, so ist die Real-Time PCR die Methode der Wahl [58].

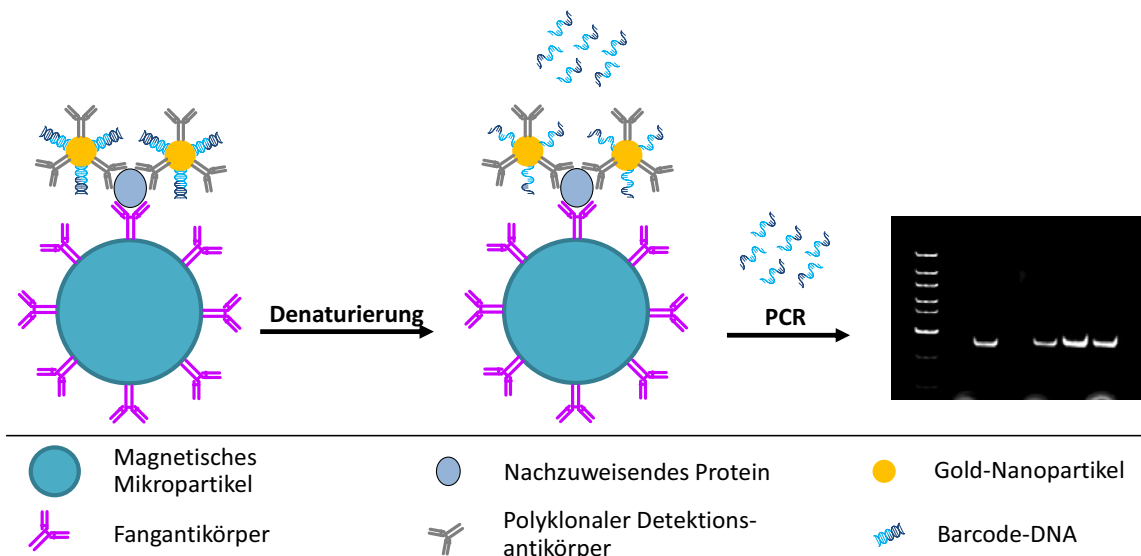


Abbildung 3: Detektion der Barcode-DNA mittels PCR

Bei der Real-Time PCR wird die Menge an PCR-Produkten während der Synthese mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen erfasst. Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs nimmt dabei proportional mit der Menge der DNA-Produkte zu, da der Farbstoff nur bei Einlagerung in einen DNA-Doppelstrang ein Signal abgibt und ermöglicht damit die zeitgleiche quantitative Auswertung der PCR. Das Ergebnis dieser Fluoreszenzmessungen wird in sogenannten Ct-Werten (engl.: cycle threshold) angegeben. Dieser Wert beschreibt den Amplifikationszyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übertrifft.

2.3.2.2 Nachweis der Barcode-DNA durch Silberverstärkung

Bei der Silberverstärkung kommt ein DNA-Array zum Einsatz, auf dem zur Barcode-DNA komplementäre kurze DNA-Sequenzen gitterförmig abgeschieden wurden. Die zu analysierende Barcode-DNA hybridisiert spezifisch an diese DNA-Sonden. In einem nächsten Schritt werden Goldpartikel zugegeben, die mit komplementären Sequenzen zum noch frei zugänglichen Segment der Barcode-DNA versehen sind (siehe Abbildung 4). Die nun an der Array-Oberfläche immobilisierten metallischen Nanopartikel zeigen eine

optische Reflexion und Absorption. Die Zugabe von Silberionen bewirkt zudem eine Verstärkung dieses (optischen) Signals [62].

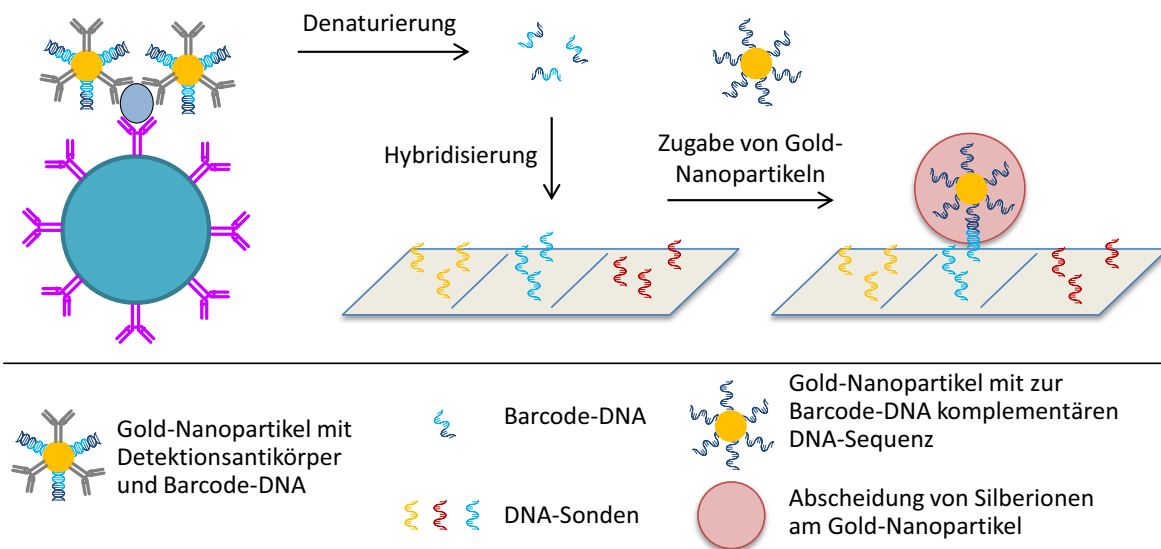


Abbildung 4: Nachweis von Barcode-DNA durch Silberverstärkung

Die Auswertung der Arrays erfolgt entweder optisch mit Hilfe eines einfachen Büroscanners oder elektrisch, da die Silberionen, die sich um die Goldpartikel lagern, zu Silber reduziert werden und eine leitfähige Schicht bilden. Ein angelegter Strom kann dann mit Hilfe von Mikroelektroden detektiert werden [63]. Sowohl die optische als auch die elektrische Detektion sind aber auch ohne die Silberverstärkung möglich [64, 65].

Da es sich bei dem Biobarcode-Verfahren um ein sehr empfindliches System handelt, können bereits geringste Mengen an Zielmolekülen nachgewiesen werden. Andererseits ist das System auch sehr störanfällig, das heißt, dass selbst geringste unspezifische Interaktionen zwischen den Magnet- und Goldpartikeln auch ohne Präsenz des Zielmoleküls zu einem fälschlicherweise positiven Testergebnis führen [66]. Ein Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten lag im Versuch der Überwindung dieser unspezifischen Bindungen zwischen den einzelnen Komponenten.

2.4 Kodierte Mikropartikel für den parallelen Nachweis von Proteinen

Der Nachweis der Barcode-DNA mit dem Biobarcode-Verfahren ist sowohl zeit- als auch arbeitsintensiv. Nach der Immunreaktion muss die Barcode-DNA entweder per PCR und Gelelektrophorese oder mit dem Verfahren der Silberverstärkung nachgewiesen werden. Für die Silberverstärkung müssen zudem zweidimensionale Arrays mit komplementären DNA-Segmenten hergestellt werden. Eine alternative Technik zur Kodierung mittels DNA-Sequenzen ist, wie schon erwähnt, der Einsatz optisch kodierter Mikropartikel. Hierbei wird der nachgewiesene Krankheitsmarker durch den Farbkode des Mikropartikels selbst identifiziert und die Konzentration des Markers wird anhand eines weiteren Reportermoleküls gleichzeitig mit dem Farbkode ausgelesen. Bei diesem Verfahren werden magnetische Mikropartikel ($\varnothing = 1 \mu\text{m}$) mit einer Kombination aus zwei oder drei Fluoreszenzfarbstoffen und einem Antikörper als Sondenmolekül versehen. Biotinylierte Antikörper und biotinylierte Fluoreszenzfarbstoffe binden binnen weniger Minuten an Streptavidin-funktionalisierte Mikropartikel. Für die Kodierung werden einzelne Partikelsets mit einer Kombination aus unterschiedlich vielen Fluorophoren pro Mikropartikel versehen. Je mehr Fluorophore an einem Partikel gebunden sind, desto intensiver ist die Fluoreszenz des Partikels im Emissionswellenbereich dieses Farbstoffs (im Folgenden auch Fluoreszenzkanal genannt). Durch die Kombination mehrerer Intensitäten und Farbstoffe können viele optisch unterscheidbare Partikelsets hergestellt werden. Die folgende Abbildung illustriert die Kodierung von neun Partikelsets oder „Partikelpopulationen“ mit zwei Farben in jeweils drei Intensitätsniveaus ($n=3^2$).

Der Kode der Partikel könnte auch als Zahlenkode dargestellt werden. Wenn die Position der Ziffer die Farbe beschreibt und die Ziffer selbst die Intensität der Farbe, dann hätten die drei Populationen der ersten Reihe in Abbildung 5 die Codes „11“, „21“ und „31“. Hierbei entspricht die Ziffer „1“ der niedrigsten Intensität oder geringsten Anzahl an Fluorophoren pro Partikel, „2“ entspricht der mittleren Intensität und „3“ der höchsten Farbintensität. Die erste Position des Kodes entspricht dem grünen Farbstoff und die zweite Position dem gelben. Durch den Einsatz eines dritten Farbstoffs können dreistellige Kodes hergestellt werden, usw.

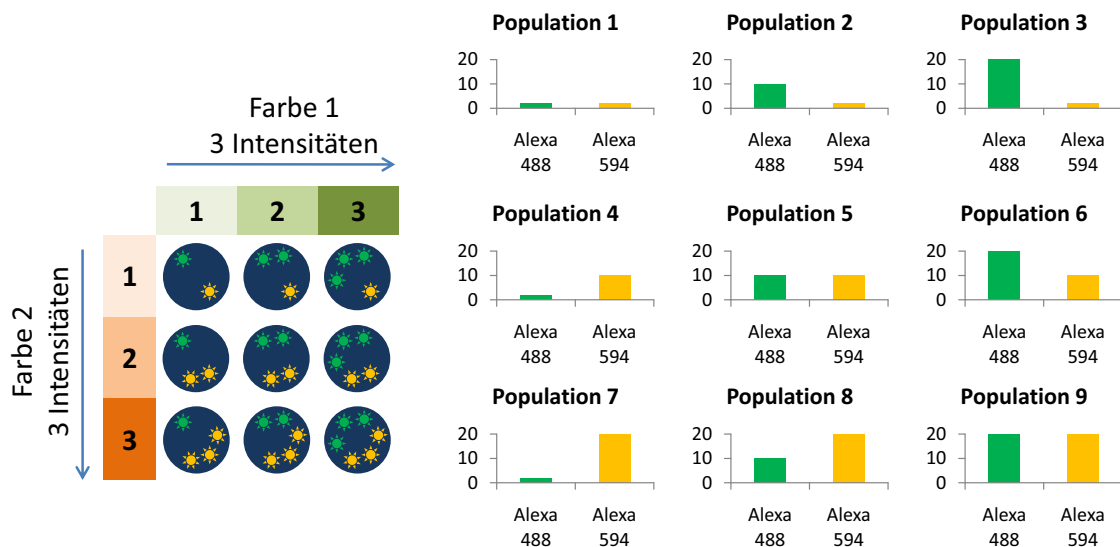


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kodierungsverfahrens mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und Alexa 594

Nach der Kodierung wird jedes Partikelset mit einem spezifischen Antikörper gegen einen Krankheitsmarker versehen. Die Partikel werden gemischt und können dann in einem Multiplex-Immunoassay eingesetzt werden (siehe Abbildung 6).

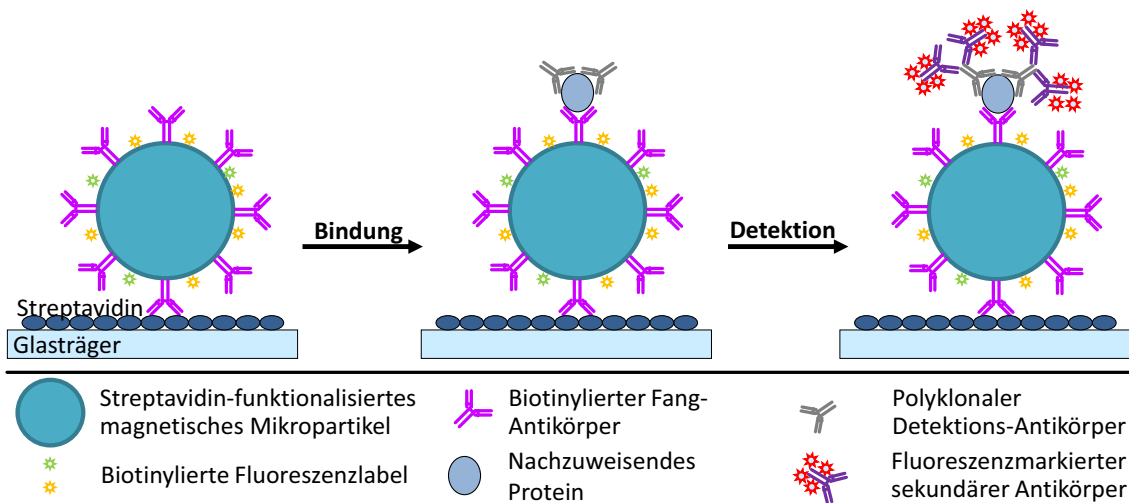


Abbildung 6: Prinzip des Immunnachweises mit kodierten Mikropartikeln

Die kodierten und mit biotinylierten Fangantikörpern versehenen Mikropartikel werden im ersten Schritt in einem Fluidkanal immobilisiert. Den Boden des Fluidkanals stellt ein dünnes Deckglas dar. Nach Zugabe der Zielproteine werden die Partikel gewaschen und es erfolgt die Zugabe eines polyklonalen Detektionsantikörpers. Die Partikel werden erneut gewaschen und im letzten Schritt wird ein fluoreszenzmarkierter (roter

Wellenlängenbereich) sekundärer Antikörper in den Fluidkanal geschleust, welcher an den polyklonalen Detektionsantikörper bindet.

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die für die Kodierung eingesetzt werden und der Fluoreszenzfarbstoff des Detektionsantikörpers emittieren nach Anregung mit Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen. Mit für die Fluoreszenzfarbstoffe passenden Filtersets können Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen werden, die die Intensität jeweils nur eines Farbstoffs reflektieren. Mit anderen Worten erhält man ein Bild, auf dem nur die Rotanteile der Partikel zu sehen sind. Dieses Bild gibt Aufschluss über die Menge an gebundenem fluoreszierendem Antikörper und damit über die Konzentration an eingesetztem Antigen. Das Bild, auf dem die Grünanteile zu sehen sind und das Bild, das die Gelbanteile anzeigt, werden zur Entschlüsselung des Kodes gebraucht.

Die Erweiterung des beschriebenen Verfahrens um weitere Farbstoffe und Intensitäten ermöglicht den parallelen Nachweis fast beliebig vieler Proteine auf geringstem Platz. Sollen beispielsweise zehn Krankheitsmarker in 10-facher Ausführung nachgewiesen werden, so würden dafür 100 Partikel benötigt, je 10 eines Farbkodes. Jedes 1 μm Partikel wird mit einem der zehn verschiedenen Fang-Antikörper versehen. Die Mikropartikel können dann auf einem Array immobilisiert werden und haben auf einer Fläche von etwa 30 μm x 30 μm Platz. Auf 900 μm^2 können mit diesem Verfahren also zehn Krankheitsmarker parallel nachgewiesen werden. Auf einer Fläche von einem Quadratmeter könnten damit theoretisch mehr als eine Million Krankheitsmarker in jeweils 10-facher Ausführung (10 Partikel mit gleicher Kodierung und gleichem Fangantikörper) untersucht werden.

3 Experimenteller Teil

3.1 Teil I: Das Biobarcode-Verfahren

3.1.1 Herstellung von magnetischen Mikro- und Gold-Nanopartikeln

Sowohl magnetische Mikropartikel (MP) mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen als auch Gold-Nanopartikel (Au-NP) wurden synthetisiert und charakterisiert. Die magnetischen Partikel wurden zudem mit kommerziellen Partikeln bezüglich ihrer Antikörper-Bindekapazität verglichen.

3.1.1.1 Synthese und chemische Aktivierung magnetischer Mikropartikel

Die im Zuge der Arbeit synthetisierten Mikropartikel bestehen aus Polyvinylacetat (PVAc) und enthalten magnetische Einschlüsse. Sie werden aus dem Monomer Vinylacetat und dem Vernetzer Divinylbenzol nach der Methode von Bozhinova, *et al.*, 2004 und Liu, *et al.*, 2005 hergestellt. Den magnetischen Anteil stellen mit Ölsäure ummantelte Magnetit-Nanopartikel (Fe_3O_4) dar [67, 68].

Diese Magnetit-Nanopartikel werden durch eine Fällungsreaktion aus Eisen(III)-Chlorid, Eisen(II)-Chlorid Tetrahydrat und einer Base gebildet. Hierzu werden in einem Reaktor 17,2 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ($M = 200,83 \text{ g/mol}$) und 28,2 g FeCl_3 ($M = 162,21 \text{ g/mol}$) in 500 mL Wasser unter Rühren gelöst und 10 min bei RT weiter gerührt. Anschließend wird durch einen Cellulosenitratfilter ($\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$) die Flüssigkeit abgetrennt und das Filtrat in ein 800 mL Becherglas überführt. Unter Rühren (Stabrührer, 800 U/min) werden 54 mL 25%ige Ammoniaklösung schnell hinzu gegeben. Hierdurch fällt Magnetit aus, was auch am Farbumschlag von Orange zu Schwarz zu beobachten ist. Zur entstehenden Suspension werden unter Rühren über einen Zeitraum von 10 min tropfenweise 30 mL Ölsäure gegeben. Ein Teil der Säure wird durch den vorhandenen Ammoniak deprotoniert und lagert sich als primäre Tensidschicht über ionische Wechselwirkungen an die Magnetitkerne an. Die zweite (protonierte) Ölsäureschicht lagert sich über physikalische Adsorption an die hydrophoben Moleküle der ersten Ölsäureschicht. Das ummantelte Magnetit verbindet sich nach weiterem Rühren zu einer pastösen Masse, dem Magnetitgel, welches magnetisch separiert wird. Die Ölsäure-Ummantelung

ermöglicht die Dispersion des Magnetits in der organischen Phase, die das Ausgangsmaterial für die Herstellung der Mikropartikel durch Suspensionspolymerisation bildet (20 g Magnetitgel in 70 mL Hexan gelöst, 95 mL Vinylacetat, 10 mL Divinylbenzol). Die für die Suspension benötigte wässrige Phase besteht aus 1 L H₂O*, in dem 25 g Polyvinylalkohol (PVA), 25 g Natriumchlorid (NaCl) und 1 mL Methylenblau (0,05 g/L) gelöst sind. Die wässrige Phase wird bei 70°C in einem Reaktor unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt. NaCl dient dabei der Stabilisierung von Mizellen, PVA der Mizellbildung und Phasentrennung und Methylenblau bildet einen Radikalfänger, der in der Wasserphase befindliche Nebenradikale fängt. Die organische Phase wird unter Rühren (800 U/min) der wässrigen Phase zugeführt und die Emulsion wird erhitzt bis sie 85°C erreicht. Nun werden 2 g Benzoylperoxid (Radikalstarter) hinzu gegeben, wodurch die radikalische Polymerisation des Vinylacetats in den Mizellen initiiert wird.

Sowohl Monomer als auch Magnetit befinden sich zunächst in der organischen Phase, während in der wässrigen Phase Mizellen des eingesetzten Tensids (Polyvinylalkohol) vorliegen. Die organische Phase wird durch das Rühren in der wässrigen Phase emulgiert, wobei die Monomere und das Magnetit nach und nach in die Mizellen wandern, die hierdurch auf Mikrometergröße anwachsen. Ein wasserlöslicher Radikalstarter reagiert mit den Monomeren, die sich in der Wasserphase befinden, wodurch Monomerradikale entstehen. Diese dringen in die Mikromizellen ein und starten dort die radikalische Suspensions-Polymerisation. Die Vinylacetatmoleküle beginnen zu polymerisieren und werden mit Divinylbenzen quervernetzt (siehe Abbildung 7). Da die Ölsäure-Schicht des Magnetits ungeladen ist, kann das Magnetit ebenso in die Mizellen eindiffundieren. Die Monomertröpfchen mit den eingelagerten Magnetitkernen erhärten und es entstehen magnetische Mikrosorbentien auf Polymerbasis. Nach vier Stunden Reaktionszeit wird der Reaktor von der Heizplatte genommen und auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Die Partikel werden durch Magnetseparation mehrmals mit H₂O gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

* In dieser Arbeit verwendetes Wasser hatte einen Widerstandswert von 18,2 MΩ.

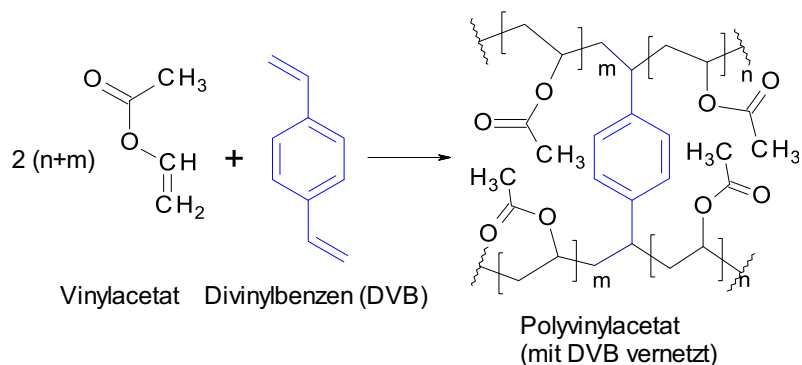
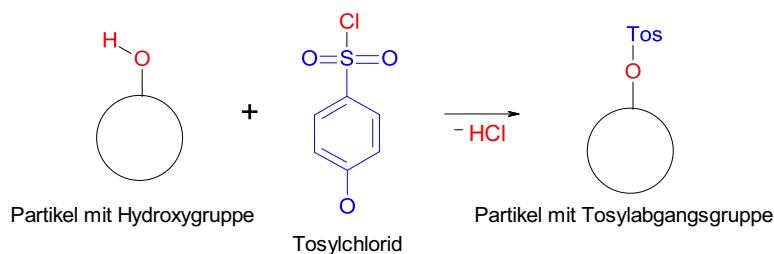


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der Polymerisation von PVAc-Partikeln

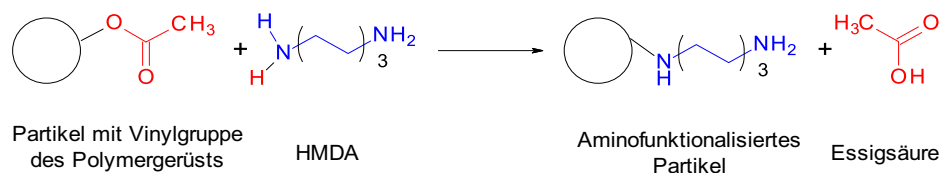
Um Antikörper an PVAc-Partikel zu koppeln, müssen die Partikel zunächst aktiviert werden. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung mit Tosylchlorid (4-Toluolsulfonsäurechlorid). Die Tosylgruppe ist eine gute Abgangsgruppe, die beispielsweise mit Amin- oder Thiolgruppen reagiert. Zunächst erfolgt die Hydrolyse der Acetatreste an der Partikeloberfläche mit Natronlauge (NaOH) zu Hydroxylgruppen. Die Veresterung der Alkoholreste erfolgt dann durch Zugabe von Tosylchlorid. Die Reaktion wird basisch katalysiert.



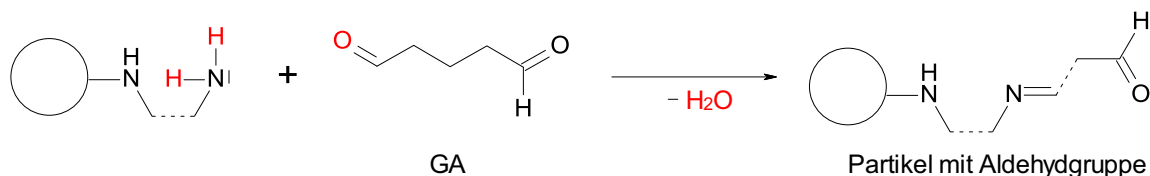
In einem 250 ml Rundkolben werden 250 mg Polyvinylalkohol-Partikel (PVA) und 0,06 mol (5,49 mL) Piperidin in 60 mL tert-Butylmethylether suspendiert und auf 0°C abgekühlt. Anschließend werden portionsweise 0,06 mol (11,44 g) Tosylchlorid unter Rühren zugesetzt, ein Trockenrohr aufgesetzt und die Suspension wird 1 h bei 0°C und weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Funktionalisierung der PVAc-Partikel mit Aldehydgruppen, welche mit Aminogruppen des Antikörpers reagieren. Um Aldehydgruppen zu erhalten, müssen die Partikel zunächst mit Hexamethyldiamin (HMDA) umgesetzt werden, welches mit dem Polymergerüst reagiert. Die gewünschte Menge Partikel wird zunächst

mit H₂O gewaschen und anschließend mit 50%iger Hexamethyldiamin-Lösung (w/v) versetzt. Pro g Partikel werden 70 mmol HMDA verwendet. Dann wird der Ansatz für 2 h bei 60°C unter Rotation inkubiert. Die nun aminofunktionalisierten Partikel werden mit einem Magneten separiert und mehrfach mit Wasser gewaschen.



In einem weiteren Schritt werden die Aminogruppen mit Glutardialdehyd (GA) weiter reagiert, so dass nun Aldehydgruppen als funktionelle Gruppen an der Partikeloberfläche zur Verfügung stehen [23]. Wieder werden pro g Partikel 70 mmol GA eingesetzt. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur unter Rotation über Nacht [67, 68]. Die Partikel werden daraufhin wieder magnetisch separiert, mehrere Male mit H₂O gewaschen und bis zur nächsten Verwendung bei 4°C gelagert.



3.1.1.2 Funktionalisierung von Magnetpartikeln mit Antikörpern

Neben den selbst synthetisierten Magnetpartikeln wurden zu Vergleichszwecken in den Untersuchungen auch kommerzielle Magnetpartikel eingesetzt. Hierbei handelte es sich um tosylaktivierte Partikel der Firma Life Technologie, USA (Dynabeads MyOne Tosylactivated, Kat. Nr. 655.01), sowie um aldehyd- (M-PVA Ak12, Kat. Nr. 222), amin- (M-PVA N12, Kat. Nr. 210), isocyanat- (M-PVA Ak21, Kat.Nr. 224) und *N*-hydroxysuccinimid-funktionalisierte (M-PVA Ak12, Kat. Nr. 222) Magnetpartikel der Firma *chemagen Biopolymer-Technologie AG*, Deutschland.

Die Kopplung der Antikörper erfolgt entweder über Aldehydgruppen des Partikels mit Aminogruppen des Antikörpers unter Ausbildung von Imidbindungen (siehe Abbildung 8) oder über Tosylgruppen (siehe Abbildung 9).

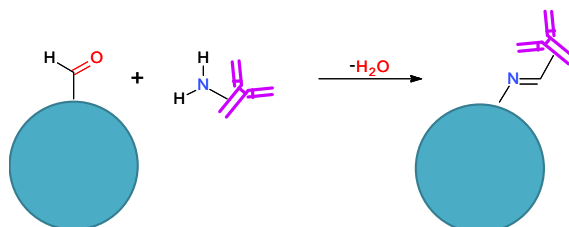


Abbildung 8: Kopplung von Antikörpern an aldehydfunktionalisierte Magnetpartikel

Mit Tosylchlorid aktivierte Partikel reagieren ebenso wie Aldehydgruppen mit Aminogruppen des Antikörpers, allerdings unter Ausbildung von stabileren Amidbindungen.

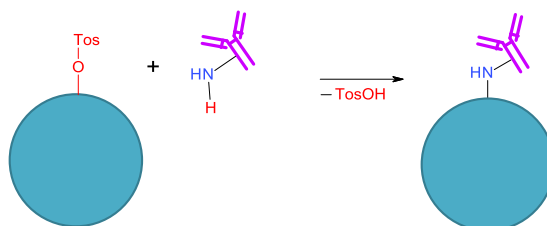


Abbildung 9: Kopplung von Antikörpern an tosylfunktionalisierte Magnetpartikel

Die genauen Kopplungsbedingungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle Reaktionen erfolgen bei Raumtemperatur, außer anderweitig angegeben, Waschschrte erfolgen durch Separation der Magnetpartikel mit einem Handmagneten von der Lösung. Die Partikel werden vor Gebrauch nach Herstellerangaben gewaschen und der Antikörper wird mit Ausnahme für die Bindung an tosylfunktionalisierte Partikel auf 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im jeweiligen Bindepuffer verdünnt. Bei den Kopplungsreaktionen wird der Antikörper im Überschuss (jeweils 25 μg Antikörper pro mg Partikel) eingesetzt, das Kopplungsvolumen beträgt demnach 100 μL für die Funktionalisierung von 1 mg Partikel. Laut Herstellerangaben liegt die Antikörper-Bindungskapazität bei maximal 15 μg Antikörper pro mg Partikel. Nach erfolgter Kopplung und Magnetseparation werden die Überstände für weitere Messungen aufbewahrt. Wasch- und Blockschrte werden mit jeweils 200 μL Lösung durchgeführt, Inkubationsschrte erfolgen unter Rotation, um ein Sedimentieren

der Partikel zu vermeiden. Alle Partikel mit Ausnahme der tosylaktivierten Partikel werden nach erfolgter Kopplung vier Mal mit Waschpuffer (10 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% w/v BSA; 0,1% w/v NaN₃, pH 7,5) gewaschen und im gleichen Puffer bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Tabelle 1: Kopplung von Antikörpern an Magnetpartikel

Partikel	Vorbereitung	Kopplung	Blocken
M-PVA N12 (M-PVA-NH ₂)	1 mg Partikel 2 x in Bindepuffer (0,01M Pyridin, pH 6) waschen 2x: 40 µL 5% Glutardialdehyd in Bindepuffer dazu geben und 1,5 h unter Rotation inkubieren 4x mit Bindepuffer waschen	25 µg Antikörper in 100 µL Bindepuffer zugeben 20 h unter Rotation inkubieren 2x mit Bindepuffer waschen	200 µL Blocklösung zugeben (1 M Glyzin, pH 8) 1 h unter Rotation inkubieren
M-PVA A01 (M-PVA-CHO)	1 mg Partikel 2x in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 – 7 waschen (Bindepuffer)	25 µg Antikörper in 100 µL Bindepuffer zugeben 12 h unter Rotation inkubieren 2x mit Bindepuffer waschen	200 µL 0,05 M Tris mit 0,1% Ethanolamin oder Glyzin, pH 7,5 zugeben 1 h unter Rotation inkubieren
M-PVA Ak12 (M-PVA-NHS)	1 mg Partikel 2x in kaltem 0,05 M MES-Puffer pH 5,5 waschen mit kaltem 0,05 M MES-Puffer pH 7 (Bindepuffer) waschen	25 µg Antikörper in 100 µL Bindepuffer zugeben 2 h unter Rotation inkubieren 2x mit Bindepuffer waschen	200 µL 0,05 M Tris mit 0,1% Ethanolamin oder Glyzin, pH 8 zugeben 1 h unter Rotation inkubieren
M-PVA Ak21 (M-PVA-NCO)	1 mg Partikel 2x in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 – 9 (Bindepuffer) waschen	25 µg Antikörper in 100 µL Bindepuffer zugeben 1 h unter Rotation inkubieren	-/-
Hauseigene und kommerzielle Tosyl-aktivierte Partikel	1 mg Partikel 2x in 0,1 M Natrium-Boratpuffer, pH 9,5 waschen (Bindepuffer)	40 µg Antikörper in 25 µL Bindepuffer mit 1 M Ammoniumsulfat zugeben 16 h unter Rotation bei 37°C inkubieren 1x waschen mit 200 µL PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween20, pH 7,4	200 µL PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween20, pH 7,4 zugeben und bei 37°C 2 h unter Rotation inkubieren
Hauseigene PVAc-NH ₂		Siehe M-PVA A01	

Die Berechnung der Bindungseffizienz erfolgt durch photometrische Bestimmung der Absorption der eingesetzten Antikörper-Lösung und des Überstandes nach Bindung bei 280 nm (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Tabelle 2: Liste der im Biobarcode-Verfahren verwendeten Proteine und Antikörper

Protein	Kat. Nr., Hersteller	Bemerkung
PSA10 (Monoklonaler PSA-Antikörper)	304-01, Fujirebio Diagn., Inc., Schweden	Laut Hersteller eignet sich dieser Antikörper in Kombination mit PSA66 zur Detektion von „Total PSA“
PSA66 (Monoklonaler PSA-Antikörper)	310-01, Fujirebio Diagn., Inc., Schweden	Laut Hersteller eignet sich dieser Antikörper in Kombination mit PSA10 zur Detektion von „Total PSA“
PSA66 Biotin (Monoklonaler PSA-Antikörper, biotinyliert)	Senova GmbH	Kostenlos zur Verfügung gestellte Probe, Konzentration*, Reinheit und weitere Inhaltsstoffe unbekannt
PSA (Antigen)	Senova GmbH	Kostenlos zur Verfügung gestellte Probe, Konzentration*, Reinheit, Form und weitere Inhaltsstoffe unbekannt
PSA (Antigen)	P3235, Sigma-Aldrich	Nicht komplexierte Form
Anti-KLK3 (Polyklonaler PSA-Antikörper)	AF1344, R&D Systems	Wurde von Stoeva <i>et al.</i> [69] in mehreren Publikationen in Kombination mit ab403 und P3235 genutzt
PSA1 (Monoklonaler PSA-Antikörper)	ab403, Abcam	Wurde von Stoeva <i>et al.</i> [69] in mehreren Publikationen in Kombination mit AF1344 und P3235 genutzt

*Gesamtproteinkonzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Diese Methode unterscheidet nicht zwischen Fremdproteinen (z.B. stabilisierendem BSA) und gewünschtem Protein (Antikörper oder Antigen).

3.1.1.3 Synthese von Goldnanopartikeln

Sphärische Au-NP werden nach der Methode von Turkevich *et al.* [70] hergestellt. Hierbei werden 5 µmol Hydrogentetrachloridoaurat(III) (HAuCl₄) in 19 mL H₂O gelöst und auf 100°C erhitzt. Unter Rühren wird 1 mL einer 0,5% Natriumcitrat-Lösung zugegeben und 30 min weiter gerührt. Die Farbe der Lösung verändert sich von gelb zu klar, dann über grau zu purpurn bis hin zu weinrot. Das Volumen wird danach mit H₂O wieder auf 20 mL eingestellt. Natriumcitrat wirkt hierbei als Reduktionsmittel. Überschüssige Citrat-Ionen werden an der Oberfläche der Nanopartikel adsorbiert. Durch die negative Oberfläche neigen die Partikel weniger zur Aggregatbildung. Die Größe der Nanopartikel lässt sich durch die Natriumcitrationen-Konzentration einstellen.

3.1.1.4 Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Au-NP werden nach Protokollen von Mirkin und Mitarbeitern [71] mit Antikörpern und Barcode-DNA funktionalisiert. Antikörper binden über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen ohne weitere chemische Modifikation an Goldnanopartikel. Um die ideale Beladung der Partikel mit Antikörpern zu ermitteln, werden zunächst Testreihen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Bei zu geringer Antikörper-Beladung wird die Oberflächenladung der Au-NP bei Zugabe von NaCl-Lösung soweit herab gesetzt, dass sich die Partikel stark annähern und daraufhin aggregieren. Dies ist durch einen Farbumschlag von rot oder rosa nach blau zu erkennen. Für jeden verwendeten Antikörper wird die nötige Mindestmenge an Antikörper durch eine Titrationsreihe bestimmt. Die Antikörperlösung wird zunächst durch Zugabe von 0,1 M Kaliumlauge auf pH 9,2 eingestellt. Zu je 1 mL Au-NP-Suspension werden zwischen 0 μg und 6 μg Antikörper gegeben. Die Lösung wird gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 μL 2 M NaCl. Die benötigte Mindestmenge an Antikörper entspricht der Antikörpermenge, bei der die Partikel gerade auf der Schwelle zwischen Aggregation (Lösung färbt sich blau) und Stabilisierung (Lösung bleibt rosa) stehen [72-74].

Neben den selbst hergestellten Au-NP werden auch kommerzielle 15 nm und 30 nm Goldpartikel (Kat. Nr. EM.GC15 und EM.GC30, British BioCell International, UK) verwendet. Selbst hergestellte Goldpartikel hatten einen Durchmesser von etwa 15 nm und wurden auf die gleiche Konzentration wie die kommerziellen 15 nm Partikel eingestellt und im Folgenden auch wie diese behandelt. Die Partikelkonzentration für die 15 nm Partikel ist höher als diejenige der 30 nm Partikel. Die Protokolle für die Funktionalisierung der Nanopartikel mit Barcode-DNA wurden diesen Umständen angepasst. Im Falle der 15 nm Au-NP werden 6 μg Antikörper (PSA66, Kat. Nr. 310-01, Fujirebio Diagnostics Inc., Schweden) pro mL Suspension ($1,4 \times 10^{12}$ Partikel / mL) verwendet, für die 30 nm Au-NP ($2,0 \times 10^{11}$ Partikel / mL) reichen 4 μg desselben Antikörpers aus. Die Suspension wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 Molekülen thiolmodifizierter Barcode-DNA pro Au-NP, das entspricht 230 pmol Barcode-DNA pro mL 15 nm Partikel und 30 pmol DNA pro mL 30 nm

Partikel. Theoretisch können auf einem 15 nm Au-NP etwa 200 DNA-Moleküle und auf einem 30 nm Partikel etwa 900 Moleküle immobilisiert werden. Dies gilt jedoch nur für Au-NP, die nicht schon mit Antikörpern funktionalisiert wurden. Es ist davon auszugehen, dass die Oberfläche der Au-NP zum größten Teil mit Antikörpern bedeckt ist, da die Au-NP sonst aggregieren würden. Die verwendete Menge an Barcode-DNA sollte also einerseits ausreichend für die Beladung der Au-NP mit Barcode-DNA sein und andererseits auch gering genug, um unspezifische Bindungen der DNA an die Goldpartikel nicht zu fördern. Barcode-DNA, die unspezifisch am Goldpartikel bindet, könnte bei späteren Inkubationsschritten wieder gelöst werden, unspezifisch an die im Biobarcode-Verfahren eingesetzten Magnetpartikel binden und letztendlich zu einem falsch-positiven Versuchsergebnis führen. Die Lösung wird für 10 min bei 4°C inkubiert und daraufhin die gleiche Menge komplementärer Barcode-DNA zugegeben. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT werden 4 µL Tween20 zugefügt, die Lösung wird gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach erfolgt vier Mal alle 15 min die Zugabe von etwa 30 µL Phosphatpuffer (100 mM Phosphatpuffer: 0,562 g Na₂HPO₄; 0,125 g NaH₂PO₄; 50 ml H₂O; pH 7,0), um die Phosphatkonzentration auf etwa 10 mM einzustellen und sechs Mal die Zugabe von etwa 16 µL Salzpuffer (0,0562 g Na₂HPO₄, 0,0125 g NaH₂PO₄; 5,844 g NaCl; 50 ml H₂O; pH 7,0), um die Salzkonzentration auf etwa 150 mM einzustellen. Die Lösung wird dann bei RT über Nacht inkubiert. Danach werden die Partikel zwei Mal durch Zentrifugieren bei 10.000 g und 4°C für 15 min gewaschen, in 140 µL PBS mit 0,05% Tween20 suspendiert und bei 4°C gelagert.

Die in ersten Versuchen verwendete Barcode-DNA wurde der Publikation von Nam *et al.* entnommen [75]. Die Oligonukleotide wurden vom Institut für Toxikologie und Genetik (Karlsruher Institut für Technologie) zur Verfügung gestellt.

40 Basenpaar (bp) thiolmodifizierte Barcode-DNA (Hersteller: Eurofins MWG Operon):

5'CAACTTCATCCACGTTCAACGCTAGTGAACACAGTTGTCT-A₁₀-(CH₂)₃-SH 3'

In späteren Versuchen wurde eine längere Barcode-DNA verwendet (120 bp), da vermutet wurde, dass die 40 bp DNA in Unebenheiten des Polymernetzes der Magnetpartikel haften und dadurch nicht effizient ausgewaschen werden kann. Der

zweite Grund für die Wahl einer längeren Barcode-DNA ist die negative Ladung, die proportional zur Länge des Moleküls zunimmt. Der isoelektrische Punkt der meisten Antikörper liegt unter 7, das heißt, dass Antikörper bei einem pH-Wert über dem isoelektrischen Punkt eine negative Nettoladung besitzen. Ein längeres DNA-Molekül mit einer höheren Anzahl an negativen Ladungen erfährt eine stärkere elektrostatische Abstoßung gegenüber anderen negativ geladenen Molekülen, was zur Reduktion unspezifischer Bindungen im Biobarcode-Assay von Vorteil ist. Die Sequenz entstammt dem Gen für GFP (grün fluoreszierendes Protein) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die Sequenz wurde gewählt, da sie sich nicht im menschlichen Genom und folglich auch nicht in menschlichen Serumproben befindet. Eventuelle falsch-positive Ergebnisse auf Grund von Ähnlichkeiten der Barcode-DNA mit humaner DNA können dadurch ausgeschlossen werden.

120 bp thiolmodifizierte Barcode-DNA (Hersteller: biomers.net GmbH, Ulm):

5'GATGGCGATGTTAATGGGC AAAAATTCTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
GGAAACTTACCCTTAATTTTATTTGCACTACTGGGAAGCTACCTGTTCCATGGCCA-(A)₁₀-SH

3.1.2 Der Biobarcode-Assay

Pro Probe werden 0,2 mg mit Antikörpern funktionalisierte Magnetpartikel eingesetzt. Wenn differierende Mengen hiervon verwendet wurden, so ist dies im Ergebnisteil vermerkt. Die Magnetpartikel werden mit Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween20; 0,1% BSA; pH 7,4) gewaschen, der Überstand wird nach Magnetseparation verworfen und 100 µL der zu untersuchenden Probe mit oder ohne Zielprotein (Kontrolle) werden zugegeben. Die Suspension wird 30 min bei 37°C unter Rotation inkubiert. Danach werden die Partikel zwei Mal mittels Magnetseparation in 200 µL Waschpuffer gewaschen und in 50 µL Au-NP-Lösung mit Barcode-DNA und Detektionsantikörper suspendiert. Au-NP-Lösung: 5 µL Au-NP (siehe 3.1.1.4), 2,5 µL 5% w/v unspezifische DNA (Kat. Nr. D7656, Sigma-Aldrich), 42,5 µL PBS. Die unspezifische DNA dient der Reduktion unspezifischer Bindungen. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 37°C werden die Partikel sieben Mal mit Waschpuffer gewaschen. Hierbei wird die Suspension nach jedem Waschschrift in ein frisches Reaktionsgefäß umgefüllt, da bei Versuchen festgestellt

wurde, dass die Au-NP dazu tendieren, sich an der Gefäßwand festzusetzen, was in falsch-positiven PCR-Ergebnissen resultierte. Zum Schluss werden die Partikel in 50 μL H_2O aufgenommen und für 10 min auf 95°C erhitzt. Hierbei dehybridisiert die komplementäre Barcode-DNA und kann durch Magnetseparation aus dem Überstand abgenommen und entweder sofort mittels PCR (siehe 6) amplifiziert oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.2.1 Automatisierung des Biobarcode-Assays

Der „chemagic Prepito“ (siehe Abbildung 10) der Firma *chemagen Biopolymer-Technologie AG* ist ein Modul zur automatisierten Handhabung magnetischer Partikel.



Abbildung 10: Chemagic Prepito der Firma chemagen Biopolymer-Technologie AG, Außen- und Innenansicht. Rechtes Bild: Einwegehülsen für magnetisierbare Stäbe (1), Titerplatte für Pufferlösungen (2), Membranpumpen zur automatisierten Füllung der Titerplatte, parallel magnetisierbare Stäbe (unter 4)

Mit Hilfe eines beweglichen Arms können Partikel von einer Kavität in die nächste transportiert und dort wieder suspendiert werden. Der Transport wird durch von einem Elektromagneten magnetisierbare Metallstäbe realisiert. Über eine Schnittstelle kann der Programmablauf des Gerätes modifiziert werden. Die Bewegung der Metallstäbe (z-Richtung), der Zeitpunkt der Magnetisierung und Entmagnetisierung und die Rotationsgeschwindigkeit der Metallstäbe können damit an den jeweiligen Versuchsablauf angepasst werden. Die Proben befinden sich auf einer in der y-Richtung beweglichen Plattform. Das Gerät verfügt zusätzlich über Membranpumpen für die Zugabe von Puffer- oder Waschlösungen. Der für den Biobarcode-Assay entworfene Programmablauf umfasst die Antigen-Magnetpartikel-Bindung, die darauf folgenden

Waschschritte sowie die Au-NP-Kopplung, weitere Waschschritte und die Elution der Barcode-DNA. Auch Inkubationsschritte können mit Hilfe dieses Moduls durchgeführt werden, allerdings lediglich bei RT. Manuell werden nur noch die PCR und die nachfolgende Gelelektrophorese durchgeführt.

Um die Partikel von einer Kavität in die nächste zu transportieren, werden 12 parallele Metallstäbe magnetisiert und in die Kavitäten mit den magnetischen Partikeln abgesenkt. Die Partikel werden in Lösung von den Metallstäben angezogen (siehe Abbildung 11, Bild links).

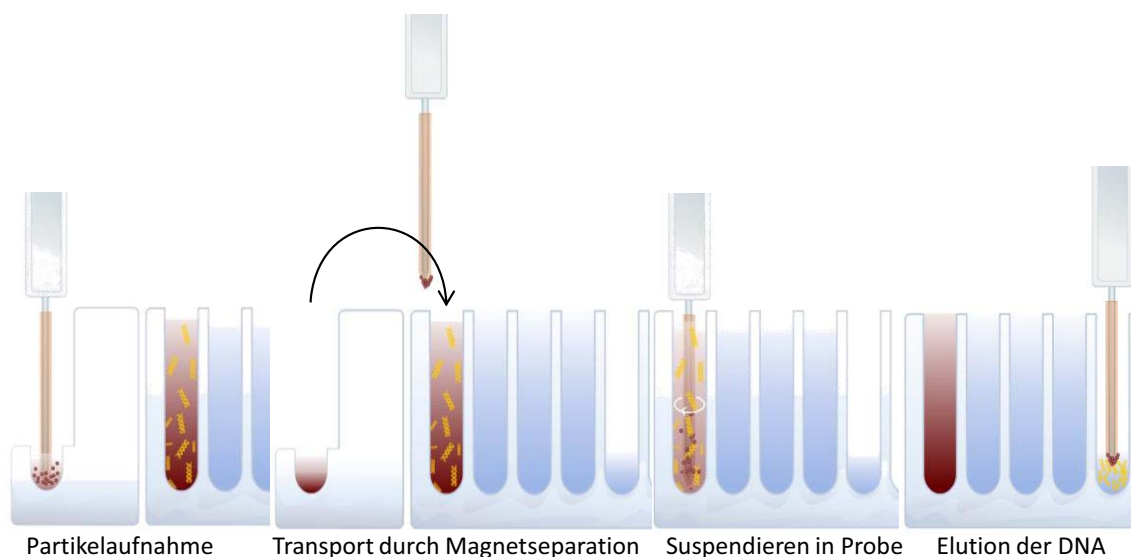


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des „chemagic Prepito“ [76]

Daraufhin werden die Stäbe angehoben, in die nächste Kavität gesteuert (zweites Bild von links) und das Magnetfeld abgeschaltet. Durch Rotation der Stäbe werden die magnetischen Partikel in der zu analysierenden Probe suspendiert (zweites Bild von rechts). Die Abbildung zeigt die Standardanwendung des „chemagic Prepito“ zur Separation und späteren Elution von DNA aus einer Probe. Auf die gleiche Weise erfolgen aber auch Waschschritte sowie die Inkubation mit Au-NP. Zur Denaturierung des Komplexes aus Magnet- und Goldpartikeln werden die Stäbe mit dem magnetisch separierten Komplex in eine Kavität mit 50 mM NaOH gefahren, das Magnetfeld wird abgeschaltet und die Partikel suspendiert. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper wird durch die harschen Bedingungen gelöst und die Goldpartikel mit der Barcode-DNA gehen in die basische Elutionslösung über. Zudem denaturiert bei diesem hohen pH-Wert

die Barcode-DNA und der nicht-thiolierter Strang geht in Lösung. Die Partikel werden magnetisch separiert und aus der Lösung entfernt. Alternativ werden die Magnetpartikel anstelle von in NaOH auch in reinem H₂O suspendiert, die Barcode-DNA durch Erhitzen denaturiert (10 min, 95°C) und die Magnetpartikel abgetrennt. Mit einem Aliquot der Barcode-DNA-Lösung wird dann die PCR durchgeführt. Um Kontaminationen zu verhindern, werden Einmalhülsen auf die Metallstäbe gesteckt, die am Ende des Programms oder auch zwischen verschiedenen Programmschritten abgeworfen und mit frischen Hülsen ersetzt werden können.

3.2 Teil II: Paralleler Proteinnachweis mittels kodierter Mikropartikel

3.2.1 Kodierung von Mikropartikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die externe Kodierung von Mikropartikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen werden mit Streptavidin funktionalisierte magnetische Polymerpartikel (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Kat. Nr. 650-01, Invitrogen Corp.) mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Alexa Fluor 488 Biotin, Kat. Nr. A-12924, und Alexa Fluor 594 Biotin, Kat. Nr. A-12922, Invitrogen Corp.) dotiert. Vier unterschiedliche Mengen des Farbstoffs Alexa Fluor 488 (9 pmol - 65 pmol / mg Partikel) werden verwendet, um vier Intensitätsniveaus im grünen Fluoreszenzbereich zu erhalten und fünf unterschiedliche Mengen des Farbstoffs Alexa Fluor 594 (7 pmol - 100 pmol / mg Partikel) werden verwendet, um fünf Intensitätsniveaus im gelben Fluoreszenzbereich zu erhalten. Die Kombinationen der Fluoreszenzfarbstoffe und der Intensitätsniveaus wird so gewählt, dass bis zu sieben verschiedene Partikelpopulationen unterschieden werden können. Beide Farbstoffe werden in 450 µL PBST (PBS, pH 7,4 mit 0,05% Tween20) verdünnt. Die Endkonzentration des Farbstoffs variiert zwischen 0,3 nM und 3 nM. Die Kopplung erfolgt durch die schrittweise Zugabe (10 Zugaben von 45 µL) des gelösten Farbstoffs zu der Mikropartikelsuspension (10 µg in 50 µL PBST). Nach Zugabe eines jeden Aliquots wird die Suspension gut gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung von Farbstoffen und Mikropartikeln zu erhalten. Eine gleichmäßige Verteilung der Farbstoffe auf die Bindungsstellen der Mikropartikel ist nötig, um eindeutig identifizierbare Partikelpopulationen zu erhalten. Nach der letzten Farbstoffzugabe werden die Partikel in Aluminiumfolie eingewickelt und weitere 15 min bei RT unter Rotation inkubiert. Die Mikropartikel werden anschließend magnetisch separiert, zwei Mal mit PBST gewaschen, in 200 µL PBST suspendiert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Durch Verwendung dreier Fluoreszenzfarbstoffe und dreier Intensitätsniveaus ($3^3 = 27$) ist es auch möglich, 27 verschiedene Partikelpopulationen zu erhalten. Hierzu wird neben den bereits erwähnten Farbstoffen auch der Fluoreszenzfarbstoff Atto 680-Biotin verwendet (Kat. Nr. 55819, Sigma-Aldrich Corp.). Die verschiedenen Partikelpopulationen werden pro mg Partikel mit jeweils 10, 30, oder 100 pmol eines jeden Fluorophors

versehen. Zunächst werden drei unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Farbstoffs Alexa Fluor 488 in PBST, jeweils mit einem Endvolumen von 600 μL , hergestellt. Jede Fluorophorlösung wird dann schrittweise zu einer Mikropartikelsuspension (30 μg in 150 μL PBST) gegeben und die Suspension wird gut gemischt. Hierdurch entstehen drei Partikelpopulationen, eine mit etwa 6.000 Fluorophoren pro Partikel, eine mit etwa 20.000 und eine mit etwa 60.000. Als nächstes werden drei Alexa Fluor 594 Lösungen in PBST hergestellt. Jede dieser Lösungen wird in drei Aliquots aufgeteilt und zu jeweils einem Drittel der schon mit dem ersten Fluorophor versehenen Partikelsuspension gegeben. Hierdurch entstehen neun verschieden kodierte Mikropartikelpopulationen zu je 10 μg Partikeln (zur Veranschaulichung siehe 2.4). Jede der neun Partikelpopulationen wird wieder in drei Aliquots aufgeteilt und es werden drei unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Fluorophors Atto 680 hergestellt. Zu je einem Drittel jeder Partikelpopulation wird nun eine der drei Fluorophorlösungen gegeben, wodurch 27 unterscheidbare Populationen entstehen. Die Partikel werden, wie schon zuvor beschrieben, gewaschen und aufbewahrt. Die Partikelpopulation mit der geringsten Anzahl an Fluorophoren ist mit etwa 18.000 Fluorophoren pro Partikel versehen, genauer mit 6.000 grün fluoreszierende Moleküle, 6.000 „gelben“ und 6.000 „roten“. Die Population mit der höchsten Anzahl an Fluorophoren hat 60.000 Moleküle eines jeden Farbstoffs pro Partikel gebunden.

3.2.2 Funktionalisierung der Mikropartikel mit Antikörpern

3.2.2.1 Biotinylierung von Antikörpern

Die kovalente Kopplung von Biotin an monoklonale Fangantikörper (mAk, Tabelle 3) erfolgt über einen mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktivierten Polyethylenglykol (PEG) – Linker. Dazu werden 1,35 μL einer 4,95 mM NHS-PEG₁₂-Biotin-Lösung (Kat. Nr. 21312, Pierce Biotechnology, Inc.) in trockenem N,N-Dimethylformamid mit 50 μL Antikörper-Lösung (1 mg/mL in PBS) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT werden nicht konjugierte Biotinmoleküle mit Hilfe einer Aufreinigungssäule nach Herstellerangaben (Kat. Nr. 89882, Pierce Biotechnology, Inc.) entfernt.

3.2.2.2 Kopplung biotinylierter Antikörper an Mikropartikel

Um biotinylierte Antikörper an kodierte Mikropartikel zu koppeln, wird die kodierte Mikropartikelsuspension (20 µg Partikel suspendiert in 380 µL PBST) in zehn Aliquots (je 38 µL) zu der Antikörperlösung (4 µg mAk in 20 µL PBST) gegeben. Bei der schrittweisen Zugabe der Antikörper entstehen weniger Partikelaggregate als bei Zugabe der gesamten Antikörperlösung in einem Schritt (siehe 4.2.3.2). Je kodierter Partikelpopulation wird dabei eine Art Antikörper verwendet. Nach jeder Zugabe wird die Suspension gut durchmischt. Nach Zugabe des letzten Aliquots wird das Reaktionsgefäß in Aluminiumfolie gewickelt und weitere 30 min bei RT unter Rotation inkubiert. Die Mikropartikel werden abschließend magnetisch separiert, vier Mal mit PBST gewaschen und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Die im zweiten Teil dieser Arbeit verwendeten Antigene und ihre entsprechenden Antikörperpaare sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Proteine und der dafür spezifischen Antikörperpaare

Antigen	Monoklonaler Fangantikörper	Polyklonaler Detektionsantikörper
Prostata-Spezifisches Antigen (PSA) Kat. Nr. 1344SE, R&D Systems, Inc.	mAk-PSA Kat. Nr. 304-01, Fujirebio Diagn., Inc.	pAk-PSA Kat. Nr. AF1344, R&D Systems, Inc.
cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) Kat. Nr. 2397-CR, R&D Systems, Inc.	mAk-CRISP3 Kat. Nr. MAB2397, R&D Systems, Inc.	pAk-CRISP3 Kat. Nr. AF2397, R&D Systems, Inc.
epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2) Kat. Nr. 1129ER, R&D Systems, Inc.	mAk-ErbB2 Kat. Nr. MAB1129, R&D Systems, Inc.	pAk-ErbB2 Kat. Nr. AF1129, R&D Systems, Inc.
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) Kat. Nr. 14-8329, eBioscience, Inc.	mAk-TNF-alpha (biotinyliert) Kat. Nr. 13-7349, eBioscience, Inc.	pAk-TNF-alpha Kat. Nr. Ab9635, Abcam Inc.
Interleukin 6 (IL-6) Kat. Nr. 206-IL, R&D Systems, Inc.	mAk-IL-6 Kat. Nr. MAB206, R&D Systems, Inc.	pAk-IL-6 Kat. Nr. AF206, R&D Systems, Inc.
Interleukin 8 (IL-8) Kat. Nr. 208-IL, R&D Systems, Inc.	mAk-IL-8 Kat. Nr. MAB208, R&D Systems, Inc.	pAk-IL-8 Kat. Nr. AF208, R&D Systems, Inc.

3.2.2.3 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Mikropartikel

Die kovalente Kopplung monoklonaler Fangantikörper an Magnetpartikel erfolgt durch EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid). Hierzu werden zunächst die Aminogruppen der mit Streptavidin funktionalisierten Magnetpartikel (50 μg) mit Bernsteinsäureanhydrid behandelt (400 μM in PBST, 10 min), was zur Ausbildung von Carboxylgruppen führt. In diesem Schritt sollten möglichst alle Aminogruppen zu Carboxylgruppen umgesetzt werden. Dies ist notwendig, um eine Quervernetzung der Partikel durch EDC zu verhindern. Mit EDC werden Aminogruppen mit Carboxylgruppen kovalent verbunden und, da beide Gruppen auf den mit Streptavidin funktionalisierten Partikeln vorkommen, sollte auf diese Weise die Aggregatbildung zumindest vermindert werden. Die Magnetpartikel werden dann in 50 mM MES-Puffer drei Mal gewaschen und mit EDC und Sulfo-NHS (je 200 mM in 50 mM MES-Puffer mit 0,05% Tween20 und 0,01% SDS) 15 min aktiviert. Nach erneutem Waschen in MES-Puffer werden die Partikel für 1 min im Ultraschallbad suspendiert und danach 10 μg Antikörper in PBST hinzugefügt. Die Partikel werden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gewaschen, mit 100 μL 100 mM Glyzin geblockt, um noch aktive NHS-Ester umzusetzen, drei Mal gewaschen und bei 4°C gelagert.

3.2.3 Die fluidische Analysezone

Sowohl für den Immunnachweis selbst als auch für die nachfolgenden Mikroskopieaufnahmen dient eine fluidische Kanalstruktur als Versuchsplattform.

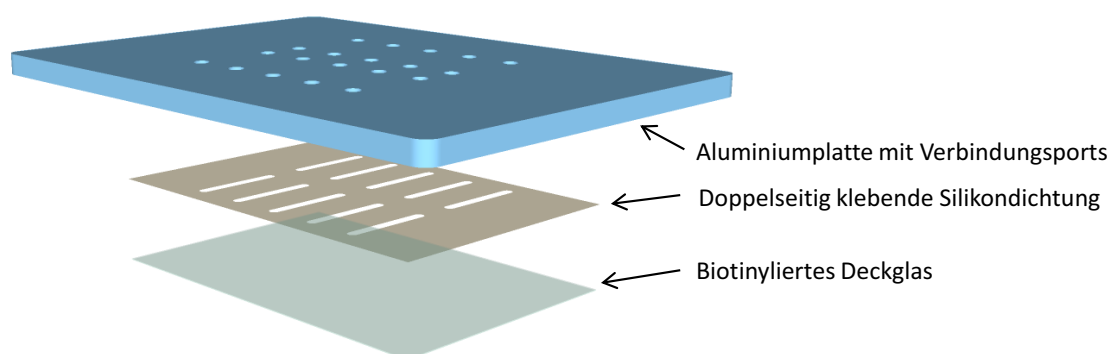


Abbildung 12: Einzelteildarstellung der fluidischen Analysezone

Diese Analysezelle besteht aus einer mit Siliziumdioxid beschichteten Aluminiumplatte mit Verbindungsports zum Anschluss von Schlauchverbindungen, einer doppelseitig klebenden Silikondichtung mit zehn Aussparungen, welche die Fluidkanäle darstellen, und einem funktionalisierten Glasträger als Boden (siehe Abbildung 12).

3.2.3.1 Automatisierte Handhabung der fluidischen Analysezelle

Alle Lösungen werden mit Hilfe einer computergesteuerten Spritzenpumpe (Cavro XR Rocket Pump, Tecan Group, Ltd) in die Kanäle injiziert. Hierbei wird die einfließende Lösung mittels eines Vakuums, das von der Spritzenpumpe erzeugt wird, direkt aus dem Lösungsreservoir in den Kanal gezogen. Die ausgehende Lösung wird mit dem gleichen Prinzip aus dem Kanal gezogen, passiert aber die Spritzenpumpe, bevor die Lösung dem Abfallbehälter zugeführt wird.

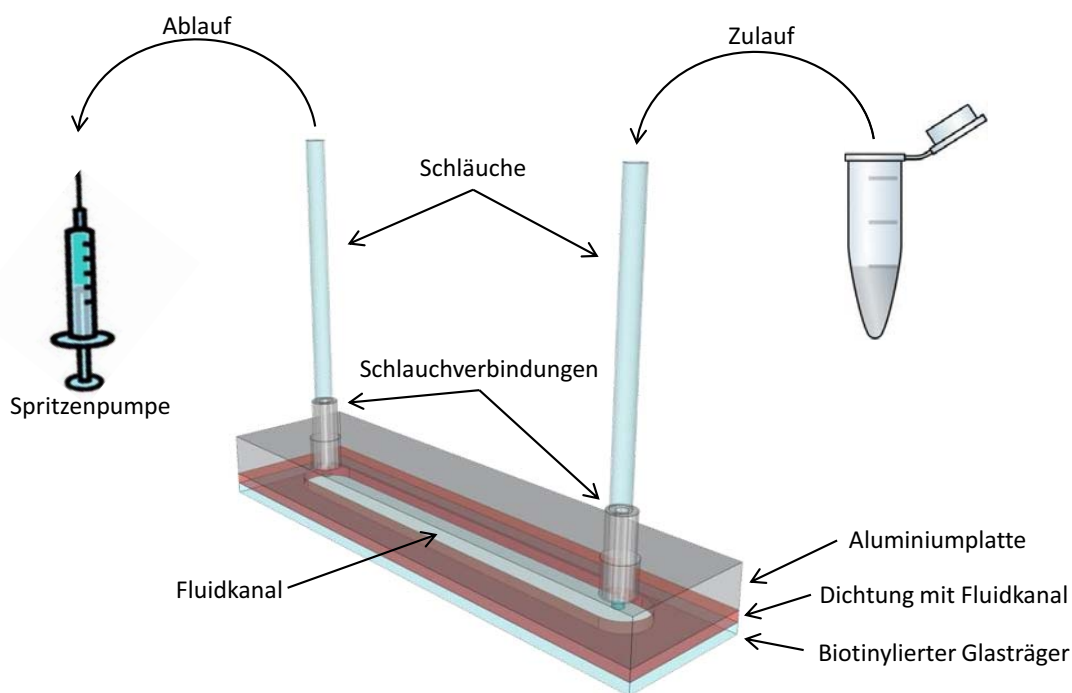


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Fluidkanals

Die Spritzenpumpe hat ein Totvolumen von einigen μL . Würde die eingehende Lösung zunächst in die Spritzenpumpe und dann durch Druck in die Kanäle gepumpt, könnten auf Grund dieses Totvolumens Kontaminationen der eingehenden Lösungen mit zuvor verwendeten Lösungen auftreten. Durch das umgekehrte Prinzip, bei dem die Lösungen mittels eines Vakuums durch die Kanäle transportiert werden, kann diese Art der

Kontamination vermieden werden. Zum besseren Verständnis ist das Prinzip der Fluidführung in Abbildung 13 dargestellt.

3.2.3.2 Herstellung biotinylierter Glasträger

Zur Herstellung der biotinylierten Glasträger werden 50 mm x 75 mm x 0,170 mm Borsilikat-Deckgläser (Erie Scientific) im Batchverfahren in einer 2% Micro-90 Lösung (Cole-Parmer) gewaschen und mit H₂O gespült. Danach werden sie für je 30 min in Aceton und Methanol in einem Ultraschallbad gereinigt und wieder mit H₂O gespült. Im nächsten Schritt werden die Glasträger in einer 1:1:5 Lösung aus 30% NH₄OH:30% H₂O₂:H₂O bei 85°C für 60 min inkubiert und erneut drei Mal mit H₂O gespült. Zum Schluss werden sie in einer 3:1 Lösung aus 98% H₂SO₄:30% H₂O₂ bei 85 °C 40 min lang gereinigt, zehn Mal mit H₂O gewaschen und für eine min in Methanol getaucht, um die spätere Trocknung zu beschleunigen. Die Glasträger werden dann bei 110°C 15 min lang getrocknet, auf RT abgekühlt und zur Aminosilanisierung 15 min in eine 2% Lösung aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (Gelest Inc.) in einer 95:5 Ethanol:H₂O Mischung getaucht, drei Mal mit Aceton gespült und 15 min bei 110°C ausgehärtet. Die aminosilanisierten Glasträger werden dann mit einer 1 mM NHS-PEG₄-Biotin-Lösung (Kat. Nr. 21363, Pierce Biotechnology, Inc.) in trockenem N,N-Dimethylformamid mit 1 mM Triethylamin biotinyliert. Hierzu werden auf einen Glasträger 300 µL der Lösung gegeben. Danach wird ein 22 mm x 22 mm Deckglas als Abstandshalter auf einer Seite des Glasträgers platziert, und die Lösung wird mit einem weiteren Glasträger bedeckt. Das Deckglas vereinfacht die Trennung der beiden Glasträger nach erfolgter Inkubation. Nach 60 min Inkubation werden die Glasträger mit Aceton gespült und 15 min in eine Lösung mit 1% NH₄OH und 0,1% SDS getaucht. Zum Schluss werden sie zehn Mal mit H₂O und zwei Mal mit Aceton gespült und in einem Vakuumexsikkator getrocknet und aufbewahrt [77].

3.2.3.3 Herstellung carboxylierter Glasträger

Die Glasträger werden, wie schon in 3.2.3.2 beschrieben, mit einer 2% Micro-90 Lösung gewaschen, mit H₂O gespült, in Aceton und Methanol in einem Ultraschallbad gereinigt und wieder mit H₂O gespült. Hiernach werden sie in einer Salpetersäurelösung (1:4 HNO₃ (68%):dH₂O) für 60 min inkubiert und erneut mit H₂O gespült und für eine min in

Methanol getaucht. Die Glasträger werden dann bei 110°C 15 min lang getrocknet, die Aminosilanisierung erfolgt wie bereits beschrieben. Die aminosilanisierten Glasträger werden in einer 250 mM Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid in trockenem N,N-Dimethylformamid mit 250 mM Triethylamin carboxyliert. Nach 120 min Inkubation werden die Glasträger mit Aceton und Methanol gespült und in einem Vakuumexsikkator getrocknet und aufbewahrt.

3.2.3.4 Herstellung der Kanalstruktur

Vor Gebrauch werden die Deckgläser mit einer doppelseitig klebenden Silikondichtung an einer speziell angefertigten Aluminiumplatte befestigt. Jede Silikondichtung (Nr. 702, Scapa Group) enthält zwölf Aussparungen, die die Fluidkanäle darstellen. Die Kanäle werden mit einem computergestützten Programm entworfen und mit einem Schneideplotter (CC200-20, Graphtec Corp.) aus der ca. 100 µm dicken Silikondichtung ausgeschnitten. Die Dimensionen der Kanäle betragen 15 mm in der Länge und 2 mm bis 5 mm in der Breite. Die Aluminiumplatte hat zwanzig Bossports, um jeden Fluidkanal mit 062 MINSTAC Anschlüssen (The Lee Co.) mit einer Spritzenpumpe zu verbinden.

3.2.3.5 Immobilisierung der Partikel im Fluidkanal

3.2.3.5.1 Immobilisierung der Partikel auf biotinylierten Glasträgern

Zur Immobilisierung der kodierten und mit biotinyliertem Antikörper funktionalisierten Mikropartikel auf den biotinylierten Glasträgern wird jeder Kanal zunächst 20 min mit einer Streptavidin-Lösung (1 mg/mL in PBS) inkubiert und danach mit Hilfe der computergesteuerten Spritzenpumpe mit 0,5 mL PBST gewaschen. In jeden Kanal werden 10 µL der mit Antikörpern gekoppelten Partikelsuspension (50 µg/mL in PBST) injiziert und ein Permanentmagnet wird kurz an der Unterseite des Glasträgers vorbei gezogen, um die Magnetpartikel mit dem Glasträger in Kontakt zu bringen und so die Immobilisierung der Partikel zu beschleunigen (siehe Abbildung 14). Das auf dem biotinylierten Glasträger gebundene Streptavidin stellt dabei das Bindeglied zwischen dem Glasträger und dem biotinylierten Antikörper dar. Streptavidin ist ein Tetramer und kann vier Biotinmoleküle binden. Nicht gebundene Mikropartikel werden mit PBST weggespült.

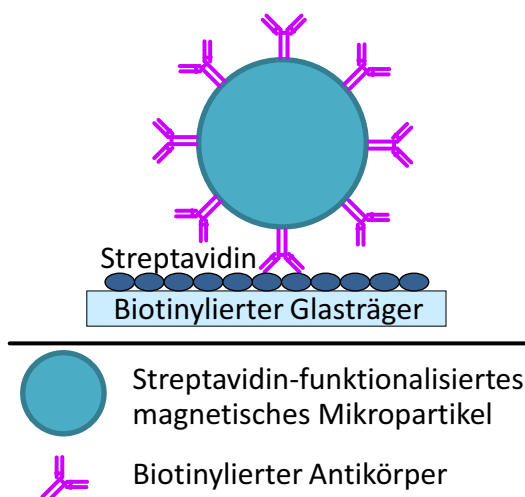


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Immobilisierung von mit biotinylierten Antikörpern funktionalisierten Magnetpartikeln auf einem biotinylierten Glasträger

3.2.3.5.2 Immobilisierung der Partikel auf carboxylierten Glasträgern

Die Immobilisierung der Mikropartikel auf carboxylierten Glasträgern erfolgt mit Hilfe des chemischen Crosslinkers EDC, welcher die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen den Carboxylgruppen des Glasträgers und Aminogruppen des Antikörpers in wässriger Lösung ermöglicht. Jeder Kanal wird mit 100 mM EDC und 10 mM Sulfo-NHS (Sulfo-N-Hydroxysuccinimid) in 50 mM MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, pH 5) aktiviert. Hierbei reagiert EDC mit den Carboxylgruppen des Glasträgers und formt ein instabiles Zwischenprodukt, das mit Sulfo-NHS zu einem etwas stabileren NHS-Ester weiter reagiert. Die Kanäle werden mit 50 mM MES-Puffer gewaschen und die Zugabe der Magnetpartikel und deren Immobilisierung erfolgt wie oben beschrieben.

3.2.4 Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Alle Fluoreszenzbilder werden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (AxioObserver.Z1, Carl Zeiss, Inc.) aufgenommen, das mit einem 20x/0,8 NA Objektiv ausgestattet ist. Als Lichtquelle dient eine 300 W Xenonbogenlampe (Lambda DG-5, Sutter Instrument Co.) in Verbindung mit zur Anregungs- und Emissionswellenlänge der Fluoreszenzfarbstoffe passenden Fluoreszenzfiltersätzen (FITC-3540B für Alexa 488, TXRED-4040B für Alexa 594, Cy5.5-A für Alexa 680, Semrock Inc.). Das Mikroskop ist zudem mit einem motorgesteuerten Objektisch mit Positionsmeldung (BioPrecision 2, Ludl Electronics Products, Ltd.) und einer EMCCD Kamera mit 1004 × 1002 aktiven Pixeln und einer

Pixelgröße von $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ (iXon+ 885, Andor Technology, PLC) ausgestattet. Ein Autofokussystem (Definite Focus System, Carl Zeiss, Inc.) erlaubt präzises, automatisiertes Fokussieren. Dieses System nutzt Licht, das von einer LED (835 nm) ausgesandt und auf dem Objektträger reflektiert wird, als Rückkopplungssignal zur Justierung der Fokusposition. Von jedem Sichtfeld werden drei Bilder aufgenommen, je eines pro Fluoreszenzbereich der drei Farbstoffe. Die Aufnahme der Bilder erfolgt automatisiert mit einer speziell dafür geschriebenen Software. Durch die Software wird neben der Position des Objektes und der Farbfiltersets auch die Lichtquelle gesteuert. Die Belichtungsdauer und die Belichtungsintensität können mit dem Programm festgelegt werden. Auf diese Weise kann das Ausmaß des Ausbleichens der Farbstoffe minimiert werden. Die Fluoreszenzintensitäten sind in jedem Bild in Form der Pixelwerte gespeichert. Je größer die Farbintensität, desto höher ist der entsprechende Pixelwert im Bild.

3.2.5 Dekodierung der Mikroartikel

Die automatisierte Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgt mit einem für das Java-basierte Programm ImageJ [78] entworfenen Makro. Mit dem Makro können die mittleren Pixelintensitäten jedes Mikropartikels im grünen, gelben und roten Emissionswellenlängenbereich ermittelt werden. Die Fluoreszenzintensitäten im grünen und gelben Bereich werden für die Dekodierung der Partikel eingesetzt, die des roten Bereichs reflektiert die Konzentration des Antigens.

Der erste Schritt zur Auswertung der Bilder besteht in einer Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle, die für die Partikelkodierung eingesetzt werden. Aus dem daraus resultierenden Bild wird mit Hilfe des Otsu Thresholding Filters [79] eine Maske erstellt. Die Maske wird später dazu benutzt, die Positionen der Partikel in jedem Sichtfeld zu finden. Partikeldoublets, Aggregate oder sonstige Artefakte werden an Hand einer Partikelgrößenanalyse lokalisiert und aus der Maske entfernt. Partikel mit deutlich niedrigerer Fluoreszenzintensität können mit dem Otsu Filter nicht lokalisiert werden. Um diese Partikel mit in die Maske einzubeziehen, wird zunächst eine Negativmaske erstellt, die allen Bereichen mit hohen Pixelwerten (große Fluoreszenzintensität) den Wert Null zuweist. Durch Multiplikation dieser Maske mit dem Originalbild werden daher alle

Bereiche großer Fluoreszenzintensität ausgelöscht. Wird nun der Otsu Filter ein weiteres Mal angewandt, können auch diese weniger hell erscheinenden Partikel lokalisiert und in die Partikelmaske integriert werden. Die Partikelmaske, die nun alle Partikelpositionen erhält, wird dazu benutzt, die Fluoreszenzintensitäten der Partikel in allen drei Bildern zu ermitteln. Jedem Partikel werden damit drei Koordinaten (x , y , z) zugewiesen. x beschreibt die Fluoreszenzintensität eines bestimmten Partikels im grünen Wellenlängenbereich, y im gelben Wellenlängenbereich und z im roten Wellenlängenbereich. x und y dienen der Identifizierung (Dekodierung) des Partikels, z dient der Quantifizierung des Zielproteins. Die weitere Datenverarbeitung erfolgt mit MATLAB (The MathWorks, Inc.).

3.2.6 Immunassays

3.2.6.1 Immunnachweis von sekundären Antikörpern als Modellantigene

Das Prinzip des partikelbasierten Immunassays wird an Hand des Nachweises eines biotinylierten Antikörpers (biotinylierter anti-Ziege Antikörper, Kat. Nr. A10518, Invitrogen Corp.) als „Antigen“ demonstriert (siehe Abbildung 15).

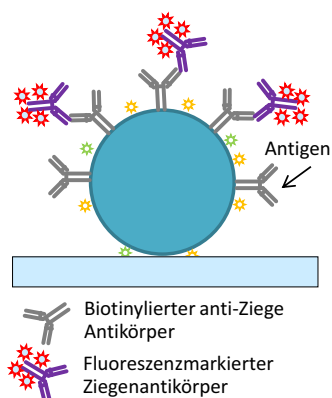


Abbildung 15: Detektion von biotinyliertem Anti-Ziege Antikörper als „Antigen“

Hierfür wird ein Aliquot einer kodierten und vom Hersteller mit Streptavidin funktionalisierten Partikelpopulation (10 μ L, 20 μ g/mL) direkt auf der biotinylierten Glasoberfläche immobilisiert. Die Streptavidinmoleküle auf den Magnetpartikeln binden hierbei an das Biotin, mit dem der Glasträger derivatisiert wurde, und verankern die Magnetpartikel auf dem Glasträger. Ein Permanentmagnet wird kurz an der Unterseite

des Glasträgers vorbei gezogen, um die Magnetpartikel mit dem Glasträger in Kontakt zu bringen und so die Immobilisierung der Partikel zu beschleunigen. Nicht gebundene Mikropartikel werden mit PBST weggespült.

Die Partikel werden für 1 h mit einer Blocklösung (6% (w/v) Rinderserumalbumin, 10% (v/v) Rinderserum, 1% Tween20 in PBS) behandelt und danach mit PBST gewaschen. Hiernach werden verschiedene Konzentrationen an „Antigen“ in der gleichen Blocklösung in die Flusszelle injiziert und nach einer Inkubationszeit von 30 min werden die Kanäle mit PBST gespült. Der Alexa Fluor 680-markierte polyklonale Detektionsantikörper (Ziege anti-Maus Kat. Nr. A-21057, Invitrogen Corp.) wird auf eine Konzentration von 2 µg/mL in Blocklösung verdünnt und in die Fluidkanäle injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT werden die Kanäle wieder mit PBST gespült und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Ein ähnliches Experiment wird auch mit konstanter biotinylierter Antikörperkonzentration (1 µg/mL) als Fangantikörper am Partikel und mit variierender Konzentration an Alexa Fluor 680 markiertem polyklonalem Antikörper (Fluoreszenzmarkiertes „Antigen“) durchgeführt (siehe Abbildung 16).

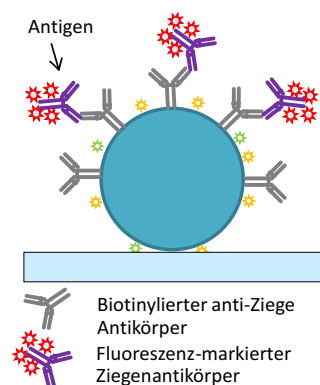


Abbildung 16: Detektion von Fluoreszenz-markiertem Ziegenantikörper als „Antigen“

3.2.6.2 Immunnachweis eines einzelnen Proteins

Die kodierten und mit Fangantikörpern funktionalisierten Mikropartikel (50 µg/mL) werden zunächst, wie schon in 3.2.3.5.1 beschrieben, auf der Glasoberfläche des Fluidkanals immobilisiert. Die Zielproteine werden in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween20

auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Danach werden je 10 μL der verdünnten Antigenlösung (nachzuweisendes Protein) in die Flusszellen injiziert (siehe Abbildung 17).

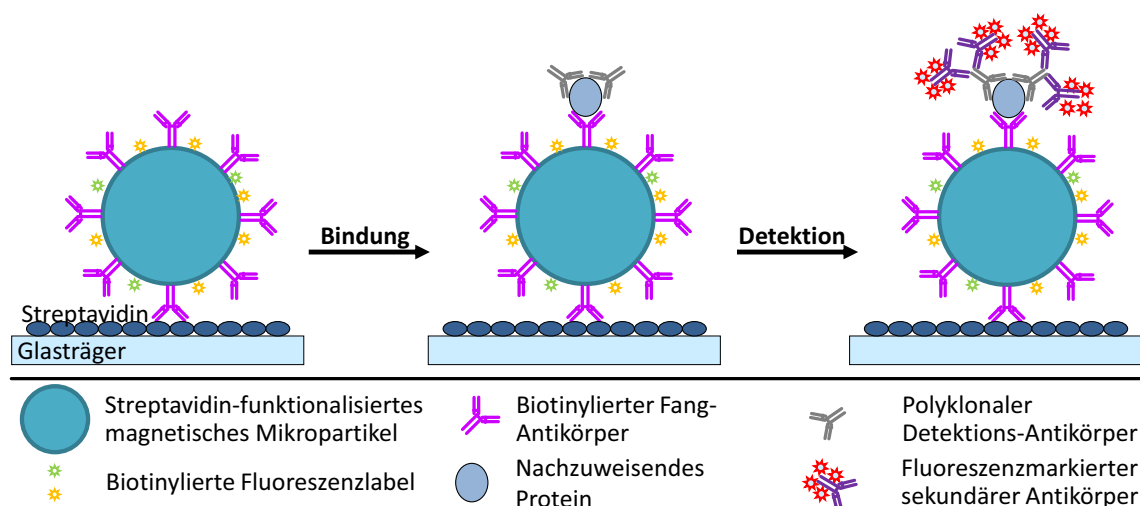


Abbildung 17: Prinzip des Immunnachweises mit kodierten Mikropartikeln

Um Kreuzreaktivitäten auszuschließen, wird pro Fluidkanal nur eine kodierte Partikelpopulation immobilisiert und deren entsprechendes Antigen verwendet. Nach 1 h Inkubation bei RT werden die Fluidkanäle mit PBST gespült. Polyklonale Detektionsantikörper werden auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBST mit 1% BSA verdünnt und in die Fluidkanäle injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei RT werden die Kanäle wieder mit PBST gespült und 10 μL einer Sekundärantikörper-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verdünnt in PBST mit 1% BSA) werden in die Kanäle injiziert. Der Sekundärantikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 (Kat. Nr. A21084 oder Kat. Nr. A10043, Invitrogen Corp.) markiert. Nach weiteren 30 min Inkubation bei RT werden die Fluidkanäle erneut mit PBST gespült und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

3.2.6.3 Paralleler Immunnachweis von vier Proteinen

Ein Gemisch aus je vier kodierten Partikelpopulationen (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, jede Population ist mit einem anderen Fangantikörper gekoppelt) wird auf der Glasoberfläche des Fluidkanals immobilisiert (siehe 3.2.3.5.1). Die vier Zielproteine werden in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween20 verdünnt und je 10 μL der verdünnten Antigenmischung werden in die

Flusszellen injiziert. Es werden PSA-Konzentrationen zwischen 0 nM und 1 nM untersucht. Im Falle der drei anderen Proteine liegt die Konzentration zwischen 0 nM und 10 nM. Nach einer h Inkubation bei RT werden die Fluidkanäle mit 100 μ L PBST gespült. Die vier polyklonalen Detektionsantikörper werden auf eine Konzentration von je 1 μ g/mL in PBST mit 1% BSA verdünnt und der Antikörpermix wird in die Fluidkanäle injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei RT werden die Kanäle wieder mit PBST gespült und 10 μ L einer Sekundärantikörper-Mischung (je 1 μ g/mL verdünnt in PBST mit 1% BSA) werden in die Kanäle injiziert. Die Sekundärantikörper sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 (Kat. Nr. A21084 und Kat. Nr. A10043, Invitrogen Corp.) markiert. Nach weiteren 30 min Inkubation bei RT werden die Fluidkanäle erneut mit PBST gespült und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Zur Untersuchung von unspezifischen Bindungen der polyklonalen Detektionsantikörper bzw. der sekundären Antikörper an Partikelpopulationen, die nicht deren spezifisches Zielprotein binden, werden die vier Partikelpopulationen kovalent mittels EDC im Fluidkanal immobilisiert. Die Partikel werden 20 min mit einer Blocklösung (1% BSA, 5% Saccharose, 0,01% NaN_3 in PBS, pH 7,4) inkubiert und mit PBST gewaschen. Pro Fluidkanal wird jeweils nur ein Zielprotein in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Zielproteine werden entweder in 1% BSA in PBS, pH 7,4 oder in Rinderserum verdünnt. Nach 90 min Inkubation mit dem Zielprotein und Waschen erfolgt die Zugabe aller vier Detektionsantikörper (60 min, je 1 μ g/mL) und nach einem weiteren Waschschrift die der Sekundärantikörper (30 min, je 2 μ g/mL), jeweils verdünnt in 1% BSA in PBS. Die Fluidkanäle werden ein letztes Mal mit PBST gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

3.2.6.4 ELISA

Mit allen hier verwendeten Antigenen werden ELISAs durchgeführt. Jede Probe wird drei Mal analysiert. Monoklonale Fangantikörper werden in PBS verdünnt (100 μ L pro Vertiefung, 2 μ g/mL) und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wird über Nacht bei 4°C inkubiert und danach fünf Mal mit PBST (300 μ L pro Vertiefung) gewaschen. Die Kavitäten der Platte werden mit einer Blocklösung (1% BSA, 5% Saccharose, 0,01% NaN_3 in PBS, pH 7,4) gefüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die

Zielproteine werden entweder in 1% BSA in PBS, pH 7,4 oder in Rinderserum verdünnt. Nach 90 min Inkubation mit dem Zielprotein und einem weiteren Waschschrift erfolgt die Zugabe des spezifischen Detektionsantikörpers (1 µg/mL, 60 min Inkubation bei RT) und nach einem weiteren Waschschrift die der mit Meerrettichperoxidase modifizierten Sekundärantikörper (Verdünnung je 1:5000, 60 min Inkubation bei RT, Kat. Nr. 25-787-278475 oder Kat. Nr. 25-787-278487, Genway Inc.). Sowohl Detektionsantikörper als auch Sekundärantikörper werden in 1% BSA gelöst in PBS verdünnt. Die Platte wird ein letztes Mal gewaschen und daraufhin wird in jede Vertiefung 100 µL TMB (Tetramethylbenzidin) gegeben, ein Substrat für das Enzym Peroxidase. Die Farbreaktion beginnt und wird, je nach erreichter Farbintensität, nach höchstens 10 Minuten mit 1 M H₂SO₄ gestoppt, wobei es zu einem Farbumschlag kommt. Die Absorption wird mit einem Photometer für Mikrotiterplatten bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Teil I: Das Biobarcode-Verfahren

4.1.1 Synthese und Funktionalisierung von magnetischen Mikropartikeln

In Abbildung 18 sind zwei ESEM-Aufnahmen (environmental scanning electron microscope) der PVAc-Mikropartikel bei knapp 5000facher (links) bzw. 800facher (rechts) Vergrößerung dargestellt. Die abgebildeten Partikel haben einen Durchmesser zwischen 0,5 μm und 10 μm . Sie sind rund und zeigen keine auffälligen Unebenheiten auf der Oberfläche. Neben den runden Partikeln sind aber auch unförmige Polymercluster zu erkennen.

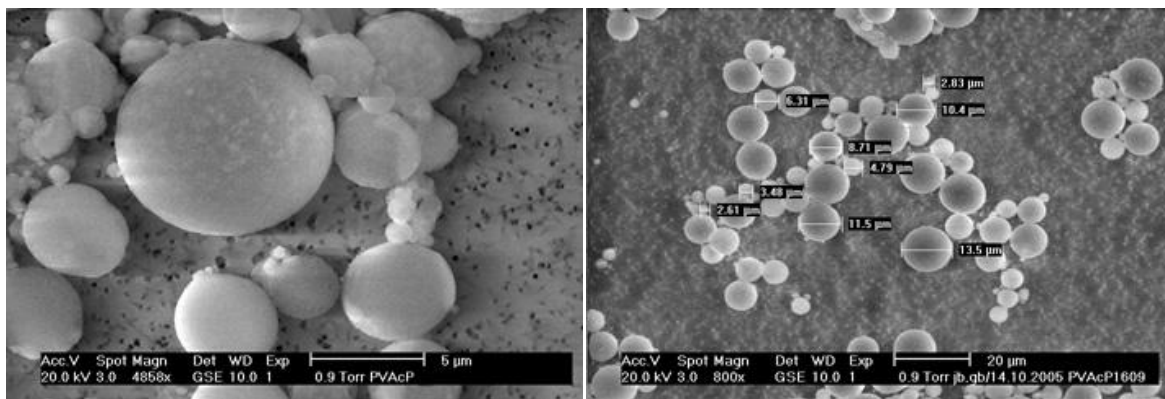


Abbildung 18: ESEM-Aufnahmen von PVAc-Partikeln

Die hier verwendeten PVAc-Partikel wurden in früheren Arbeiten charakterisiert. Sie sind, gemessen mit einem Alternating Gradient Magnetometer (AGM), superparamagnetisch und zeigten eine Sättigungsmagnetisierung von etwa 28 Am^2/kg . Dies ist für eine magnetische Separation der Partikel mit einem einfachen Handmagneten ausreichend. Der mittlere Durchmesser der Partikel beträgt 2,4 μm .

Ebenfalls in früheren Arbeiten wurde die Aminogruppenbeladung der Partikel nach Funktionalisierung mit HMDA mit einem quantitativen TNBS-Test (2, 4, 6 – Trinitrobenzensulfon-säure) bestimmt. Für die Antikörper-Kopplung wurden Partikel mit einer NH_2 -Gruppenkonzentration von ca. 200 μmol pro Gramm Partikel ausgewählt.

Es wurden sowohl kommerzielle Partikel mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen als auch selbst hergestellte PVAc-Partikel bezüglich ihrer Antikörper-Beladung untersucht. In Abbildung 19 ist die mittlere Antikörper-Beladung pro mg Partikel dargestellt.

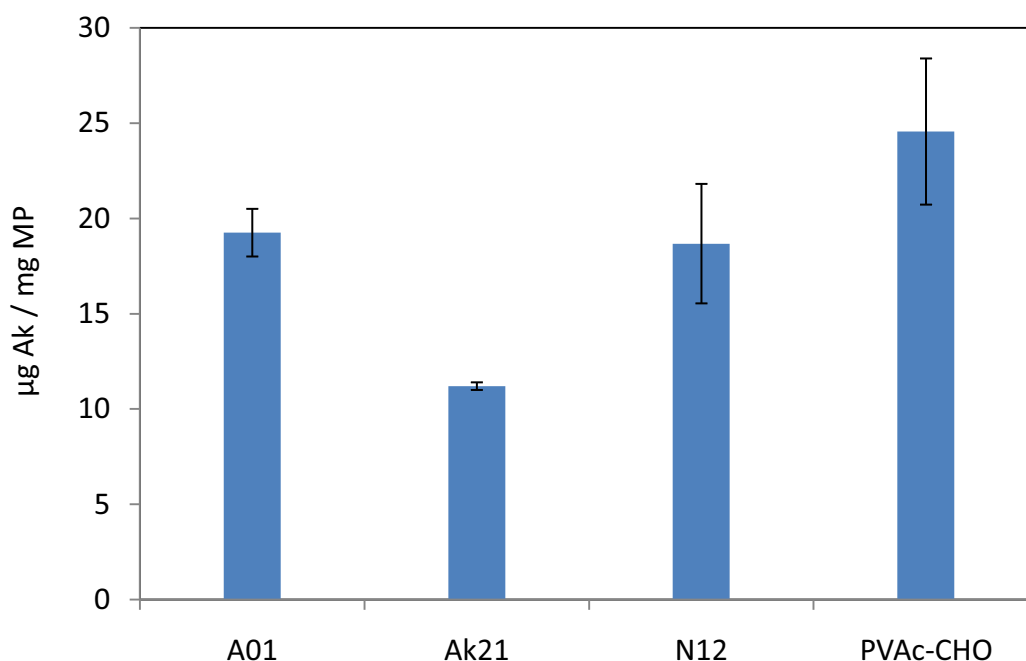


Abbildung 19: Antikörper-Beladung von magnetischen Polymerpartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. Magnetische Polyvinylalkohol-Partikel mit Aldehyd- (A01), Isocyanat- (Ak21) und Aminofunktionalisierung (N12) und im Hause hergestellte Polyvinylacetat-Partikel mit Aldehyd (PVAc-CHO)-Aktivierung

Im Falle der kommerziellen Partikel wurde die Antikörper-Kopplung über Aldehydgruppen (A01), Isocyanat-Gruppen (Ak21) und Aminogruppen (N12) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach chemischer Aktivierung der Partikel und spezifischer Oberfläche variiert die maximale Antikörper-Beladung der Magnetpartikel zwischen etwa 12 µg und 24 µg Ak pro mg MP. Dies ist einerseits auf die Reaktivität der funktionellen Gruppen zurück zu führen, andererseits aber auch auf die Dichte der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche. Für den Einsatz der Partikel im Biobarcode-Assay ist eine hohe Antikörperbeladung erstrebenswert, um unspezifische Interaktionen der Au-NP oder anderer Probenbestandteile mit reaktiven Gruppen der Magnetpartikel zu vermeiden. Partikel mit NCO-Gruppen erwiesen sich als am wenigsten geeignet, da sie nach Funktionalisierung mit dem Antikörper die geringste Beladung aufweisen. NCO-Gruppen

reagieren mit Aminogruppen des Antikörpers, aber auch mit Hydroxylgruppen bzw. mit wässrigen Lösungen. Da die Antikörper-Kopplung in wässriger Lösung durchgeführt werden muss, ist davon auszugehen, dass ein Teil der NCO-Gruppen durch Wassermoleküle zu Aminogruppen umgesetzt wird und für die Kopplungsreaktion mit dem Antikörper nicht mehr zur Verfügung steht. Partikel mit Aldehyd- und Aminogruppen zeigten ähnliche Resultate bei der Antikörperkopplung. Antikörper können nicht ohne weitere Aktivierung an mit Aminogruppen funktionalisierte Partikel binden. Partikel mit Aminogruppen werden daher vor der Kopplungsreaktion durch Zugabe von Glutardialdehyd umgesetzt. M-PVA Partikel A01 sowie N12 als auch PVAc-CHO-Partikel weisen daher vor der Kopplung mit Antikörpern Aldehydgruppen an der Oberfläche auf. Unterschiede in der Antikörperbeladung beruhen auf der Bindungseffizienz von Glutardialdehyd an die Aminogruppen der Partikel sowie auf der spezifischen Oberfläche der Partikel.

Des Weiteren wurden tosylfunktionalisierte Polystyrol-Partikel (PS-Tos) der Firma Invitrogen (Kat. Nr. 655.01) nach Herstellerangaben und im Hause hergestellte tosylfunktionalisierte Magnetpartikel (PVA-Tos) mit Antikörpern konjugiert (siehe Abbildung 20). Für die selbst hergestellten Partikel wurde das Kopplungsprotokoll von Invitrogen adaptiert. Die gebundene Antikörpermenge wurde photospektrometrisch bestimmt. Selbst hergestellte Partikel weisen eine höhere Antikörperbeladung (etwa 43 μg Antikörper pro mg Partikel) auf als die kommerziell erhältlichen Partikel (34 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

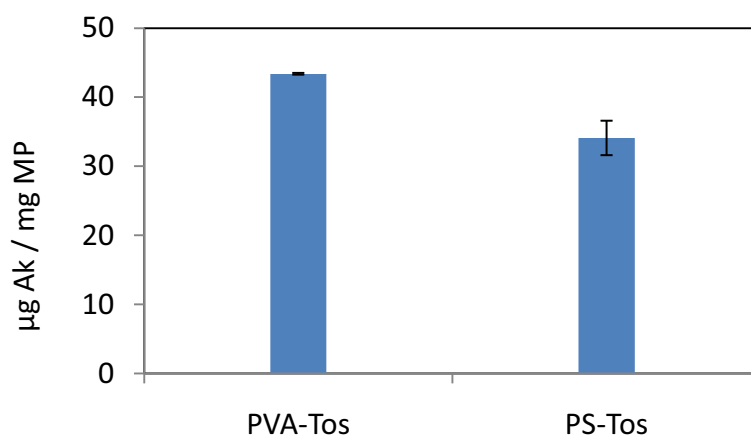


Abbildung 20: Antikörper-Beladung tosylfunktionalisierter magnetischer Polymerpartikel. Tosylfunktionalisierte Polyvinylalkohol-Partikel (PVA-Tos), Tosylfunktionalisierte Polystyrol-Partikel (PS-Tos)

Um tosylaktivierte PVA-Partikel herzustellen, wurden Acetatreste an der Oberfläche von PVAc-Partikeln mit NaOH zu Hydroxylgruppen umgesetzt, danach erfolgte die basisch katalysierte Veresterung der Alkoholreste durch Zugabe von Tosylchlorid in organischem Milieu (Tetrahydrofuran (THF) oder t-Butylmethylether). Durch diese Reaktionsbedingungen wird die Oberfläche der Partikel stark angegriffen, wie die ESEM-Bilder in Abbildung 21 belegen. Die Ausgangspartikel sind relativ rund und weisen vorwiegend eine glatte Oberfläche auf (a). Schon die Hydrolyse der Acetatreste greift die Partikelmatrix an (b). Die Aktivierung der Partikel mit Tosylchlorid in THF führt zu großen Agglomeraten. Die Partikelmatrix weist Unebenheiten auf und viele Partikel werden regelrecht zerstört. Die Aktivierung der Partikel in t-Butylmethylether scheint weniger harsche Auswirkungen auf die Partikelmatrix zu haben. Jedoch ließen sich die Partikel kaum in t-Butylmethylether aufnehmen, sondern sedimentierten als wässrige Phase am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach dem Waschen blieben sehr große Partikelagglomerate zurück, die abgetrennt wurden, sodass die Ausbeute bei nur etwa 20% lag.

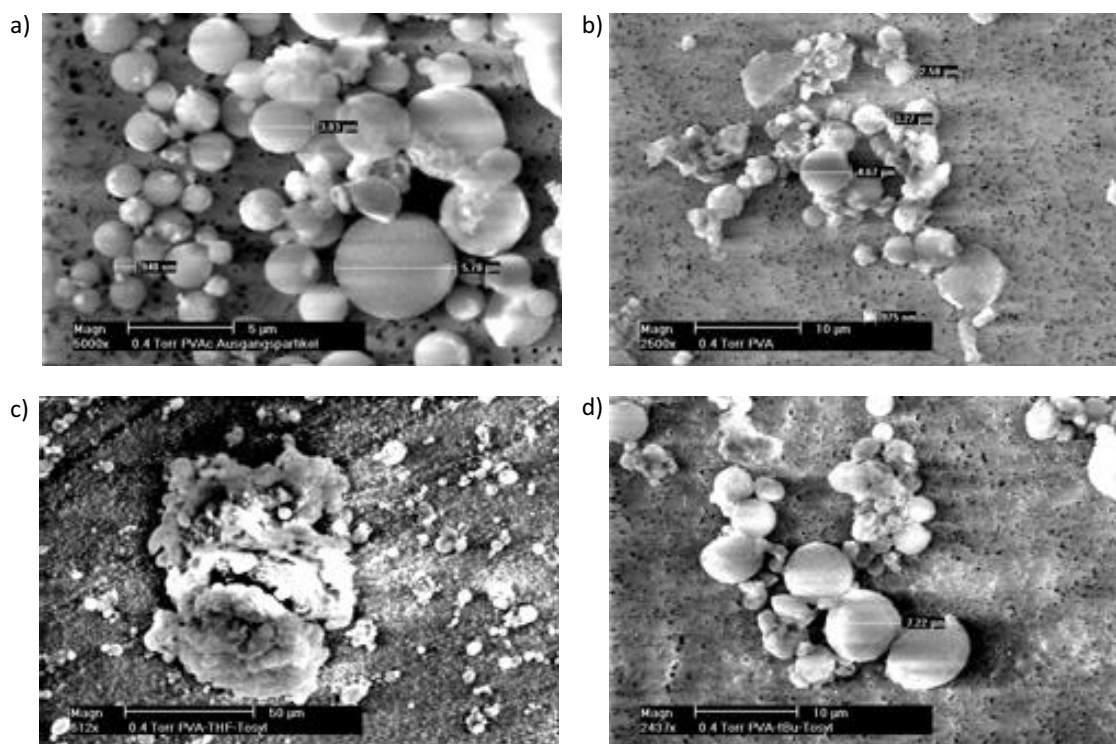


Abbildung 21: ESEM-Bilder von PVAc-Partikeln. Vor Funktionalisierung (a), nach Hydrolyse der Acetatreste (b), nach Aktivierung mit Tosylchlorid in THF (c) und in t-Butylmethylether(d) als Lösungsmittel

Raue Oberflächen und kleinere Partikelteile führen zu einer höheren spezifischen Oberfläche der Partikel. Dieser Umstand könnte eine Erklärung für die höhere Antikörperbeladung der selbst hergestellten Tosylpartikel gegenüber den kommerziell erhältlichen Partikeln sein. Allerdings sind große Partikelagglomerate (Abbildung 21 c) für den Biobarcode-Assay ungeeignet. Agglomerate erschweren die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und können pro Partikelmasse nur wenige Antikörpermoleküle binden. Kleine Partikelteile, wie sie in Abbildung 21 d zu sehen sind, weisen zwar eine große spezifische Oberfläche auf, könnten aber für eine effektive Magnetseparation zu klein sein. Um reproduzierbare Ergebnisse beim Proteinnachweis zu erhalten, sollten die Magnetpartikel eine ausreichend kleine Partikelgrößenverteilung aufweisen. Die zur Verfügung stehende Oberfläche der Partikel eines Aliquots sollte nicht von der spezifischen Oberfläche eines anderen Aliquots der gleichen Partikelmasse abweichen.

Die hier durchgeführten Kopplungsreaktionen basieren auf klassischen Ansätzen, die zu einer statistischen Ausrichtung der Antikörper führen. Es ist also davon auszugehen, dass nur ein Teil der gebundenen Antikörper für die Antigen-Antikörper-Erkennung auch tatsächlich zur Verfügung steht. Nur Antikörper, deren Antigen-Erkennungsstelle frei zugänglich, also der Lösung zugewandt ist, sind für den späteren Immunnachweis von Nutzen [80, 81].

4.1.2 Synthese und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Abbildung 22 zeigt TEM-Aufnahmen (Transmissionselektronenmikroskop) kommerzieller und selbst hergestellter Au-NP. Sowohl die kommerziellen als auch die selbst hergestellten Partikel sind monodispers, der mittlere Durchmesser der im Hause hergestellten Partikel liegt bei etwa 15 nm. Neben diesen Partikeln wurden im Biobarcode-Assay auch kommerziell erhältliche Au-NP mit Durchmessern von 15 nm und 30 nm eingesetzt.

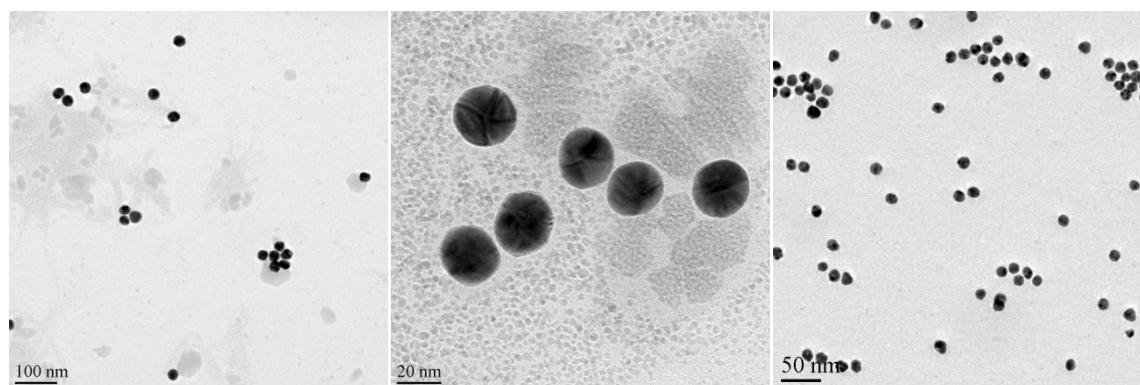


Abbildung 22: TEM-Aufnahmen von 30 nm Goldpartikeln (British BioCell International, UK, links), vergrößerte Darstellung der Partikel (Mitte) und selbst hergestellte 15 nm Goldpartikel (rechts)

Für die Bindung von Antikörpern an Au-NP wurde zunächst ein Beladungstest durchgeführt (siehe Abbildung 23).

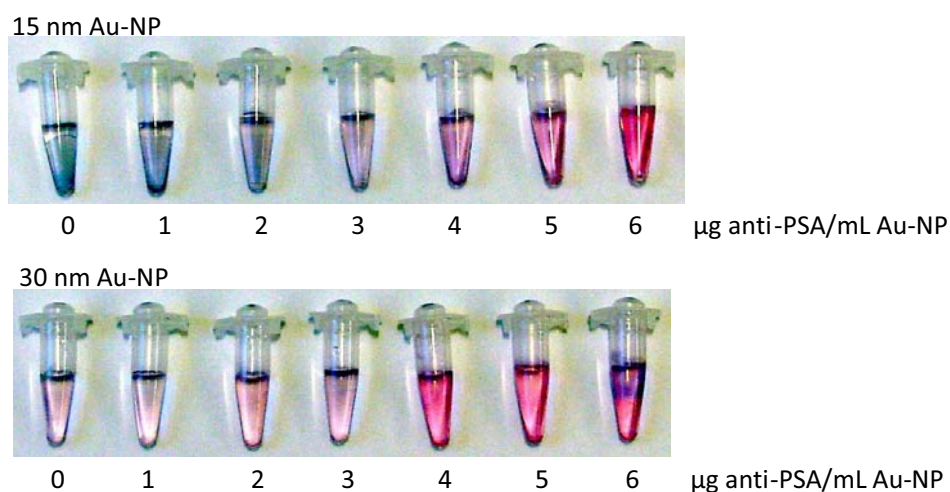


Abbildung 23: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der nötigen Antikörpermenge

Der Beladungstest gibt Auskunft darüber, wie viele Antikörper gebunden werden müssen, um ein Aggregieren der NP zu verhindern. Präzipitieren die Au-NP, so ändern sich ihre optischen Eigenschaften und damit die Farbe der Suspension. Die Wellenlänge des absorbierten Lichtes hängt von der Partikelgröße und -dichte ab. Durch die Formation von Kolloidaggregaten verändert sich der mittlere Durchmesser und die Suspension absorbiert Licht einer höheren Wellenlänge, was durch einen Farbumschwung ins Blaue sichtbar wird. Der Farbumschwung durch Aggregation erfolgt erst nach Zugabe von konzentrierter Natriumchlorid-Lösung, da hierdurch die Ionenstärke erhöht und die Aggregation gefördert wird. Die Erhöhung der Ionenstärke und bestimmte pH-

Bedingungen sind für die Funktionalität der Antikörper nötig. Um die Partikel trotz Zugabe konzentrierter Puffer in Lösung zu halten, müssen Detergenzien hinzugegeben werden. Vor allem die Zugabe der Barcode-DNA stellt einen kritischen Schritt dar, da die Nukleinsäure den pH-Wert schnell absenkt und dies zur Aggregation der Partikel führen kann [12]. In der Praxis entspricht die nötige Antikörpermenge derjenigen, die beim Farbumschlag von rot nach blau zugegeben wurde.

Für 15 nm Au-NP sind 6 μg anti-PSA Antikörper (Kat. Nr. 310-01, Fujirebio Diagn.) oder 18 Antikörpermoleküle pro Au-NP ausreichend, um stabile Goldpartikel-Antikörper Konjugate zu erhalten, im Falle der 30 nm Partikel werden 4 μg Antikörper pro mL Au-NP Suspension oder 84 Antikörpermoleküle pro Au-NP benötigt.

Nach einigen Tagen Lagerung bei 4°C aggregierten die Antikörper-funktionalisierten Au-NP oder hefteten sich an die Gefäßwand, wie auch in Abbildung 23 (30 nm Au-NP, 6 μg Antikörper / mL) zu sehen ist. Um stabilere Konjugate zu erzeugen, wurden Experimente mit dem Detergenz Tween20 durchgeführt. Es wurde berichtet, dass auch die Zugabe von DNA Au-NP-Suspensionen stabilisiert [82]. In Abbildung 24 sind Au-NP-Suspensionen nach Zugabe von 1 μL 5% w/v unspezifischer DNA, 1 μL Tween20 und einer Mischung aus DNA und Tween20 gezeigt. Die Zugabe von DNA scheint nicht zur Stabilisierung der Suspension beizutragen. In der Abbildung sind sedimentierte Au-NP-Aggregate zu sehen (a und c, 15 nm und 30 nm Partikel). Die Zugabe von Tween20 (Endkonzentration 0,3% v/v) erhöht dagegen die Stabilität der Suspension (b).

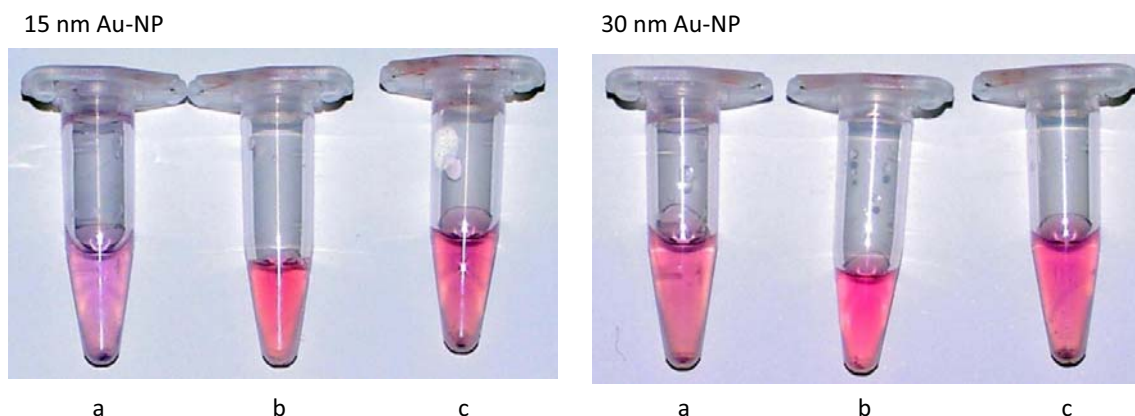


Abbildung 24: Stabilisierung von Goldpartikel-Antikörper Konjugaten. Suspension nach Zugabe von 1 μL 5% w/v DNA (a), 1 μL Tween20 (b), 1 μL 5% w/v DNA und 1 μL Tween20 (c)

Beobachtungen zeigten auch, dass eine schrittweise Funktionalisierung der Goldpartikel über drei Tage zur Langzeitstabilisierung der Suspensionen beitrug. Am ersten Tag werden die Antikörper sowie die Barcode-DNA an die Au-NP gebunden und Tween20 zugegeben, am zweiten Tag findet das Einstellen der Ionenkonzentration in mindestens 6 Schritten und am dritten Tag die Reinigung der Goldpartikelkonjugate durch Zentrifugieren statt. Auf diese Weise hergestellte Nanopartikel-Konjugate zeigten auch nach einem Monat keine sichtbaren Präzipitate.

4.1.3 Automatisierung des Assays mit einem Magnetseparationsmodul

Mit dem Magnetseparationsmodul „chemagic Prepito“ können 12 Proben parallel bearbeitet werden. Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten, musste das Gerät dem Biobarcode-Assay angepasst werden. In einem Experiment wurde der Assay mit 12 identischen Proben mit jeweils den gleichen Konzentrationen an mit Antikörpern (Fangantikörper anti-PSA) funktionalisierten Magnetpartikeln, PSA als Zielprotein und funktionalisierten Goldpartikeln (mit Detektionsantikörper für PSA und Barcode-DNA) mit dem „chemagic Prepito“ durchgeführt. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 25 (a) dargestellt. Die Nummern „1“ bis „12“ bezeichnen die Positionen der jeweiligen Probe in der Titerplatte bzw. der Magnetstäbe, „N“ steht für die PCR-Negativkontrolle, „P“ für die PCR-Positivkontrolle. Erwartet wurden 12 Banden der gleichen Intensität, also jeweils die gleiche Menge an PCR-Produkt. Wie einerseits an Hand der PCR-Produkte zu sehen ist, als auch andererseits durch die Betrachtung der nach dem Versuch im Reaktionsgefäß verbliebenen Partikelmenge zu sehen war, variiert die Effektivität der Magnetseparation von Position zu Position im Gerät. Nach jedem Inkubations- und Waschschrift separiert das Gerät die Partikel magnetisch und transferiert das Pellet in die nächste Kavität der Titerplatte. Wenn die Magnetseparation der Partikel nur unvollständig ist oder Partikel während des Transports in die nächste Kavität nicht stark genug am Magnetstift haften, können keine reproduzierbaren Testbedingungen geschaffen werden. Je mehr Magnetpartikel nach allen Inkubations- und Waschschriften tatsächlich separiert wurden, desto stärker fiel die DNA-Bande der jeweiligen Probe aus. Die Menge an PCR-Produkt war demnach die direkte Folge der separierten Magnetpartikelmenge.

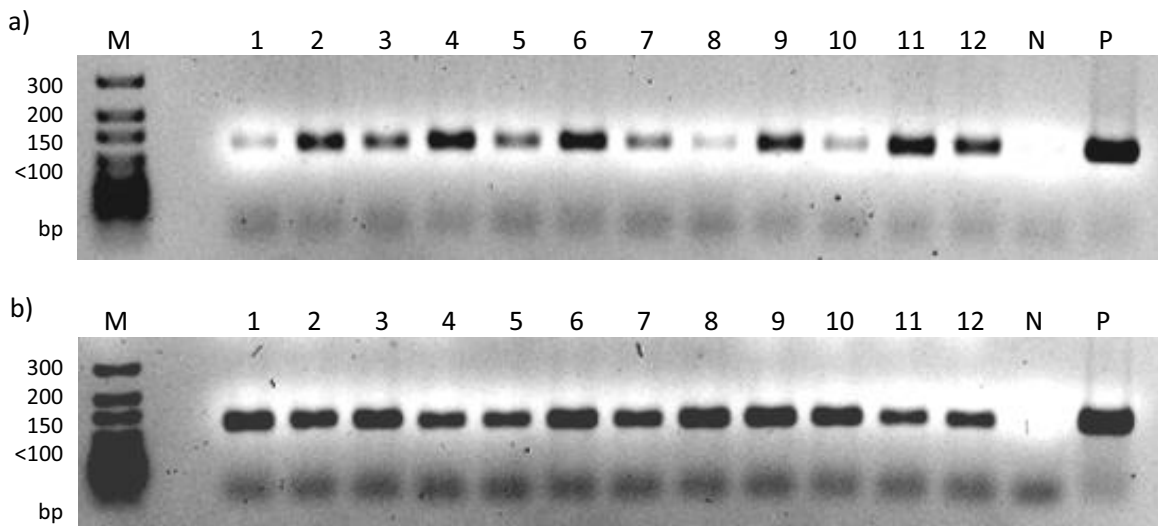


Abbildung 25: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der automatisierten Magnetseparation mit dem „chemagic Prepito“. PCR-Produkte derselben Probe nach 8-facher Magnetseparation vor der Optimierung des Versuchsprotokolls (a), Wiederholung des Experiments nach Optimierung des Versuchsprotokolls (b). Marker (M), Position der Magnetstifte (1-12), Negativkontrolle (N), Positivkontrolle (P)

Abbildung 25 (b) zeigt das Ergebnis einer PCR nachdem das Betriebsprotokoll bezüglich Inkubationszeiten, Dauer und Geschwindigkeit der Magnetseparation und weiteren technischen Details angepasst wurde. Wieder wurde der Biobarcode-Assay mit 12 identischen Ansätzen, wie eben beschrieben, durchgeführt. Die PCR zeigt relativ einheitliche Banden. Das Gerät konnte nach der Optimierung zur Automatisierung des Barcode-Assays eingesetzt werden. Kritische Schritte bei der automatisierten Magnetseparation waren einerseits die Dauer der Magnetseparation, bevor die Partikel in die nächste Kavität befördert wurden und andererseits die Geschwindigkeit der Magnetstäbe beim Phasendurchbruch (Lösung / Luft). Wenn dieser Übergang zu schnell stattfindet, verlieren die Magnetstäbe die Partikelprobe und fahren ohne Partikel fort. Bei zu langen Inkubationszeiten, geringer Ionenstärke des Puffers und geringen Partikelmengen tendieren die Partikel dazu, an die Titerplatte zu adsorbieren, was die folgende Magnetseparation erschwert oder ganz verhindert.

4.1.4 Optimierung der Versuchsparameter

4.1.4.1 Unspezifische Bindung von DNA an Reaktionsgefäße

Beim Biobarcode-Verfahren soll eine Probe mit Zielprotein zu einem positiven PCR-Signal (DNA-Bande ist im Gel sichtbar) und eine Probe ohne Antigen zu einem negativen PCR-

Signal führen (keine Bande im Gel sichtbar). Dies ist nur der Fall, wenn keine unspezifischen Interaktionen zwischen entweder ungebundener und nicht durch Zentrifugieren vollständig entfernter Barcode-DNA und Magnetpartikel oder Goldpartikel mit gebundener Barcode-DNA und Magnetpartikel auftreten. Anhand mehrerer Experimente konnte zudem gezeigt werden, dass es essentiell ist, nach jedem Waschschrift das Reaktionsgefäß zu wechseln, wie folgendes Beispiel belegt. Mehrere Reaktionsgefäße wurden bezüglich ihrer unspezifischen Bindung mit DNA untersucht (jeder Ansatz doppelt).

Tabelle 4: Versuchsansatz zur Überprüfung unspezifischer DNA-Bindung an Reaktionsgefäße

	Standard-Eppendorff- Reaktionsgefäß (E)	DNA-low-binding - Reaktionsgefäß (LB)	Glasgefäß (G)
Barcode-DNA (pmol)	4	4	4
PBS (µl)	46	46	46

PBS und Barcode-DNA (40 bp) wurden in den verschiedenen Reaktionsgefäßen gemischt (siehe Tabelle 4), danach wurde die gesamte Lösung verworfen. Jeweils sieben Mal wurden 400 µl PBS, 0,05% Tween20, 0,1% BSA hinzugefügt, die Lösung wurde gemischt, zentrifugiert und nach jedem Waschschrift vollständig aus dem Gefäß entfernt. In alle Gefäße wurden dann je 50 µL H₂O gegeben und die Lösung wurde für 7 min auf 95°C erhitzt. Mit einem 10 µL Aliquot wurde eine PCR durchgeführt.

Auf das in Abbildung 26 dargestellten Gel wurden neben dem Marker (M, DNA-Leiter) eine PCR-Positivkontrolle (P), eine PCR-Negativkontrolle (N) und die PCR-Produkte, wie sie nach dem oben beschriebenen Ansatz erhalten wurden (E, LB und G) aufgetragen.

Das Polyacrylamidgel zeigt, dass nach sieben Waschsritten immer noch genügend Barcode-DNA unspezifisch an die Gefäßwand gebunden hatte, um während der PCR ein gut sichtbares Produkt zu ergeben. In diesem Experiment wurde nur Barcode-DNA eingesetzt. Ähnliche Experimente wurden mit Barcode-DNA funktionalisierten Goldpartikeln durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass auch diese unspezifisch an die Gefäßwand binden. Trotz mehrerer Waschsritte lassen sich die unspezifisch

gebundenen Substanzen nicht entfernen. Bei Elution der Barcode-DNA im Biobarcode-Assay wird das Reaktionsgefäß für 10 min auf 95°C erhitzt, um einen Strang der Barcode-DNA in Lösung zu bringen. Durch die Temperaturerhöhung werden unspezifisch an der Gefäßwand gebundene Barcode-DNA bzw. Goldpartikel abgelöst und führen zu einem falsch positiven PCR-Ergebnis.

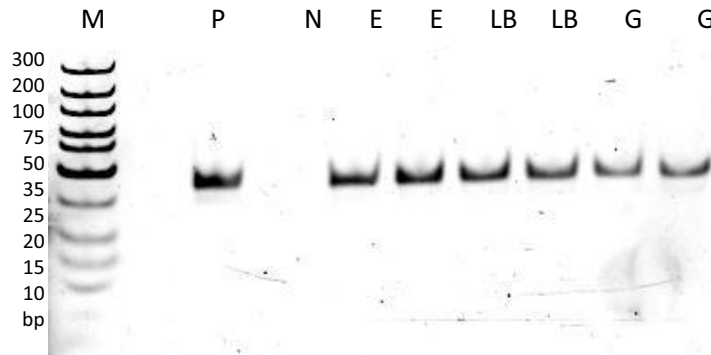


Abbildung 26: PCR zur Untersuchung unspezifischer DNA-Bindung an Reaktionsgefäße (Polyacrylamidgel). Marker (M), Positivkontrolle (P), Negativkontrolle (N), Standard Eppendorff Reaktionsgefäß (E), DNA-low-binding Reaktionsgefäß (LB), Glasgefäß (G)

Die Möglichkeit, dass das unerwünschte PCR-Produkt die Folge einer nicht ausreichenden Verdünnung der Barcode-DNA ist, wurde mittels eines Verdünnungsversuchs überprüft. Bei jedem Waschschrift verbleibt eine, wenn auch kleine, Menge Flüssigkeit und damit auch Barcode-DNA im Reaktionsgefäß. Um auszuschließen, dass diese kleine Menge das unspezifische Signal verursacht, wurden je 2 µL Barcode-DNA (8,08 pmol/µL) sieben Mal wie im vorigen Experiment in 400 µL PBS, 0,05% Tween20, 0,1% BSA verdünnt. Schon eine vierfache Verdünnung der ursprünglich eingesetzten Barcode-DNA brachte kein PCR-Produkt mehr hervor. Die im Gefäß verbleibende Flüssigkeitsmenge nach einem Waschschrift mit anschließendem Zentrifugieren und Verwerfen der Lösung beträgt erfahrungsgemäß weniger als 2 µL. Die Anzahl der Waschschrift ist zur Vermeidung eines falsch positiven PCR-Signals folglich ausreichend und das unerwünschte PCR-Signal beruht auf unspezifischer Bindung der DNA an die Gefäßwand. In folgenden Experimenten wurde daher die Lösung bzw. Partikelsuspension nach jedem Waschschrift in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

4.1.4.2 Unspezifische Bindung der Barcode-DNA an Magnetpartikel

Die Barcode-DNA bindet nicht nur unspezifisch an Reaktionsgefäße, sondern auch direkt an die im Biobarcode-Assay eingesetzten Magnetpartikel, wie folgende Abbildung demonstriert. Je 200 µg Magnetpartikel (M-PVA-Partikel (A01) und PVAc-Partikel, jeweils doppelter Ansatz, wurden mit Antikörpern (anti-CD54) konjugiert. Daraufhin wurden je 4 pmol Barcode-DNA (ohne Au-NP) zu den Partikeln gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Partikel wurden magnetisch separiert und sieben Mal mit 400 µl PBS, 0,05% Tween20, 0,1% BSA gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde jeweils das Reaktionsgefäß gewechselt. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Partikel in 50 µl H₂O aufgenommen und auf 95°C erhitzt. Die Partikel wurden separiert und mit dem Überstand wurde eine PCR durchgeführt.

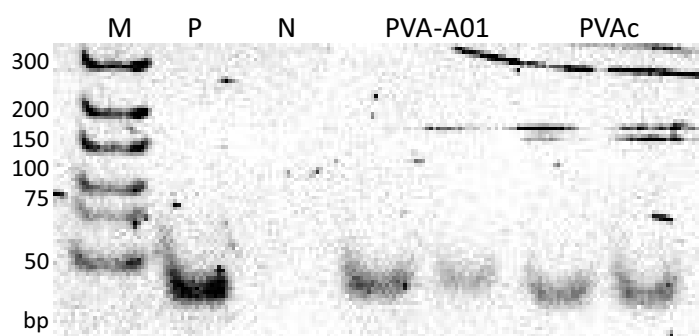


Abbildung 27: PCR zur Untersuchung unspezifischer DNA-Bindung (40 bp) an Magnetpartikel (Polyacrylamidgel). Marker (M), Positivkontrolle (P), Negativkontrolle (N), M-PVA-Partikel (PVA-A01), PVAc-Partikel (PVAc)

Bei diesem Versuch sollte kein PCR-Signal entstehen. Es wurden mit einem Antikörper funktionalisierte Magnetpartikel eingesetzt, jedoch wurde weder das Zielprotein noch mit Detektionsantikörpern funktionalisierte Goldpartikel hinzu gegeben. Die eingesetzte Barcode-DNA sollte nach Magnetseparation der Partikel im Überstand verbleiben, welcher verworfen wird. Auch die Verdünnung (Restwasser zwischen den Magnetpartikeln) sollte durch das siebenfache Waschen ausreichend hoch sein, um kein PCR-Produkt zu erhalten. Eine Kontamination durch unspezifische Bindung der Barcode-DNA an die Gefäßwand konnte durch das Wechseln des Reaktionsgefäßes ausgeschlossen werden. Die im Gel sichtbaren PCR-Produkte (siehe Abbildung 27) sind daher auf Wechselwirkungen der Barcode-DNA mit den Magnetpartikeln zurückzuführen. Für den

erfolgreichen Einsatz der Magnetpartikel im Biobarcode-Assay ist daher eine Passivierung der Partikeloberfläche notwendig, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Unspezifische Interaktionen zwischen DNA und Magnetpartikeln konnten durch den Einsatz einer längeren DNA-Sequenz (120 bp anstatt 40 bp) als Barcode-DNA verhindert werden, wie folgendes Gel zeigt. Es wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie im vorigen Experiment gewählt (kein Zielprotein, keine Au-NP). Bei den Partikeln handelte es sich um zwei verschiedenen funktionalisierte PVA-Partikel (aminofunktionalisiert: N12 und aldehydfunktionalisiert: A01) und PVAc-Partikel (aldehydfunktionalisiert) gekoppelt mit dem Antikörper anti-CD54. Alle Proben wurden doppelt aufgetragen. Die Barcode-DNA sollte durch die Waschschriffe entfernt werden, in diesem Experiment wird kein PCR-Produkt erwartet.

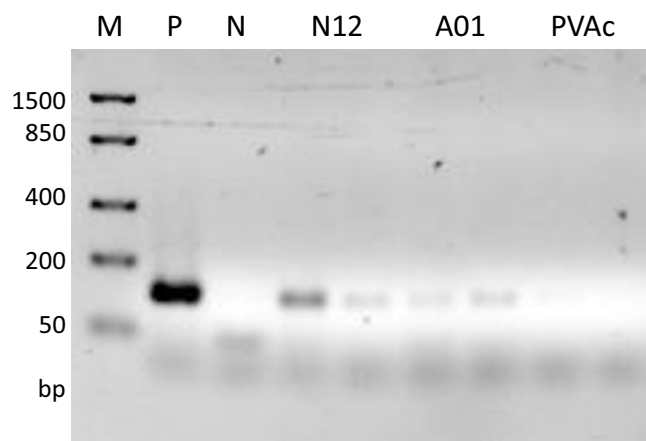


Abbildung 28: PCR zur Untersuchung unspezifischer DNA-Bindung (120 bp) an Magnetpartikel (Agarosegel). Marker (M), Positivkontrolle (P), Negativkontrolle (N), M-PVA-Partikel (N12 und A01), PVAc-Partikel (PVAc)

Nur die PCR mit dem Überstand der PVAc-Partikel zeigte kein unspezifisches DNA-Produkt. Beide M-PVA-Partikel führten zu einem leichten Signal. Für die folgenden Experimente wurden daher, wenn nicht anders vermerkt, PVAc-Partikel eingesetzt, da diese die geringste unspezifische Interaktion mit der Barcode-DNA aufwiesen.

4.1.4.3 Unspezifische Bindungen der Goldpartikel an Magnetpartikel

In weiteren Versuchen wurde demonstriert, dass nicht nur Barcode-DNA in Lösung, sondern auch mit Antikörpern und Barcode-DNA funktionalisierte Goldpartikel die Tendenz besitzen, unspezifisch an mit Antikörper funktionalisierte Magnetpartikel zu

binden. Mit und ohne Hilfe des Magnetseparationsmoduls und durch unterschiedliche Strategien wurde versucht, die unspezifische Bindung zu minimieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammen gefasst und werden im Folgenden genauer beschrieben.

Tabelle 5: Strategien zur Passivierung von Magnetpartikeln für den Einsatz im Biobarcode-Assay

Strategie	Bemerkung	Ergebnis
Kovalente Sättigung reaktiver Gruppen an der MP-Oberfläche	Glyzin, Ethanolamin und Ammoniumchlorid deaktivieren mit Aldehyd- oder Tosylgruppen funktionalisierte Partikeloberflächen	Glyzin (siehe Abbildung 29) passiviert die Partikeloberfläche am effektivsten → weniger Goldpartikel lagern sich unspezifisch an
Passivierung der Magnetpartikeloberfläche durch Adsorption von Detergenzien, Nukleinsäuren und Proteinen	SDS, Tween20, Triton X 100, InhibitusX (Blockreagenz), BSA, Milchpulver, Serum, tRNA (siehe Abbildung 31), RNA, DNA	DNA blockt Partikel → weniger Goldpartikel lagern sich unspezifisch an (siehe Abbildung 30)
Variationen der Puffermedien bezüglich Zusammensetzung, pH-Wert und Ionenstärke	Zugabe von SDS, Tween20, Tris-Puffer, PBS-Puffer, pH-Werte: 6-9, Ionenstärken: 10 mM – 150 mM	Puffer mit niedriger Ionenstärke zeigen weniger unspezifisches Signal bei PCR (siehe Abbildung 31)
Screening verschiedener Magnetpartikel	M-PVA-Partikel (N12, A01, Ak12, Ak21), Tosyl-aktivierte Polystyrolpartikel (Invitrogen), PVAc-Partikel	PVAc-Partikel zeigen eine geringere unspezifische Wechselwirkung mit Barcode-DNA (siehe Abbildung 28 und Abbildung 32)
Elution der Barcode-DNA mit DTT (DTT verdrängt SH-modifizierte Barcode-DNA vom Au-NP)	Unspezifisch an Magnetpartikeln gebundene DNA sollte nicht in Lösung gehen, am Goldpartikel gebundene DNA sollte in Lösung gehen	DTT verhindert die Enzymaktivität der Polymerase während der PCR → hier nicht geeignet
Partikelmasse (Magnetpartikel)	2 µg – 200 µg pro Probe	4 µg MP scheinen gut geeignet (siehe Abbildung 33)
Real-time PCR anstatt konventioneller PCR	Real-time PCR ermöglicht eine genauere Quantifizierung der Barcode-DNA in der Probe	In Proben mit Zielprotein befand sich die gleiche Menge Barcode-DNA wie in Proben ohne Zielprotein (siehe Abbildung 35)
Verwendung von Ultraschall während der Waschschrte	Durch Ultraschall können Partikelagglomerate, die während der Magnetseparation entstehen, gelöst werden	Weniger unspezifische PCR-Produkte, aber auch weniger effektive Magnetseparation (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37)

Kovalente Sättigung verbleibender reaktiver Gruppen auf der Magnetpartikeloberfläche

Nach der Kopplung des Fangantikörpers an aktivierte Magnetpartikel müssen verbleibende reaktive Gruppen (z.B. Tosyl- oder Aldehydgruppen) durch Substanzen wie Ethanolamin oder Glyzin passiviert werden. Im folgenden Versuch wurden die Magnetpartikel (PVA-CHO) nach erfolgter Antikörper-Kopplung entweder mit Ethanolamin oder mit Glyzin behandelt. Beide Substanzen enthalten Aminogruppen, die mit den verbliebenen Aldehydgruppen der Magnetpartikel reagieren und diese inaktivieren. Die Magnetpartikel wurden mit dem Antikörper PSA10 und die Goldpartikel (30 nm) mit dem Antikörper PSA66 und Barcode-DNA funktionalisiert. Zu den Proben EP und GP wurde PSA als Antigen gegeben.

Probe	Passivierung	Antigen	PCR-Produkt erwartet?
EP	Ethanolamin	1 µg PSA	Ja
E-	Ethanolamin	-	Nein
GP	Glyzin	1 µg PSA	Ja
G-	Glyzin	-	nein

Bei diesen Proben (EP und GP in Abbildung 29) wurde je ein positives PCR-Signal erwartet. Zu den Proben E- und G- wurde kein Antigen gegeben, hier wurde daher ein negatives PCR-Signal erwartet.

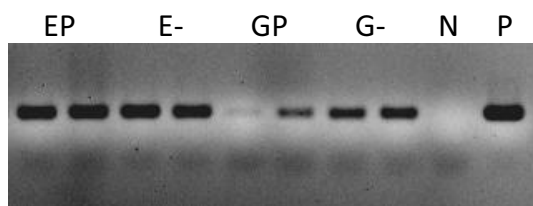


Abbildung 29: Vergleich von Ethanolamin (EP mit und E- ohne Antigen) und Glyzin (GP mit und G- ohne Antigen) zur Sättigung reaktiver Aldehydgruppen am MP. N: PCR-Negativkontrolle, P: PCR-Positivkontrolle (P), alle Ansätze doppelt.

Die Proben ohne Antigen führten jeweils zu einem falsch-positiven PCR-Signal (E- und G-). Durch Vergleich der Banden EP und E- (stärkere Banden) mit GP und G- (schwächere Banden) kann aber geschlossen werden, dass Glyzin zur Passivierung der Magnetpartikel besser geeignet ist als Ethanolamin.

Passivierung der Magnetpartikel durch Adsorption verschiedener Blockreagenzien

Neben der kovalenten Sättigung reaktiver Gruppen an der MP-Oberfläche wurden auch einige Substanzen (Detergenzien, Nukleinsäuren und Proteine) zur Passivierung der Magnetpartikeloberfläche durch Adsorption untersucht (siehe folgende Tabelle).

Blocklösung	Probe	Art der Blocklösung
1% w/v SDS in PBS	S	Detergenzien
1% w/v Tween20 in PBS	T	
10% w/v Milchpulver in PBS	M	Proteine
5% w/v BSA in PBS	B	
5% w/v unspezifische DNA in PBS	D	Nukleinsäure
2,5% w/v Unspezifische DNA, 10% v/v Ziegen Serum	DS	Proteine und DNA
2,5% w/v unspezifische DNA, 5% w/v Milchpulver	DM	

Je 1 mL der Blocksubstanz wurde mit 100 μ L MP (anti-CD54, 100 μ g) gemischt und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben zwei Mal mit PBS mit 0,025% Tween20 gewaschen. Je 25 μ g MP wurden in 100 μ L Puffer und 0,8 μ L Ziegen Serum suspendiert und 25 min inkubiert. Dieser Schritt simuliert die Inkubation mit dem Antigen. Daraufhin wurden die Partikel erneut gewaschen, magnetisch separiert, in 100 μ L Goldpartikel-Lösung (1 μ L 30 nm Au-NP mit PSA-Antikörper und Barcode-DNA, und 99 μ L Puffer) suspendiert und 30 min inkubiert. Nach weiteren sieben Waschschrritten wurden die Magnetpartikel erhitzt, separiert und mit einem Aliquot der verbleibenden Lösung wurde eine PCR durchgeführt. Bei allen Proben wurde ein negatives PCR-Signal (kein Produkt) erwartet.

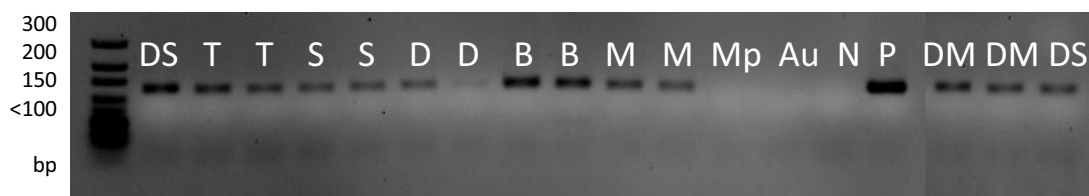


Abbildung 30: Vergleich verschiedener Blocklösungen zur Passivierung der MP-Oberfläche

Aus den Bandes des in Abbildung 30 gezeigt Gels lässt sich schließen, dass SDS und DNA die Magnetpartikeloberfläche am effektivsten gegen unspezifische Wechselwirkungen

blocken. SDS kann Proteine denaturieren, daher ist der Einsatz dieses Detergenz im Biobarcode-Assay kritisch. Sehr geringe Konzentrationen (0,01%) könnten aber durchaus verwendet werden, da diese die Antigen-Antikörperbindung normalerweise nicht beeinflussen. Die mit unspezifischer DNA geblockten Partikel zeigen im Durchschnitt das geringste PCR-Signal. Bei den im Folgenden durchgeführten Versuche wurden daher die MP vor Einsatz im Biobarcode-Assay stets mit unspezifischer DNA geblockt. Die Proben Mp (nur Magnetpartikel), Au (nur Goldpartikel), N und P stellen Negativ- und Positivkontrollen dar. Bei der Probe MP wurden keine Goldpartikel zugegeben, bei der Probe Au wurden keine Magnetpartikel eingesetzt. Dieser Versuch wurde mit dem Magnetseparationsmodul durchgeführt.

Einsatz eines Waschpuffers geringer Ionenstärke und Zusatz von tRNA zur Reduktion unspezifischer Bindungen

Im folgenden Versuch wurden ein Waschpuffer geringerer Ionenstärke und die Zugabe von tRNA während der Inkubation der Magnetpartikel mit den Goldpartikeln untersucht. Für die Bindung von DNA an Partikel wird von Herstellern eine hohe Ionenstärke empfohlen, da diese die stark negative Ladung der DNA abschwächt und eine Annäherung der einzelnen Komponenten und damit auch die Bindung der DNA an die Partikel fördert. Eine geringe Ionenstärke sollte folglich die Abstoßung der einzelnen Komponenten voneinander fördern und damit eine effektivere Auswaschung unspezifisch gebundener und mit Barcode-DNA funktionalisierter Au-NP ermöglichen. Die tRNA soll zusätzlich unspezifische Wechselwirkungen zwischen MP und Au-NP vermindern [83]. Je 20 µg PVAc-CHO Partikel funktionalisiert mit anti-CD54 Antikörper wurden zunächst mit unspezifischer DNA und Ziegenserum für 30 min bei 37°C geblockt. Danach wurden sie zwei Mal mit je 400 µL PBS mit 0,25% unspezifischer DNA gewaschen und der Überstand wurde separiert. Nach Inkubation der Proben mit den Goldpartikeln (A: 5 µl 15 nm Au-NP, 5 µL 5% unspezifische DNA, 90 µL PBS; B: 5 µl 30 nm Au-NP, 5 µL 5% unspezifische DNA, 90 µL PBS; C: 5 µl 15 nm Au-NP, 5 µL 66 mg/mL tRNA, 90 µL PBS, D: 5 µl 15 nm Au-NP, 5 µL 66 mg/mL tRNA, 90 µL PBS, alle Ansätze doppelt) wurden die Proben A und B mit einem 10 mM Tris-Puffer, pH 9 gewaschen, die Proben C und D wurden mit dem Standardpuffer gewaschen, jedoch wurde während der Inkubation mit den Goldpartikeln

tRNA zugegeben. Die Goldpartikel waren mit 120 bp Barcode-DNA und PSA-Antikörper funktionalisiert. Das PCR-Ergebnis aller Proben sollte negativ sein (kein PCR-Produkt).

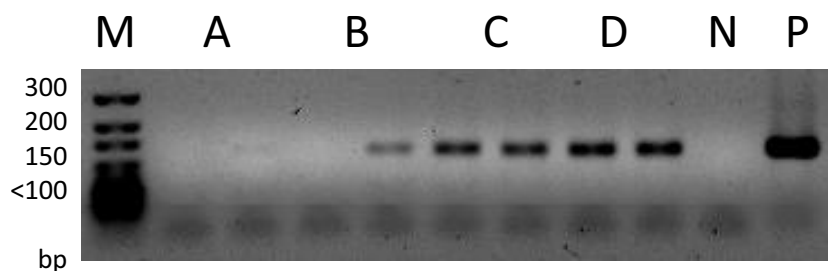


Abbildung 31: Versuch zur Auswirkung eines Waschpuffers mit niedriger Ionenstärke auf die Auswaschung nicht spezifisch gebundener Goldpartikel (A und B) und zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen durch Zugabe von tRNA während der Inkubationsphase mit Goldpartikeln (C und D). N: PCR-Negativkontrolle, P: PCR-Positivkontrolle, M: Marker.

Wie das Gel in Abbildung 31 verdeutlicht, scheint der 10 mM Tris-Puffer als Waschpuffer geeignet zu sein. Allerdings wurde bei diesen Proben auch beobachtet, dass sich die Magnetpartikel nur schwer separieren lassen. Die in 10 mM Tris-Puffer gewaschenen Proben bildeten bei der Magnetseparation kein Pellet, sondern verteilten an der Gefäßwand des Reaktionsgefäßes, die dem Magneten zugewandt wurde, was das Waschen erschwerte. Dieser Versuch wurde von Hand durchgeführt und es ist davon auszugehen, dass eine erfolgreiche Magnetseparation mit dem Magnetseparationsmodul nicht durchführbar ist. Beim Waschen von Hand werden nicht die Magnetpartikel aus dem Reaktionsgefäß separiert, sondern der Überstand abgenommen. Die Magnetpartikel bleiben daher im Gefäß zurück. Bei der Separation mit dem Magnetseparationsmodul werden aber die Magnetpartikel aus der Lösung separiert. Bei einer geringen Ionenstärke des Puffers tendieren die Partikel dazu, aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte an die Titerplatte zu adsorbieren, was die folgende Magnetseparation erschwert oder ganz verhindert. Die Zugabe von tRNA als Blocksubstanz zur Reduktion unspezifischer Bindungen zwischen Magnetpartikeln mit Goldpartikeln reduziert das falsch-positive PCR-Signal kaum.

Vergleich kommerzieller tosylfunktionalisierter Magnetpartikel mit PVAc-Magnetpartikeln

Bei den in der Literatur im Biobarcode-Assay eingesetzten Magnetpartikeln handelte es sich überwiegend um kommerzielle tosylfunktionalisierte Magnetpartikel der Firma

Invitrogen. Bei dem im Folgenden beschriebenen Experiment wurden daher diese Partikel mit den bisher eingesetzten PVAc-Partikeln verglichen. Die MP sowie die Goldpartikel wurden mit polyklonalem Antikörper gegen PSA funktionalisiert (R&D Systems). Polyklonale Antikörper erkennen unterschiedliche Epitope desselben Antigens und können daher im Biobarcode-Assay eingesetzt werden. Die MP wurden nach Funktionalisierung mit unspezifischer DNA geblockt. Es wurden pro Probe 200 µg MP eingesetzt. Je vier Proben wurden mit Antigen (zwei mit 0,4 µg/mL und zwei mit 400 µg/mL PSA (Sigma)) für 30 min bei 37°C inkubiert, je zwei weitere ohne Antigen (Kontrollen). Danach wurden die Partikel zwei Mal gewaschen und mit den Goldpartikeln inkubiert (30 min, 37°C). Daraufhin wurden alle Proben sieben Mal gewaschen und in 50 µL Wasser suspendiert. Die Proben wurden erhitzt, die Magnetpartikel abgetrennt und mit dem Überstand wurde eine PCR durchgeführt. Proben mit Antigen sollten im Gel ein PCR-Produkt zeigen, Proben ohne Antigen sollten kein PCR-Produkt zeigen.

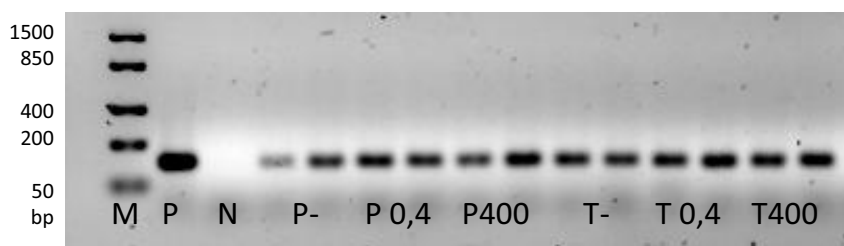


Abbildung 32: Vergleich von kommerziellen tosylfunktionalisierten Partikeln mit PVAc-Partikeln. N: PCR-Negativkontrolle, P: PCR-Positivkontrolle, P-/T-: PVAc- / Tosyl-Partikel ohne Antigen, P 0,4/T 0,4: PVAc-/ Tosyl-Partikel mit 0,4 µg/mL PSA, P400 / T400: PVAc-/ Tosyl-Partikel mit 400 µg/mL PSA.

Auch in diesem Gel (Abbildung 32) ist, wie in den zuvor aufgeführten Versuchen, kein eindeutiger Unterschied zwischen den PCR-Produkten der Proben mit und ohne Antigen zu erkennen. Tosylfunktionalisierte Partikel binden, ebenso wie PVAc-Partikel, die mit Barcode-DNA funktionalisierten Goldpartikel und verursachen ein falsch-positives PCR-Signal (T- und P-). Die unspezifische Bindung der Goldpartikel an die Magnetpartikel ist im Falle der kommerziellen Tosylpartikel eventuell sogar stärker ausgeprägt. Die im Gel zu sehenden Banden erscheinen dunkler (mehr PCR-Produkt) als die Banden der Proben mit PVAc-Partikeln.

Einfluss des Einsatzes unterschiedlicher Magnetpartikelmengen auf das unspezifische PCR-Signal

In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Mengen an MP (40 µg, 20 µg und 4 µg PVAc-Partikel mit PSA10-Antikörper) eingesetzt. Die Partikel wurden über Nacht mit unspezifischer DNA geblockt, um unerwünschte Wechselwirkungen mit den Goldpartikeln zu reduzieren. Es wurde das Antigen PSA bzw. BSA als Kontrollprotein eingesetzt. Bei den Goldpartikeln handelte es sich um 30 nm Au-NP mit anti-PSA66 Antikörper. Alle Ansätze wurden doppelt durchgeführt. Nach jedem Waschschrift (nach erfolgter Inkubation mit den Goldpartikeln) wurden die Proben jeweils zwei min mit Ultraschall behandelt. Die Probenzusammensetzungen sind im tabellarischen Teil von Abbildung 33 aufgelistet.

Position	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13	14
MP	4 µg	40 µg	20 µg	20 µg	40 µg	4 µg	-	-
Probe	200 ng PSA	200 ng PSA	20 ng PSA	20 ng BSA (Kontrolle)	200 ng BSA (Kontrolle)	200 ng BSA (Kontrolle)	N	P

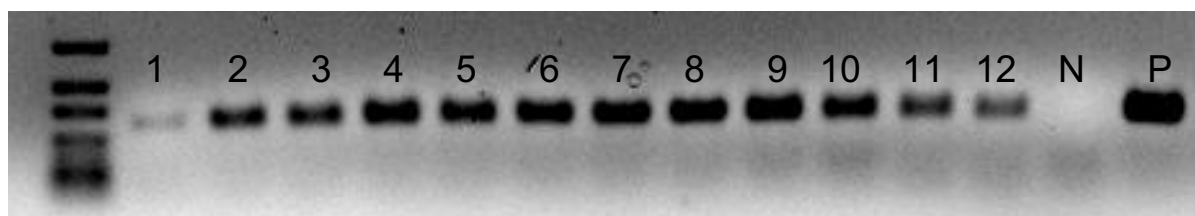


Abbildung 33: Untersuchung des Einflusses der MP-Menge. 1-6: Proben mit Antigen, 7-12: Kontrollen, N: PCR-Negativkontrolle, P: PCR-Positivkontrolle

Zwischen den Intensitäten der Banden mit und ohne Antigen sind kaum Unterschiede zu erkennen (Abbildung 33). Selbst die geringste eingesetzte Menge an Magnetpartikeln verursacht noch ein falsch-positives PCR-Signal (11 und 12). In dieser Probe war jedoch eindeutig weniger Barcode-DNA vorhanden als in den Proben mit 20 µg oder 40 µg MP. Im folgenden Versuch wurde daher eine noch geringere Menge an MP (2 µg) eingesetzt. Es wurden wieder zwei Proben mit Antigen (1 und 2 in Abbildung 34) und zwei Proben mit dem Kontrollprotein (3 und 4) inkubiert.



Abbildung 34: Versuch mit 2 μg PVAc-PSA10-Partikeln. 1-2: Proben mit Antigen, 3-4: Kontrollen ohne Antigen, N: PCR-Negativkontrolle, P: PCR-Positivkontrolle

Die weiteren Versuchsbedingungen unterschieden sich nicht vom vorherigen Versuch. Auf dem Gel befanden sich noch weitere Proben, die hier nicht diskutiert werden. Aus diesem Grund wurden die Positiv- und Negativkontrolle, die sich am rechten Rand des Gels befanden, versetzt. Auch in diesem Gel ist zu erkennen, dass die Proben mit Antigen kein stärkeres, sondern vielmehr ein schwächeres PCR-Signal aufweisen als die Proben ohne Antigen. Für einen erfolgreichen Biobarcode-Assay ohne falsch-positive Ergebnisse ist die Reduktion der eingesetzten Partikelmenge folglich nicht der allein ausschlaggebende Faktor.

Quantifizierung der Barcode-DNA mittels Real-time PCR

Im folgenden Versuch wurden die im Biobarcode-Assay erhaltenen Proben mittels quantitativer Real-Time PCR amplifiziert. Proben, die mit dem Antigen PSA inkubiert wurden, sollten einen geringeren Ct-Wert (siehe 2.3.2.1) aufweisen als die Kontrollproben. Es wurden pro Ansatz 200 μg PVAc-Partikel eingesetzt, die zuvor mit monoklonalem Antikörper gegen PSA (Abcam) funktionalisiert und mit unspezifischer DNA geblockt wurden. Zwei der Proben (PVAc-PSA) wurden jeweils mit 50 pmol (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PSA inkubiert, die beiden weiteren Proben wurden ohne Antigen inkubiert (PVAc-O). Die Proben wurden gewaschen und daraufhin wurden mit anti-PSA (R&D Systems) funktionalisierte Goldpartikel zugegeben. Nach erneuter Inkubation und sieben Waschschritten wurden die Proben erhitzt, die Magnetpartikel separiert und ein Aliquot des Überstands wurde in der Real-Time PCR eingesetzt.

Wie in Abbildung 35 gezeigt, unterscheiden sich die Ct-Werte (fünfte Spalte) der Proben mit und ohne Antigen kaum, die Positivkontrolle dagegen zeigt bereits nach fünf

Amplifikationszyklen ein Fluoreszenzsignal, das Signal der Negativkontrolle konnte nicht detektiert werden.

Setup		Instrument		Results		
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	
A1	PVAc-PSA	Sybr Green Quantitect	Unknown	15.47	0.526	
A2	PVAc-PSA	Sybr Green Quantitect	Unknown	14.73	0.526	
A3	PVAc-O	Sybr Green Quantitect	Unknown	15.00	0.001	
A4	PVAc-O	Sybr Green Quantitect	Unknown	15.00	0.001	
A5	PK	Sybr Green Quantitect	Unknown	5.49		
A6	NK	Sybr Green Quantitect	NTC	Undet.		

Abbildung 35: Ergebnisse der Real-Time PCR von Proben des Biobarcode-Assays. PVAc-PSA: Proben mit PSA, PVAc-O: Proben ohne Antigen, PK: Positivkontrolle (Barcode-DNA), NK: Negativkontrolle (Wasser)

Positivkontrolle und Negativkontrolle zeigen, dass die Real-Time PCR im Prinzip erfolgreich war, alle Proben jedoch, unabhängig von der Präsenz des Antigens während des Biobarcode-Assays, dieselbe Ausgangsmenge an Barcode-DNA enthielten. Dieses Ergebnis bestätigt lediglich die Ergebnisse der klassischen PCR, nämlich dass die Goldnanopartikel ungeachtet der Präsenz des Antigens unspezifisch an die Magnetpartikel binden und ein falsch-positives PCR-Signal verursachen.

Solange die mit Antikörpern und Barcode-DNA funktionalisierten Goldpartikel unspezifisch an die Magnetpartikeloberfläche binden, ist ein erfolgreicher Biobarcode-Assay nicht etablierbar. Wie in Tabelle 5 aufgeführt, wurden unterschiedlichste Komponenten des Tests betrachtet und variiert, um geeignete Bedingungen für den Test zu finden. Vermutlich adsorbieren die Goldpartikel nicht nur auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften an die Magnetpartikel, sondern lagern sich zudem in Magnetpartikelagglomeraten ein. Bei jeder Magnetseparation formen die Partikel ein Pellet. Wenn das Pellet bei der folgenden Suspendierung im nächsten Waschschrift nicht vollständig wieder in Lösung geht, können in kleinen Agglomerationen eingeschlossene Goldpartikel nicht ausgewaschen werden und werden bei jeder Magnetseparation mit dem Magnetpartikelpellet verschleppt. Bei der Elution (Erhitzen auf 95°C) lösen sich die Agglomerate und die dabei frei werdenden Goldpartikel verursachen das falsch-positive PCR-Signal.

Verwendung von Ultraschall zur Unterstützung der Waschschrirte

Um diese physikalische Adsorption zu verhindern, wurden die Partikel nach jedem Waschschrirte mit Ultraschall behandelt. Ultraschall soll die Agglomerate lösen und so eine erfolgreiche Separation der Magnetpartikel von den Goldpartikeln gewährleisten. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse eines solchen Experiments gezeigt. Je zwei Proben Magnetpartikel (40 µg PVAc mit anti-CD54 Antikörper) wurden in 400 µL PBS pH 7,4 suspendiert und für 30 s gemischt. Die Proben 3 und 4 wurden für 30 s mit Ultraschall behandelt. Danach wurden jeweils 100 µL 30 nm Au-NP (0,5 pmol 120 bp Barcode-DNA pro Probe) ohne Antikörper zu allen Proben (1 – 4) gegeben. Die Suspensionen wurden wieder für 30 s gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Magnetpartikel sieben Mal mit Waschpuffer (400 µL 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9) gewaschen. Die Proben 3 und 4 wurden vor jeder Magnetseparation für 30 s mit Ultraschall behandelt, um Partikelagglomerate zu lösen. Zum Schluss wurden die Proben in 50 µL H₂O aufgenommen, für 5 min auf 95°C erhitzt und mit dem Überstand wurde eine PCR durchgeführt. Auch bei diesem Versuch sollte kein PCR-Produkt im Gel zu sehen sein, da kein Zielprotein zugegeben wurde. Zudem waren die Goldpartikel nur mit Barcode-DNA, jedoch nicht mit Detektions-Antikörpern funktionalisiert.

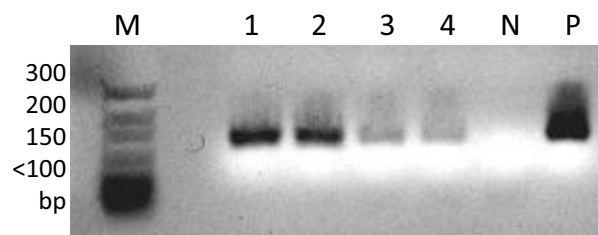


Abbildung 36: Auswirkung von Ultraschallbehandlung auf unspezifische Bindungen. Marker (M), Proben ohne Ultraschall-Behandlung (1 und 2), Proben mit Ultraschallbehandlung (3 und 4), Negativkontrolle (N), Positivkontrolle (P)

Die Banden der Proben 1 und 2 sind deutlich stärker, was darauf hinweist, dass hier noch deutlich mehr Barcode-DNA in der Probe vorhanden war als bei den Proben 3 und 4, bei denen jeder Waschschrirte durch Ultraschall unterstützt wurde.

Die Behandlung der Proben mit Ultraschall bei jedem Waschschrift führte zwar zu einer Reduktion des unspezifischen PCR-Signals, jedoch wird auch das erwünschte PCR-Signal geschwächt, wie in Abbildung 37 zu sehen.

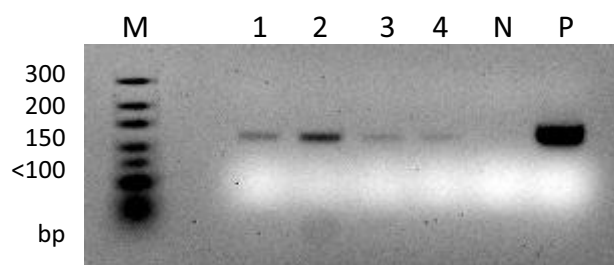


Abbildung 37: Detektion von PSA mit dem Biobarcode-Verfahren. Marker (M), Proben mit PSA (1 und 2), Proben ohne PSA (3 und 4), Negativkontrolle (N), Positivkontrolle (P)

Hier wurden jeweils 4 μg mit PSA-Fangantikörpern konjugierte PVAc-Partikel über Nacht mit unspezifischer DNA geblockt. Danach wurden zu zwei Proben (1 und 2) 200 ng PSA (Zielprotein, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. 200 ng Rinderserumalbumin (BSA, 3 und 4) als Kontrollprotein gegeben. Nach Inkubation wurden die Partikel magnetisch separiert und gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 30 nm Au-NP mit PSA-Detektionsantikörper und Barcode-DNA (0,5 pmol pro Probe). Nach erneuter Inkubation wurden die Partikel wieder gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Partikel 2 min mit Ultraschall behandelt. Die Barcode-DNA wurde separiert (10 min, 95°C) und eine PCR wurde durchgeführt. Die Proben mit dem Zielprotein PSA sollten eine deutliche Bande im Gel hervorrufen, bei Proben mit Kontrollprotein dagegen sollte keine Bande sichtbar sein. Wie hier zu sehen ist, konnte das unspezifische Hintergrundsignal (Banden bei den Proben 3 und 4) nicht vollständig beseitigt werden. Es ist zwar ein Unterschied zwischen den Proben mit Antigen und denen mit Kontrollprotein sichtbar, aber die Intensitäten entsprechen nicht den Anforderungen eines klaren Testergebnisses.

4.1.5 Nachweis von PSA durch SDS-PAGE und Western Blot

Zur Überprüfung der Funktionalität der Antikörper gegen PSA (Kat. Nr. ab403, Abcam und Kat. Nr. AF1344, R&D Systems) wurde eine SDS-PAGE mit jeweils 250 ng PSA (29 kDa) je Bahn und eine weitere SDS-PAGE mit jeweils 40 ng PSA (Kat. Nr. P3235, Sigma-Aldrich) je Bahn durchgeführt. Ein SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt, das andere wurde für den

Nachweis von PSA mittels Western Blot eingesetzt. Die Detektion mittels Western Blot erfolgte mit monoklonalem Maus- (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam) und polyklonalem Ziegen-Antikörper (0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, R&D) gegen PSA. Die sekundären Antikörper (anti-Maus und anti-Ziege, jeweils mit Meerrettich-Peroxidase markiert) wurden jeweils 1:2000 verdünnt.

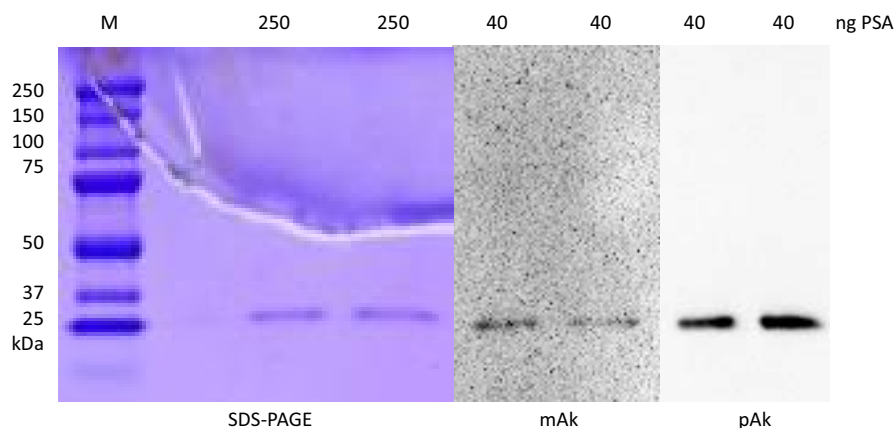


Abbildung 38: SDS-PAGE und Western Blot von PSA (mAk und pAk)

Abbildung 38 zeigt das gefärbte SDS-Gel (links im Bild) mit den Banden von PSA, wie erwartet, bei etwa 30 kDa. Die Aufnahmen des Western Blots zeigen, dass beide Antikörper spezifisch an PSA binden und durch die Enzymreaktion des Sekundärantikörpers nachgewiesen werden können. Es ist eine relativ hohe Konzentration an monoklonalem (mAk, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und eine nur geringe Konzentration an polyklonalem (pAk, 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Antikörper notwendig, um PSA mittels Western Blot nachzuweisen.

4.1.5.1 Überprüfung der Bindungsspezifität von PSA an mit Anti-PSA- Antikörpern funktionalisierte PVAc-Magnetpartikel mittels Immunpräzipitation

Dass Antikörper Proteine im Western Blot nachweisen können, liefert keine Garantie dafür, dass die Antikörper das jeweilige Protein auch im nativen Zustand erkennen. Proteine, die per SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden, liegen in denaturiertem Zustand vor. Ob Antikörper ihre jeweiligen Antigene auch in nativem Zustand erkennen, lässt sich mittels Immunpräzipitation feststellen. Hierbei werden Partikel mit beispielsweise monoklonalen Fang-Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein versehen und mit dem Protein inkubiert. Nach einigen Wachschritten werden die

Partikel mit dem gebundenen Zielprotein in Lämmli-Puffer aufgenommen und es werden eine SDS-PAGE (siehe 0) und ein Western Blot mit einem (anderen) Detektions-Antikörper, der gegen dasselbe Protein gerichtet ist, durchgeführt. Der am Partikel gebundene Antikörper bindet das Zielprotein in Lösung, also im nativen Zustand. Durch den Western Blot wird daher überprüft, ob der am Partikel gebundene Antikörper das native Protein auch tatsächlich erkennt. Durch Umkehrung der Antikörper (zweiter Antikörper am Partikel, Nachweis des Proteins mit mAk im Western Blot) kann überprüft werden, ob auch der zweite Antikörper das Protein im nativen Zustand erkennt.

PVAc-Partikel wurden mit monoklonalen Fangantikörpern gegen PSA (Probe „P“, anti-PSA10) und unspezifischen Kontrollantikörpern (K, anti-CD54) funktionalisiert. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um monoklonale Maus-Antikörper. Je 0,1 mg Magnetpartikel wurden mit je 4 μg PSA für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Magnetpartikel fünfmal mit PBST gewaschen und beim letzten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß gewechselt, um zu vermeiden, dass evtl. an der Gefäßwand haftendes PSA die Ergebnisse verfälscht. Die Partikel wurden in 20 μL 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C erhitzt. Je 10 μL Probe wurden danach auf ein SDS-Gel (15%) aufgetragen. Die Immunpräzipitation wurde in doppeltem Ansatz durchgeführt.

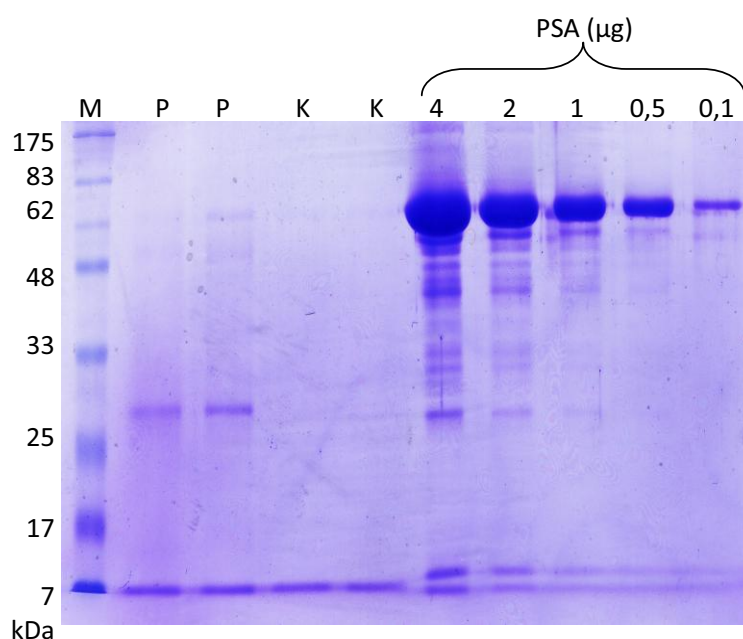


Abbildung 39: Immunpräzipitation zur Detektion von PSA mit magnetischen PVAc-Partikeln

Beide Proben mit anti-PSA Antikörper (P) zeigen Banden bei etwa 30 kDa (siehe Abbildung 39). Dies entspricht in etwa dem Molekulargewicht von PSA (29 kDa). Diese Banden sind in den Bahnen der Kontrolle mit unspezifischem Antikörper (K) nicht sichtbar. Das Gel suggeriert also eine erfolgreiche Immunpräzipitation von PSA. In den fünf Bahnen rechts im Gel wurden unterschiedliche Mengen an PSA aufgetragen. PSA wurde freundlicherweise von Dr. P. Miethe (Senova GmbH, Jena) zur Verfügung gestellt. Anhand der Protein-Banden ist zu erkennen, dass dieses Protein nicht in reiner Form vorliegt. Eine Bande bei etwa 30 kDa ist zur erkennen, aber die dominierende Bande liegt bei etwa 60 kDa. Dies könnte ein PSA-Dimer sein oder auch ein Komplex aus PSA und einem weiteren Protein oder die Bande könnte auf stabilisierende Proteine wie BSA (66 kDa) zurück zu führen sein. PSA liegt häufig als Komplex mit Chymotrypsin oder Makroglobulinen vor.

Ein Western Blot, in dem jeweils 20 µg PSA per Bahn aufgetragen wurden, zeigt dass sowohl der polyklonale (R&D Systems) als auch beide monoklonalen Antikörper gegen PSA (anti-PSA10 und anti-PSA66) das zur Verfügung gestellte PSA (Senova GmbH) zumindest im denaturierten Zustand erkennen.

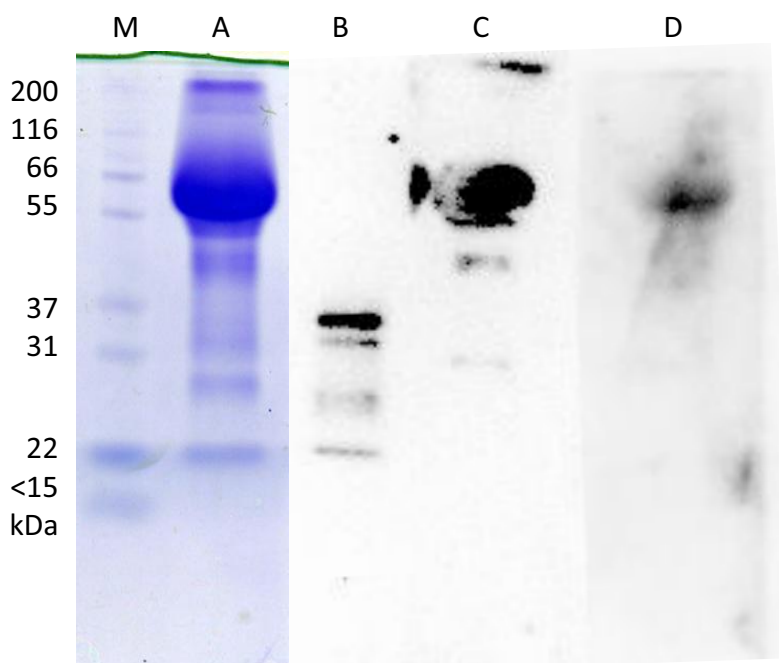


Abbildung 40: Western Blot von PSA, je 20 µg. SDS-PAGE (A), Blot mit verschiedenen Detektionsantikörper (B: pAk, C: mAk (Fangantikörper anti-PSA10), D: mAk Detektionsantikörper anti-PSA66)

Das hier verwendete PSA soll nach Aussage des Herstellers gut mit den beiden monoklonalen Antikörpern PSA10 und PSA66 der Firma Fijirebio Diagnostics (C und B in Abbildung 40) nachzuweisen sein. Im Biobarcode-Assay wurde der Antikörper anti-PSA10 als Fangantikörper am Magnetpartikel gebunden und der Antikörper anti-PSA66 als Detektionsantikörper an den Goldnanopartikeln immobilisiert eingesetzt. Der Blot zeigt, dass beide Antikörper hauptsächlich die komplexierte Form von PSA binden. Von dem polyklonalen Antikörper wird allerdings nur die nicht komplexierte Form von PSA (Banden bei geringerem Molekulargewicht) erkannt. Der Antikörper anti-PSA10, der als Fangantikörper fungiert, kann daher in Kombination mit dem polyklonalen Antikörper als Detektionsantikörper nicht eingesetzt werden. Die im Biobarcode-Assay verwendeten Antikörper-Kombinationen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Eine Ausnahme stellen Kontrollexperimente dar, in denen „unspezifische“ Antikörper (z.B. anti-CD54) verwendet wurden, um die Auswirkung verschiedener Parameter auf die unspezifische Bindung der Barcode-DNA und Goldpartikel an Magnetpartikel zu überprüfen. Ziel dieser Experimente war lediglich die Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Reaktionspartnern. Bei diesen Kontrollexperimenten war das Zielprotein des Antikörpers nicht von Bedeutung. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde daher ein günstigerer Antikörper anstelle der PSA-Antikörper genutzt.

Tabelle 6: Im Biobarcode-Verfahren verwendete Antikörperpaare mit jeweiligem Antigen

Fangantikörper gebunden am Magnetpartikel	Antigen	Detektionsantikörper gebunden am Goldpartikel
PSA1 (Abcam) (Monoklonaler PSA-Antikörper)	PSA (Sigma-Aldrich)	Anti-KLK3 (R&D Systems) (Polyklonaler PSA-Antikörper)
Anti-KLK3 (R&D Systems) (Polyklonaler PSA-Antikörper)	PSA (Sigma-Aldrich)	Anti-KLK3 (R&D Systems) (Polyklonaler PSA-Antikörper)
PSA10 (Fujirebio Diagnostics) (Monoklonaler PSA-Antikörper)	PSA (Senova)	PSA66 (Fujirebio Diagnostics) (Monoklonaler PSA-Antikörper)

4.1.6 Resümee zum Biobarcode-Assay und Vergleich mit Literaturergebnissen

Der Biobarcode-Assay wurde von Nam *et. al.* 2003 das erste Mal in der Literatur beschrieben [75]. 2006 patentierte das Unternehmen Nanosphere, Inc. in Illinois, USA die Methode. Seitdem wurde dieser Test viele Male in der Literatur beschrieben. Tabelle 7 und Tabelle 8 fassen die Versuchsbedingungen, die in ausgewählten Publikationen angewandt wurden, zusammen. Bei dem Test werden je nach Literaturquelle zwischen 0,5 µg Magnetpartikel und 200 µg Magnetpartikel pro Probe eingesetzt. Zwischen 7,5 fmol und 170 fmol Au-NP werden zur Detektion des Proteins zugegeben, wobei die Anzahl an Barcode-DNA Molekülen und Antikörpern pro Goldpartikel, die bei der Konjugation der Goldpartikel eingesetzt wurden, von Publikation zu Publikation variiert. Allerdings entspricht die eingesetzte Anzahl an DNA- und Antikörpermolekülen nicht der tatsächlich am Au-NP gebundenen Anzahl. Die Goldpartikel werden nach erfolgter Konjugation mehrmals zentrifugiert und gewaschen. Überschüssige Barcode-DNA und Antikörper werden so entfernt. Eine 2009 veröffentlichte Publikation erwähnt im Zusatzmaterial (Supporting Info) die Verwendung von Polyacrylsäure bei den Waschsritten im Biobarcode-Assay zur Reduktion unspezifischer Bindungen zwischen Goldpartikeln und Magnetpartikeln. Das Reagenz soll elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und damit unspezifische Interaktionen zwischen Gold- und Magnetpartikel verhindern [66]. Bei dem Versuch, den Biobarcode-Assay im Hause zu etablieren, wurden unter anderem auch Magnetpartikel mit kovalent an der Oberfläche gebundener Polyacrylsäure eingesetzt. Allerdings zeigten auch diese Partikel in dieser Arbeit kein vermindertes unspezifisches Hintergrundsignal (PCR-Produkt).

Tabelle 7: Vergleich der experimentellen Bedingungen beim Biobarcode-Assay aus ausgewählten Publikationen (1)

Arbeitsschritt	Nam <i>et al.</i> 2003 [75]	Bao <i>et al.</i> 2006 [83]	Stoeva <i>et al.</i> 2006 [69]
Magnetpartikel	1 µm MP, aminofunktionalisiert (Polysciences)	MP (Dynal Inc.) k.A.	1 µm MP tosyfunktionalisiert (Invitrogen)
Kopplung des Zielproteins an Magnetpartikel (MP)	150 µg MP (50 µL) und 10 µL Probe in 0,1 M PBS, pH 7,4	0,5 µg MP (250 µL) und 30 µL Probe in PBS mit 0,1% BSA, 0,025% Tween20, pH 7,2	0,5 µg MP (40 µL) und 10 µL Probe in 150 µL PBS mit 0,1% BSA, 0,025% Tween20, pH 7,2
Waschen	3 x mit 50 µL PBS (s.o.)	1 x mit 200 µL PBS (s.o.)	2 x mit PBS (s.o.)
Zugabe der Au-NP	50 µL 13 nm Au-NP (50 fmol) oder 50 µL 30 nm Au-NP (10 fmol)	Suspension in 50 µL PBS (s.o.) mit 330 µg tRNA, Zugabe von Au-NP (170 fmol)	50 µL Au-NP (12 fmol) mit 330 µg tRNA
Anzahl an Barcode-DNA-Molekülen und Antikörper-Molekülen pro Au-NP	58 DNA-Moleküle 4 Ak (13 nm Au-NP) 4357 DNA-Moleküle 9 Ak (30 nm Au-NP)	0,3 DNA-Moleküle (Antikörper: k.A.)	180 DNA-Moleküle 42 Ak (30 nm Au-NP)
Waschen	5 x mit PBS (s.o.)	8 x mit PBS (s.o.)	7 x mit PBS (s.o.)
Detektionsmethode	PCR und scanometrisch	scanometrisch	scanometrisch

Tabelle 8: Vergleich der experimentellen Bedingungen beim Biobarcode-Assay aus ausgewählten Publikationen (2)

Arbeitsschritt	Hill <i>et al.</i> 2006 [71]	Thaxton <i>et al.</i> 2009 [66]	in dieser Arbeit
Magnetpartikel	2,7 µm MP (M-270) tosyfunktionalisiert (Invitrogen)	1 µm MP tosyfunktionalisiert (Invitrogen)	1 µm MP tosyfunktionalisiert (Invitrogen und eigene), PVAc-NH ₂ , M-PVA (Chemagen), etc.
Kopplung des Zielproteins an Magnetpartikel (MP)	200 µg MP und 10 µL Probe in 200 µL PBS mit 0,1% BSA, 0,025% Tween20, pH 7,4	1,5 µg MP und 30 µL Probe in 100 µL PBS mit 0,1% BSA, 0,025% Tween20, 1% Polyacrylsäure, pH 7,4	4 µg MP und 50 µL Probe in 100 µL PBS, 0,05% Tween20, 0,1% BSA, pH 7,4
Waschen	2 x mit PBS (s.o.)	1 x mit PBS (s.o.)	1 x mit PBS (s.o.)
Zugabe der Au-NP	2 µL Au-NP (20 fmol) mit 330 µg tRNA in 50 µL PBS (s.o.)	50 µL Au-NP (7,5 fmol) in PBS (s.o.)	50 µL Au-NP in PBS (s.o.) mit 17 fmol 15 nm Au-NP oder 2,4 fmol 30 nm Au-NP
Anzahl Barcode-DNA-Moleküle und Antikörper-Moleküle pro Au-NP	300 DNA-Moleküle (Antikörper: k.A.)	9,1x10 ⁶ DNA-Moleküle 70 Ak (30 nm Au-NP)	100 DNA-Moleküle 18 Ak (15 nm Au-NP) 100 DNA-Moleküle 84 Ak (30 nm Au-NP)
Waschen	7 x mit PBS (s.o.)	6 x mit PBS (s.o.)	7 x mit PBS (s.o.)
Detektionsmethode	scanometrisch	scanometrisch	PCR

Nach theoretischen Berechnungen können auf einem 15 nm Au-NP nur 7 Antikörper-Moleküle immobilisiert werden (30 auf einem 30 nm Partikel). Mit 7 Antikörper-Molekülen ist die Oberfläche des Nanopartikels so dicht bepackt, dass keine DNA-Moleküle mehr Platz finden. Ohne Antikörper könnten bis zu 90 (15 nm Au-NP) oder 270 (30 nm Au-NP) DNA-Moleküle auf einem Au-NP immobilisiert werden. Diese Berechnungen stimmen auch mit experimentellen Ergebnissen aus der Literatur überein [84]. Sowohl die Kopplungsvolumina bei den einzelnen Arbeitsschritten als auch die Volumina bei den Waschschrritten variieren zwischen den einzelnen Publikationen. Es wurden meist, wie auch unter anderem in dieser Arbeit, tosylfunktionalisierte Magnetpartikel von Dynal Inc. (später Invitrogen Inc.) genutzt. Die Nachweismethode ist meist scanometrischer Natur. Das heißt, sie beinhaltet die Herstellung eines planaren DNA-Arrays, auf dem komplementäre Sequenzen zur Barcode-DNA immobilisiert wurden und die Detektion der Barcode-DNA durch Silberverstärkung (siehe 2.3.2.2). Auch ein Vergleich der eingesetzten Partikelmasse und der Anzahl an Goldpartikeln pro Probe variiert von Publikation zu Publikation. Hill *et. al* setzen beispielsweise 200 µg Partikel ein und verwenden zur Detektion 20 fmol Au-NP. Stoeva *et al.* verwenden zwar die gleichen Magnetpartikel, jedoch nur 0,5 µg (Faktor 400 weniger), setzen aber eine ähnliche Anzahl (12 fmol) Au-NP zur Detektion ein.

Trotz umfangreicher Optimierungs- und Validierungsversuche konnte in dieser Arbeit der Biobarcode-Assay nicht reproduzierbar und mit ausreichender Sensitivität etabliert werden. Etliche Versuche zur Überwindung der unspezifischen Anlagerung der Au-NP an die Magnetpartikel, die auch ohne Zielprotein zu einem falsch-positiven PCR-Signal führt, wurden unternommen. Einige dieser Ansätze reduzierten zwar das unspezifische PCR-Signal, jedoch konnte das Signal nicht vollständig beseitigt werden. Auch Versuche mit unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Zielprotein führten nicht zu den erwarteten unterschiedlichen Mengen an PCR-Produkt. Das gewünschte Ergebnis wäre ein mit zunehmender Menge des Zielproteins stärkeres PCR-Signal. Durch den Einsatz von Ultraschall während der Waschschrritte konnte das Antigen PSA letztendlich detektiert werden (siehe Abbildung 37), jedoch lieferte auch diese Verbesserung nicht die für eine Krankheitsdiagnose benötigte Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Durch weitere Optimierung der Versuchsparameter und mit dem Nachweis der Barcode-DNA durch

Silberverstärkung anstelle der Amplifikation mittels PCR sollte es möglich sein, das Verfahren zu etablieren. Für den Nachweis der Barcode-DNA durch Silberverstärkung müssten DNA-Arrays und weitere mit zur Barcode-DNA komplementären Sequenzen funktionalisierte Goldpartikel hergestellt werden (siehe 2.3.2.2). Im Prinzip sollte es aber auch möglich sein, unterschiedliche Barcode-DNA-Mengen mittels Real-Time PCR zu quantifizieren, obwohl diese Methode in dieser Arbeit nicht zum gewünschten Ergebnis geführt hatte. Wie hier gezeigt, spielen nicht nur die Art der MP und deren Funktionalisierung, sondern auch die Magnetpartikelmenge, die Goldpartikelmenge, die Eigenschaften der Puffer und der Einsatz geeigneter Blockreagenzien eine Rolle bei der Etablierung des Biobarcode-Assays. Die Vielfalt der Stellgrößen in Kombination mit der extrem sensitiven und für falsch-positive Ergebnisse anfälligen Nachweismethode stellte bei der Etablierung des Biobarcode-Assays eine nicht zu überwindende Hürde dar. Aus diesen Gründen wurde ein alternatives Verfahren zur parallelen Quantifizierung von Proteinen entwickelt, das in Kooperation mit Dr. Huang von der University of California, San Diego realisiert werden konnte.

4.2 Teil II: Kodierte Mikropartikel für den parallelen Proteinnachweis

In diesem Teil der Arbeit wurden für den parallelen Nachweis von Proteinen mit Mikropartikeln anstelle des indirekten Nachweises über Barcode-DNA fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Detektion eingesetzt. Um unterscheidbare Partikelpopulationen zu erhalten, müssen hierzu die Partikel zunächst mit Fluoreszenzfarbstoffen kodiert werden. Die kodierten Populationen werden daraufhin mit Antikörpern funktionalisiert und in einer hierzu entworfenen fluidischen Analysezelle mit mehreren Probenkammern immobilisiert. Die Inkubation mit Probenlösung und Detektionsantikörpern sowie sämtliche Waschschriffe erfolgen ebenfalls in Probenkammern. Zur Auswertung dient der Farbkode der Partikel (Art des gebundenen Antikörpers) und die Farbintensität des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers (Menge an vorhandenem Antigen). Im Folgenden werden die detaillierten Ergebnisse zu jedem der genannten Aspekte beschrieben und diskutiert sowie eine Demonstration des Verfahrens zum parallelen Nachweis verschiedener Krankheitsmarker präsentiert.

4.2.1 Kodierung von Mikropartikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die Ermittlung von geeigneten Kombinationen von Fluoreszenzintensitäten zur Kodierung der Magnetpartikel (MP) wurde zunächst die Intensität der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt. Hierzu wurden Partikel mit unterschiedlich vielen Fluoreszenzfarbstoffmolekülen jeweils eines Farbstoffs versehen und die mittlere Fluoreszenzintensität und Standardabweichung der einzelnen Partikel wurde bestimmt, wobei jeweils etwa 1000 Partikel betrachtet wurden. Für die Partikelkodierung wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488 (grün fluoreszierend) und Alexa 594 (gelb fluoreszierend) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 und Abbildung 42 dargestellt. Es wurden Bilder der Partikel in beiden Fluoreszenzkanälen aufgenommen und ausgewertet. Die jeweils blaue Datenreihe entspricht der Intensität des erwünschten Fluoreszenzsignals entsprechend dem verwendeten Farbstoff, die schwarze Datenreihe entspricht dem Hintergrundsignal im jeweils anderen Fluoreszenzkanal.

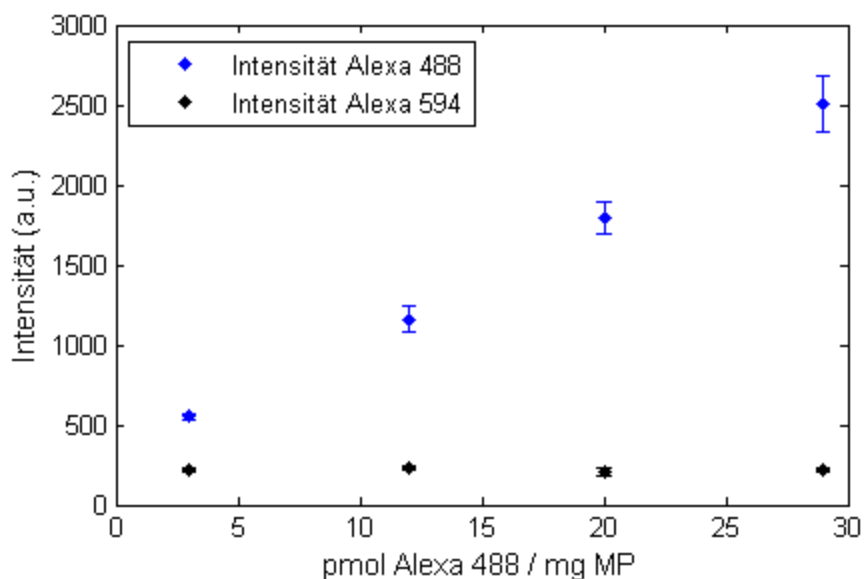


Abbildung 41: Fluoreszenzintensitäten der Mikropartikel in Abhängigkeit der Anzahl an gebundenen Alexa 488 Molekülen

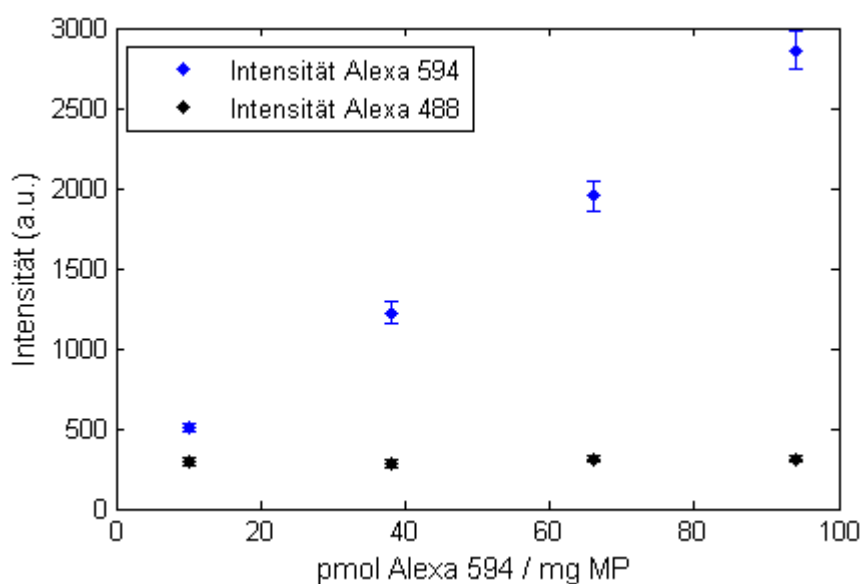


Abbildung 42: Fluoreszenzintensitäten der Mikropartikel in Abhängigkeit der Anzahl an gebundenen Alexa 594 Molekülen

Der Variationskoeffizient der Intensitäten (Standardabweichung / Mittelwert) bewegt sich für beide Farbstoffe zwischen 4% und 10%. Die Hintergrundfluoreszenz der Partikel im Alexa 488 Fluoreszenzkanal (grün) ist bei gleicher Belichtungszeit etwas höher als das Hintergrundsignal der Partikel im Fluoreszenzkanal für Alexa 594 (gelb), da die Mikropartikel im grünen Fluoreszenzbereich eine gewisse Autofluoreszenz aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die Einstellungen für die Bildaufnahme wurden so gewählt, dass die Fluoreszenz der Partikel mit der höchsten Anzahl an Fluorophormolekülen pro Partikel in

die Sättigungsbereich der Kamera eintritt. Hierfür wurden für die mit Alexa 488 versehenen Partikel eine Belichtungszeit von 200 ms und für die mit Alexa 594 versehenen Partikel 100 ms gewählt.

Auf Grund dieser Daten wurden je drei Intensitätsniveaus der beiden Farbstoffe so kombiniert, dass fünf voneinander unterscheidbare Partikelpopulationen entstanden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Kodierung von fünf Partikelpopulationen

Population	P1	P2	P3	P4	P5
Alexa 488 (pmol/mg Partikel)	9	9	25	58	58
Alexa 594 (pmol/mg Partikel)	7	74	30	7	74

Die Fluorophore beanspruchen zwischen 0,6% und 5,3% der Biotinbindungsstellen auf jedem Mikropartikel. In Abbildung 43 sind die Fluoreszenzintensitäten der fünf Partikelpopulationen in beiden Fluoreszenzkanälen dargestellt. Jede Farbe im Diagramm repräsentiert dabei eine Population aus etwa 1000 Mikropartikeln, jeder Datenpunkt repräsentiert die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Partikels. Die Partikel, deren Fluoreszenzintensitäten sich innerhalb einer Standardabweichung des Mittelwertes einer Population befinden, sind jeweils in Schwarz dargestellt. Experimentell wurde hier pro Fluidkanal nur eine Population kodierter Partikel immobilisiert. So konnten die Standardabweichungen der Intensitätsniveaus in beiden Fluoreszenzkanälen innerhalb einer Population untersucht werden. In Abbildung 43 sind zudem Falschfarbenbilder einzelner Partikel aus je einer Population mit unterschiedlich vielen gebundenen Fluoreszenzmolekülen dargestellt. Die EMCCD-Kamera nimmt nur schwarz-weiß Bilder auf. Die Bilder der Einzelpartikel wurden zur besseren Veranschaulichung gefärbt. Aus der oberen Reihe der Abbildung ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der an das Partikel gekoppelten Fluorophore steigt. Durch Vergleich der Exemplare mit der gleichen Anzahl an Fluorophoren pro Partikel in der unteren Reihe der Abbildung wird aber auch eine gewisse Abweichung in den Intensitätsniveaus innerhalb der gleichen

Partikelpopulation deutlich. Die Abweichung der Intensitäten verursacht die Streuung innerhalb einer kodierten Partikelpopulation.

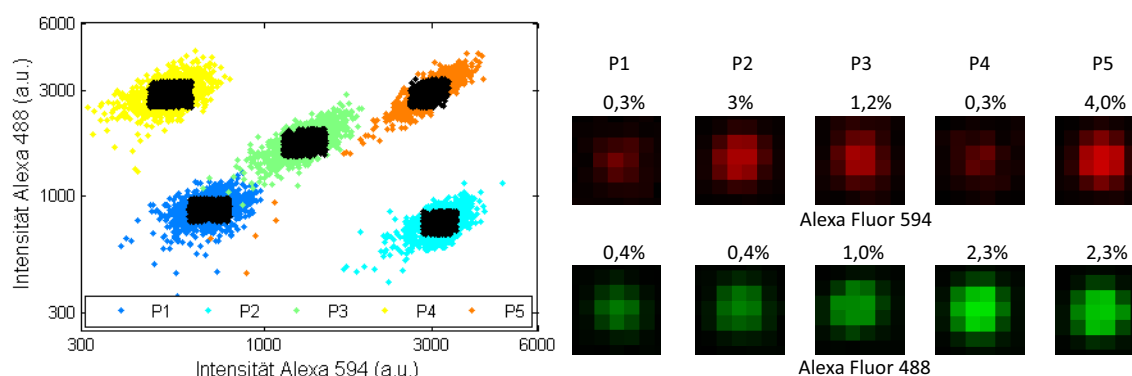


Abbildung 43: Kodierung von fünf Partikelpopulationen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und Alexa 594 (jede Farbe repräsentiert eine Partikelpopulation) und Falschfarbenbilder einzelner Partikel aus den fünf Partikelpopulationen

In einem weiteren Experiment wurden sieben Partikelpopulationen mit einer Kombination aus vier bzw. fünf Intensitätsniveaus der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 dotiert (siehe Tabelle 10). Die Fluorophore beanspruchten je nach Population zwischen 0,7% (S1) und 6,3% (S7) der Biotinbindungsstellen (siehe Abbildung 44). Die übrigen Bindungsstellen werden in späteren Experimenten von den monoklonalen Fangantikörpern besetzt.

Tabelle 10: Kodierung von sieben Partikelpopulationen

Population	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Alexa 488 (pmol/mg Partikel)	9	9	25	58	58	65	58
Alexa 594 (pmol/mg Partikel)	7	74	30	7	74	40	100

Wie in Abbildung 44 ersichtlich, ist die Streuung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Partikelpopulation recht groß. In Schwarz sind wieder die Partikel, deren Fluoreszenzintensitäten sich innerhalb einer Standardabweichung des Mittelwertes einer Population befinden, dargestellt und jede Farbe repräsentiert eine kodierte Partikelpopulation. Nichts desto trotz ist es möglich, die sieben Populationen voneinander zu unterscheiden, da sie (mit Ausnahme der Populationen S5 und S7) nicht überlappen.

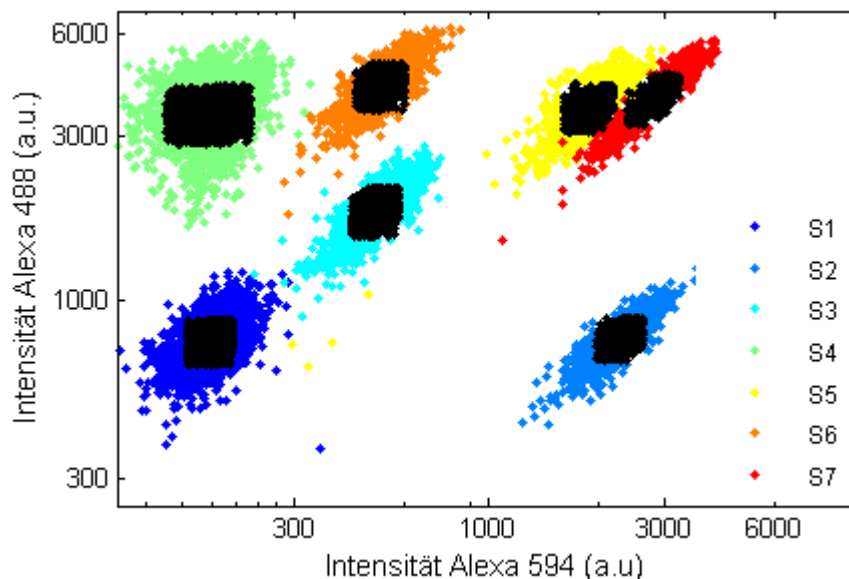


Abbildung 44: Kodierung von sieben Partikelpopulationen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und Alexa 594

Um zu zeigen, dass dieser Kodierungsprozess auch mit drei oder mehr Fluorophoren möglich ist, wurden Partikelpopulationen mit grün, gelb und rot fluoreszierenden Molekülen versehen. Durch Verwendung von drei Fluorophoren in drei Intensitätsniveaus, können 27 ($= 3^3$) unterscheidbare Partikelpopulationen kodiert werden. Jedes Mikropartikel wurde mit entweder 6.000, 20.000 oder 60.000 Fluorophor-Molekülen der drei Farbstoffe versehen. Die Intensitäten der 27 Partikelpopulationen in den drei Fluoreszenzkanälen sind in Abbildung 45 dargestellt.

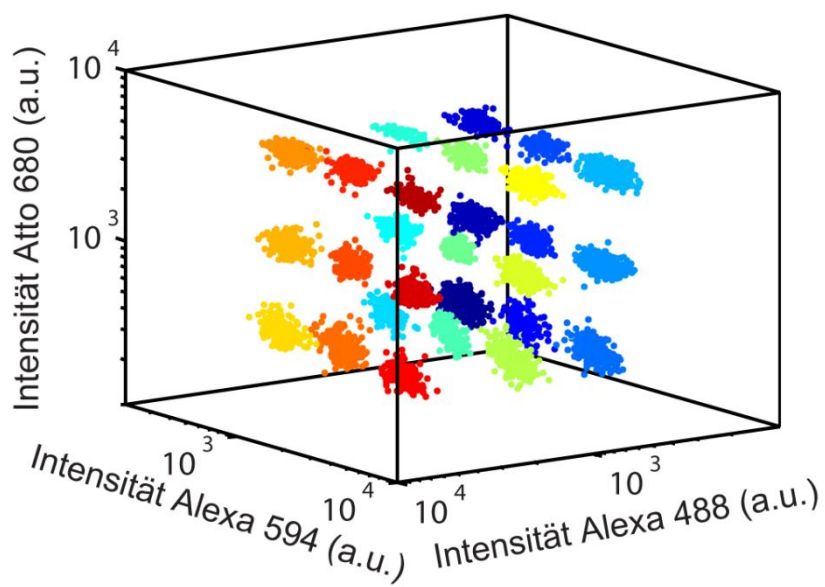


Abbildung 45: 3D-Darstellung von 27 kodierten Partikelpopulationen

Jede Farbe repräsentiert eine Partikelpopulation bestehend aus etwa 250 Mikropartikeln und jeder Farbpunkt repräsentiert je ein Mikropartikel. Ähnlichkeiten zwischen den Partikelpopulationen in der Farbgebung sind lediglich auf die in MATLAB genutzte Farbpalette zurückzuführen.

Eine übersichtlichere Darstellung der kodierten Partikel bietet Abbildung 46. Hier sind jeweils nur 2 Achsen dargestellt, links die x- und y-Achse aus der 3D-Abbildung und rechts die x- und z-Achse. Die Partikelpopulationen können eindeutig unterschieden werden und zeigen keine Überlappung.

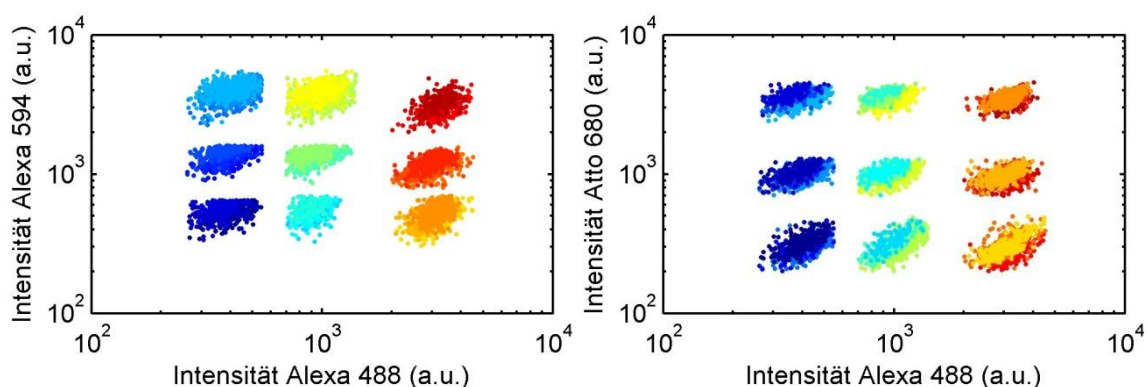


Abbildung 46: 2D-Darstellung von 27 Partikelpopulationen

Die Fluorophore nehmen zwischen 1,2% und 12% der Biotin-Bindungsstellen auf jedem Mikropartikel ein. Die verbleibenden Bindungsstellen können zur Kopplung biotinylierter Antikörper genutzt werden. Laut Hersteller kann ein einzelnes Mikropartikel bis zu 1,5 Millionen Biotin-Moleküle binden, aber nur etwa 90.000 Antikörper-Moleküle. Da maximal 12% (180.000 Moleküle, bzw. jeweils 60.000 Moleküle der drei Farbstoffe) der Bindungsstellen mit Fluorophoren besetzt sind, stehen theoretisch noch 1,32 Millionen Bindungsstellen zur Verfügung. Diese Anzahl ist mehr als ausreichend, um die maximale Anzahl (90.000) an biotinylierten Antikörpern an die bereits kodierten Mikropartikel zu binden.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass es möglich ist, superparamagnetische Mikropartikel mit einer Fluoreszenzfarbstoffkombination unterschiedlicher Wellenlänge so zu kodieren, dass verschiedene spektral unterscheidbare Populationen entstehen. Theoretisch ist die Anzahl der Partikelkodierungen $n = I^C$ durch die Anzahl der

Fluoreszenzfarbstoffe mit unterscheidbaren Emissionswellenlängen (C) und Intensitätsniveaus (I) bestimmt. In der Praxis jedoch hängt die Anzahl der unterscheidbaren Kodierungen davon ab, wie viele Intensitätsniveaus tatsächlich ohne Überlappung kodiert und auch wieder entschlüsselt werden können und von der Anzahl der Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der gegebenen Technik ohne oder mit akzeptabler Überschneidung in ihren Emissionsbereichen aufgelöst werden können. Dabei ist zu beachten, dass ein Spektralbereich für den Reporterfarbstoff (hier der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper) ausgespart werden muss. Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Systems besteht in der Entfernung der Kodierung nach der Entschlüsselung, um einer Überlappung der kodierenden Fluorophore mit dem Reporter-molekül vorzubeugen. Nach der Entschlüsselung der Partikel könnten die kodierenden Fluorophore durch Photozerstörung (photobleaching) entfernt werden, so dass bei der Quantifizierung des Immunassays nur noch die Signale des Reporterfarbstoffs gemessen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung mit Licht im UV-Wellenlängenbereich spaltbarer Fluorophore für die Kodierung oder die Verwendung chemisch spaltbarer Fluorophore, die nach der Entschlüsselung der Mikropartikel entfernt werden könnten.

4.2.2 Dekodierung der Mikropartikel

Zur Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Partikel unter Anregung mit verschiedenen Wellenlängen wurde ein Makro für die Software ImageJ [78] entwickelt. Das Makro ruft automatisiert Bilder der Fluoreszenzkanäle für die Partikelkodierung und für die Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins auf, identifiziert Partikel, zeichnet deren mittlere Intensität nach Anregung in den drei Fluoreszenzkanälen auf und speichert die Ergebnisse entsprechend. Im Folgenden wird an Hand von Beispielen dargestellt, wie die kodierten Partikel identifiziert und ausgewertet werden.

Der erste Bildbearbeitungsschritt besteht aus einer Korrektur der Helligkeit des Bildes. Die verwendete Lichtquelle sollte theoretisch eine gleichmäßige Intensität über das gesamte Sichtfeld bieten, Messungen zeigten aber, dass die Intensität praktisch je nach Position um bis zu 20% variiert. In Abbildung 47 (links) ist ein Falschfarbenbild der reinen

Glaserfläche des Fluidkanals gezeigt. Die Belichtungsintensität (Pixelwert) wurde zur besseren Darstellung in eine Farbskala übersetzt.

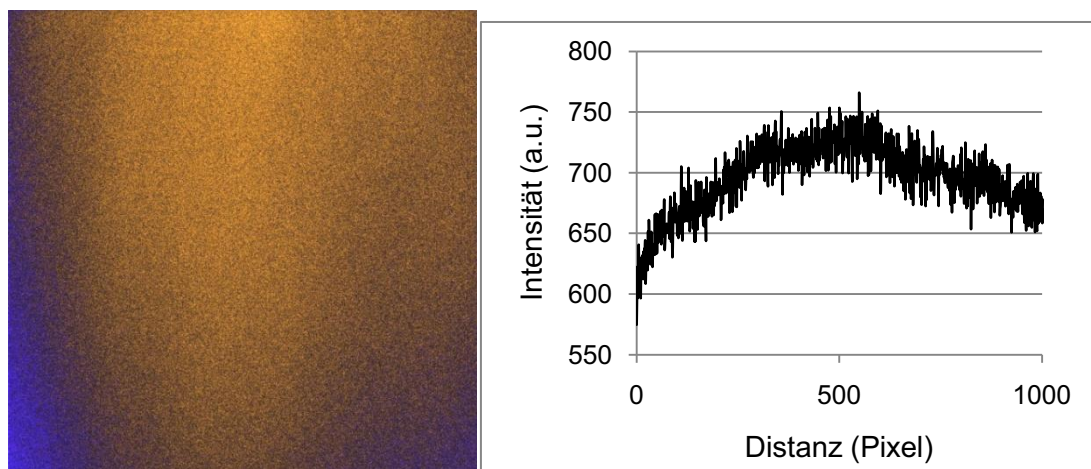


Abbildung 47: Falschfarbenbild eines Sichtfeldes (links) und Pixelwerte über die Breite im unteren Drittel des Bildes (rechts)

Eine unregelmäßige Belichtung führt dazu, dass Partikel, die einer geringeren Belichtung ausgesetzt sind, auch ein geringeres Fluoreszenzsignal abgeben als Partikel gleicher Kodierung, die einer stärkeren Belichtung ausgesetzt sind. Dies vergrößert die Standardabweichung der Messungen und führt dazu, dass Partikelpopulationen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten kodiert wurden, überlappen.

Ein in ImageJ vorinstallierter Algorithmus („rolling ball“) subtrahiert den Bildhintergrund. ImageJ kann hellere Objekte des Bildes (höhere Pixelwerte) vom Hintergrund (niedrige Pixelwerte) unterscheiden. Durch Vorgabe eines gewünschten Radius (hier der Partikelradius in Pixeln) werden Bildflächen, die ähnliche Pixelwerte auf Flächen, die größer als der vorgegebene Radius sind, aufweisen, von diesem Algorithmus subtrahiert. Beispielsweise werden bei Vorgabe eines Radius von 5 Pixeln solche Objekte, die im Intensitätsprofil (siehe Bilder unten, Abbildung 48) einen Peak mit einer Basis von 10 Pixeln im Durchmesser aufweisen, nicht subtrahiert.

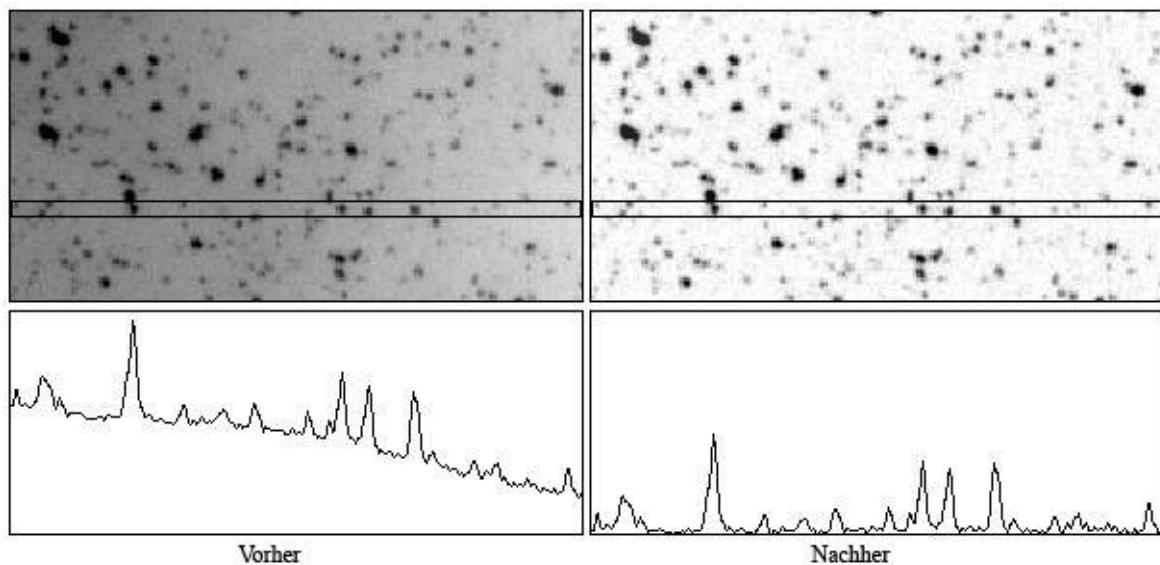


Abbildung 48: Bild vor und nach Subtraktion des Hintergrunds mit dem "rolling ball" Algorithmus [85]

Daraufhin wird das erhaltene Bild vom Originalbild abgezogen. Das dadurch entstehende Bild enthält nur die Pixelintensitäten des Hintergrunds. Dieses Bild wird daraufhin invertiert und zu dem Originalbild addiert. Eine geringe Hintergrundbeleuchtung wird durch die Bildinversion zu einer starken Hintergrundbeleuchtung und durch die Addition beider Bilder werden die Hintergrundintensität und damit auch die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Partikel über das Sichtfeld ausgeglichen. Diese Prozedur wird für die Bilder aller Fluoreszenzkanäle durchgeführt.

Für den parallelen Proteinnachweis wurden vier verschiedene Partikelpopulationen verwendet. Die Partikel der Population 1 zeigen in beiden kodierenden Kanälen nur eine geringe Fluoreszenz. Partikel der Population 2 zeigen eine hohe Fluoreszenz im gelben Fluoreszenzkanal und eine geringe im grünen, Partikel der Population 3 verhalten sich genau umgekehrt, die der Population 4 zeigen eine starke Fluoreszenz in beiden Fluoreszenzkanälen.

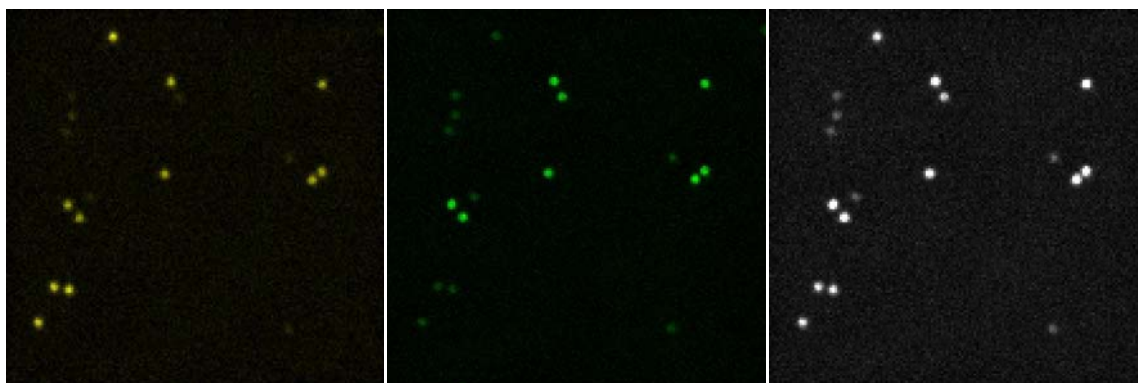


Abbildung 49: Bilder der kodierenden Fluoreszenzkanäle (links und Mitte) und addiertes Bild beider Kanäle (rechts)

Im nächsten Dekodierungsschritt des Makros werden die beiden Bilder der kodierenden Fluoreszenzkanäle addiert. In Abbildung 49 sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen in den beiden kodierenden Fluoreszenzkanälen, dargestellt. Das linke Bild zeigt die Partikel aus vier verschiedenen Populationen (Kodierungen) unter für Alexa Fluor 594 spezifischer Anregung (gelb gefärbt), das Bild in der Mitte zeigt dieselben Partikel unter für Alexa Fluor 488 spezifischer Anregung (grün gefärbt). Das rechte Bild entstand durch Addition der Pixelwerte beider Bilder. Der Sinn der Addition besteht darin, dass auch Partikel, die nur in einem der beiden Kanäle gut sichtbar sind (Populationen 2 und 3) in dem addierten Bild gut hervortreten (z.B. das Partikel in den Bildern links oben). Partikel, die im addierten Bild nur eine geringe Intensität aufweisen (niedrige Pixelwerte) gehören der Population 1 an (z.B. das Partikel in den Bildern rechts unten).

Im Folgenden wird mit Hilfe eines Schwellenwertfilters [79] eine Maske erstellt. In dieser Maske werden alle Pixel erfasst, die in ihrer Intensität (Pixelwert) einen gewissen Schwellwert überschreiten, in den Beispielbildern sind das die Populationen 2, 3 und 4. Hiernach wird eine Partikelgrößenanalyse durchgeführt, wobei alle Partikel, die größer und kleiner als ein durchschnittliches Einzelpartikel sind, entfernt werden. In Abbildung 50 sind Partikelmasken vor (links) und nach (Mitte) der Partikelgrößenanalyse gezeigt. Die Positionen der Masken entsprechen den Positionen der schon in Abbildung 49 dargestellten Partikeln. Die roten Pfeile zeigen auf Partikel, deren Fluoreszenzintensität zwar über dem Schwellwert liegt, doch entsprechen sie nicht der Größe eines Durchschnittspartikels. Prinzipiell wäre es möglich, das Partikeldoublet (unterer Pfeil), das im Beispiel durch die Größenanalyse entfernt wird, auszuwerten. Praktisch verfälscht aber

die Nähe der Partikel die mittleren Fluoreszenzintensitäten beider Partikel. Um die gesamte Fluoreszenzintensität der Partikel zu erfassen, wird in weiteren Bildbearbeitungsschritten das Zentrum jeder Partikelposition bestimmt und ein Kreis mit einem konstanten Radius um jedes Zentrum gebildet (Abbildung 50, Bild rechts). Partikel deren Radien sich hiernach überlappen werden aus der Maske entfernt, da sie zu nahe beieinander liegen (siehe Pfeil Bild Mitte). Hiermit sind die Positionen der Partikel erfasst, die in mindestens einem Fluoreszenzkanal eine hohe Intensität aufweisen und nicht zu nahe beieinander liegen.

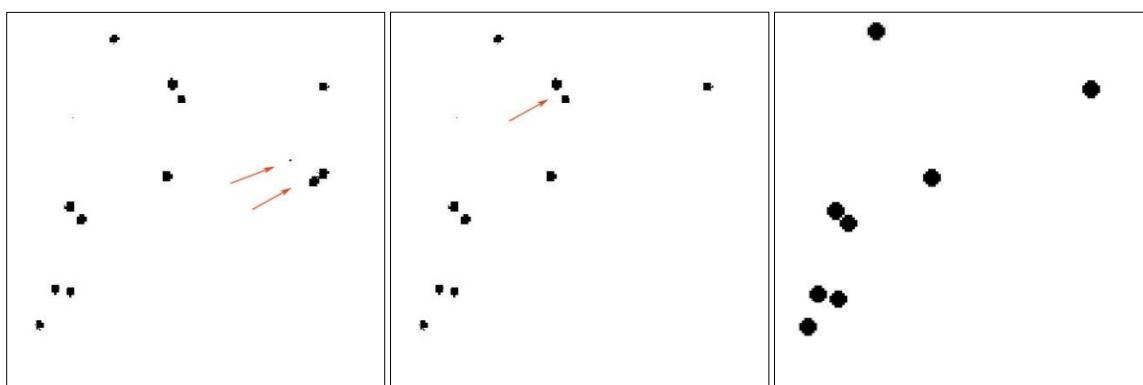


Abbildung 50: Partikelmaske (links), Partikel nach Größenanalyse (Mitte), Maske zur Analyse der Partikelpopulationen 2, 3 und 4 (rechts)

Um die Positionen der weniger fluoreszierenden Population 1 zu ermitteln, werden die Pixelwerte der Partikel in der eben erhaltenen Maske (Abbildung 50, Bild rechts) auf null gesetzt, allen anderen Pixeln wird der Wert eins zugewiesen. Durch Multiplikation dieses Bildes mit dem Originalbild werden alle schon erfassten Partikelpositionen ausgeblendet (linkes Bild in Abbildung 51) und es kann erneut ein Schwellwertfilter angewandt werden (Abbildung 51, Bild Mitte). Dieses Verfahren wird auch Iteratives Schwellwertverfahren [86] genannt.

In weiteren Schritten werden wieder Partikel, die zu nahe beinander liegen, Partikel deren Form gewissen Zirkularitätskriterien nicht entspricht und Partikelaggregate aus der Maske eliminiert. In einem letzten Schritt werden die Positionen der „hellen“ Partikel und die der „weniger hellen“ in einem Bild vereint (Abbildung 51, Bild rechts).

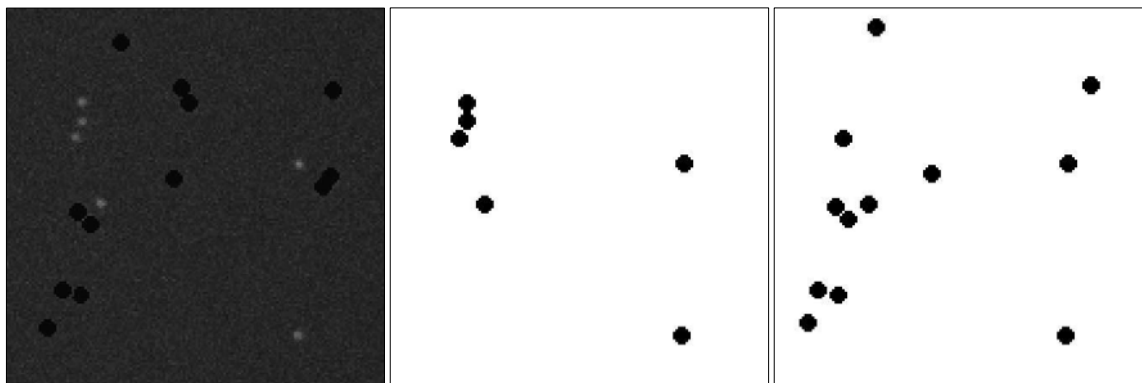


Abbildung 51: Originalbild nach Multiplikation mit der Partikelmaske der stark fluoreszierenden Partikel (links), Partikelmaske der Population 1 (Mitte), Maske zur Analyse aller Partikelpopulationen (rechts)

Ausgehend von dieser Positionsmaske werden die drei Fluoreszenzbilder analysiert. Die Maske selbst besteht nur aus Binärdaten. Bei der Analyse werden die Pixelintensitäten der Originalbilder der drei Fluoreszenzkanäle gemittelt, die je einer „schwarzen“ Fläche, also einem Partikel, in der Maske entsprechen. Durch die Auswertung der so erhaltenen Fluoreszenzintensitäten kann jedem einzelnen Partikel ein dreistelliger Kode zugeordnet werden. Zwei Ziffern des Kodes (Intensitäten der kodierenden Farbstoffe) dienen der Dekodierung der Partikelpopulation, die dritte Ziffer dient der Quantifizierung des Zielproteins (siehe auch 2.4).

Da während dieser Arbeit weit über tausend Fluoreszenzbilder mit mehreren hundert bis tausend Partikeln aufgenommen und ausgewertet wurden, konnte diese Datenmenge nicht mit Excel verarbeitet werden. Stattdessen wurden Datenimportfunktionen und automatisierte Prozeduren zur Berechnung von beispielsweise Standardabweichungen, zur graphischen Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Partikel und zur Quantifizierung der Proteine für das Programm MATLAB programmiert.

4.2.3 Funktionalisierung der Mikropartikel mit Antikörpern

4.2.3.1 Biotinylierung von Antikörpern

Die Effizienz der Biotinylierung hängt sowohl von der zu biotinylierenden Proteinkonzentration als auch vom verwendeten molaren Überschuss an NHS-Biotin ab (Biotinmoleküle pro Antikörpermolekül). Je höher die Proteinkonzentration, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das NHS-aktivierte Biotin mit dem Antikörper reagiert und

nicht durch Wassermoleküle hydrolysiert wird. Wünschenswert sind etwa 10 Biotinmoleküle pro Antikörpermolekül. Dieses Verhältnis erhält normalerweise die Funktionalität des Antikörpers und ermöglicht andererseits eine effektive Bindung des biotinylierten Antikörpers an die mit Streptavidin funktionalisierten Partikel und an die mit Streptavidin funktionalisierte Glasoberfläche.

Die für die partikelbasierten Immunnachweise verwendeten Fangantikörper für PSA, ErbB2 und CRISP3 wurden im Hause biotinyliert, der für TNF-alpha verwendete Antikörper wurde bereits biotinyliert gekauft. Bei allen Fangantikörpern handelte es sich um monoklonale in Maus-Zellkulturen hergestellte Antikörper („Maus-Antikörper“). Zur Überprüfung der Biotinylierung wurden die biotinylierten Antikörper auf Partikeln immobilisiert und ein sekundärer Alexa Fluor 680 markierter anti-Maus Antikörper wurde zugegeben, der an den immobilisierten Maus-Antikörper bindet. Die Funktionalität des biotinylierten Antikörpers wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Zudem wurde als Modellantikörper ein Ziegenantikörper (anti-Maus) biotinyliert und mit einem Alexa Fluor 680 markierten anti-Ziege Antikörper nachgewiesen. In der folgenden Abbildung sind die Fluoreszenzintensitäten des sekundären Detektionsantikörpers für den Modellantikörper und den Fangantikörper für das Protein CRISP3 dargestellt. Hierbei verhält sich die Anzahl an intaktem und am Partikel gebundenem biotinylierten Antikörper proportional zur Fluoreszenzintensität des gebundenen Sekundärantikörpers.

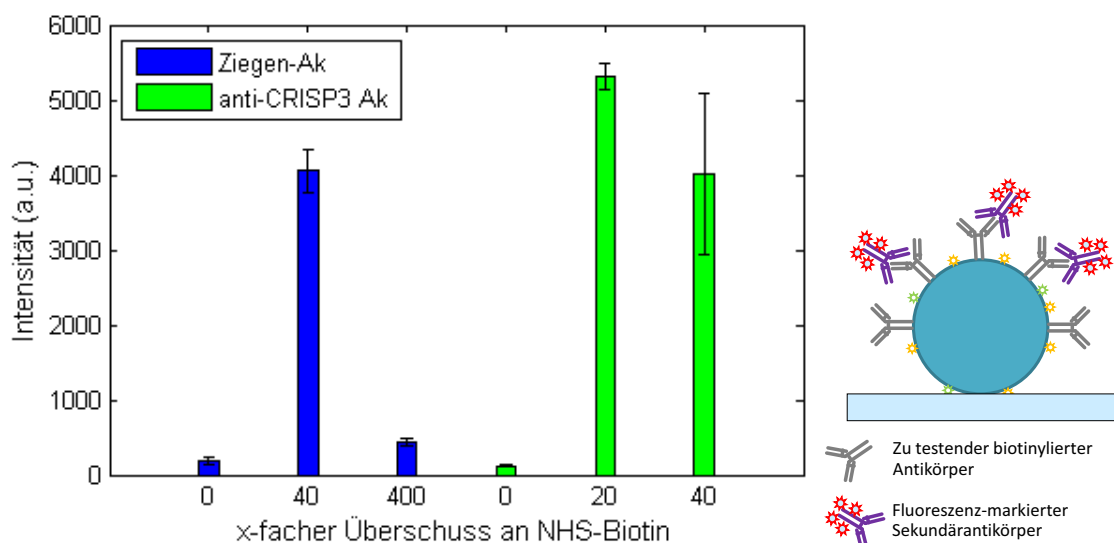


Abbildung 52: Ausmaß der Bindung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers an biotinylierte Antikörper, die mit unterschiedlichem Überschuss an NHS-Biotin-Molekülen pro Antikörper biotinyliert wurden

Wie in Abbildung 52 zu sehen, führt ein größerer Überschuss (400 x im Falle des Ziegen-Ak, 40 x im Falle des anti-CRISP3-Ak) an NHS-Biotin pro Antikörpermolekül zu einer geringeren Fluoreszenzintensität. Wenn zu viele NHS-Biotin-Moleküle an einen Antikörper binden, kann der Antikörper vom Sekundärantikörper nicht erkannt werden und dies resultiert in einem geringeren Fluoreszenzsignal. Ein möglicher Grund hierfür ist die Aggregation des Antikörpers während der Biotinylierung auf Grund des hydrophoben Charakters des Biotinmoleküls. Als Folge dessen bindet der Antikörper weniger gut oder nicht an die Streptavidin-funktionalisierten Partikel und kann folglich von dem Sekundärantikörper nicht erkannt werden, was dann zu einer geringeren Fluoreszenzintensität führt. Wenn zu viele Biotinmoleküle mit dem Antikörper konjugiert werden, können möglicherweise auch die Epitope des Antikörpers biotinyliert werden, die der Erkennung des Sekundärantikörpers dienen, was dazu führt, dass der Antikörper zwar am Partikel bindet, jedoch vom Sekundärantikörper nicht erkannt werden kann. Ein 20-facher Überschuss an Biotin ergibt dagegen ein relativ hohes Fluoreszenzsignal mit geringer Standardabweichung.

Die hier vorgenommenen Messungen überprüfen nur die Funktionalität des Antikörpers. Eine Aussage über die Anzahl an gebundenen Biotinmolekülen pro Antikörper kann so nicht getroffen werden.

Die Fangantikörper für PSA, CRISP3 und ErbB2 wurden auf Grund dieser Ergebnisse mit einem 20-fachen Überschuss an NHS-Biotin biotinyliert, aufgereinigt und an je eine kodierte Partikelpopulation gekoppelt.

4.2.3.2 Kopplung biotinylierter Antikörper an Magnetpartikel

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine gleichmäßige Bindung der biotinylierten Fangantikörper an die Partikeloberfläche erforderlich. Im Idealfall formen die biotinylierten Antikörper eine Monolage auf den Partikeln. Da im Mittel jedes Antikörpermolekül mit mehreren Biotin-Linkern versehen ist, besteht die Gefahr, dass die Antikörper die Mikropartikel untereinander verbinden. Die dabei entstehenden Aggregate können nicht für den Immunnachweistest eingesetzt werden, da für die Partikelanalyse einzelne Partikel gebraucht werden.

Zur Ermittlung des benötigten Überschusses an biotinyliertem Antikörper pro mg Partikel wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen kodierte Partikel mit einem 1-fachen, 2,5-fachen, 5-fachen, 7,5-fachen und 10-fachen Überschuss an Antikörpern versehen (siehe Tabelle 11). Laut Hersteller liegt die Antikörperbindekapazität der Partikel bei 25 µg Antikörper pro mg Partikel. Es wurden jeweils 10 µg Mikropartikel ($c = 1 \text{ mg/mL}$) zu 190 µL verdünnter Antikörperlösung gegeben und die Suspension wurde gemischt. Nach 30 min Inkubationszeit unter Rotation, um ein Absetzen der Partikel im Reaktionsgefäß zu verhindern, wurden die Partikel mittels Magnetseparation gewaschen, 10 µL wurden in eine Flusszelle injiziert und die zuvor kodierten Partikel wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Tabelle 11: Reaktionsansatz zur Ermittlung des benötigten Überschusses an biotinyliertem Antikörper pro mg Partikel

Überschuss	m (MP), µg	m (Ak), µg	c (Ak/mg Partikel), µg
1x	10	0,25	25,0
2,5x	10	0,625	62,5
5x	10	1,25	125,0
7,5x	10	1,875	187,5
10x	10	2,5	250,0

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem individuell angefertigten Makro für das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet. Zusammengefasst wurde die Bildfläche, die von Einzelpartikeln bedeckt wurde mit der von Partikelaggregaten bedeckten Bildfläche verglichen und das Verhältnis der beiden Flächen wurde ermittelt. Diese Methode erlaubt eine Abschätzung des Anteils der Partikel, die während der Konjugation mit biotinyliertem Antikörper nicht aggregierte.

Die Ergebnisse der Bildanalyse sind in Abbildung 53 graphisch dargestellt. Zu beobachten ist, dass ein größerer Überschuss an biotinylierten Antikörpern pro mg Partikel weniger Partikelaggregate verursacht. Insgesamt ist jedoch die Ausbeute an nicht aggregierten Partikeln gering. Selbst bei einem 10-fachen Überschuss an Antikörpern liegen nur 14% der Partikel als Einzelpartikel vor, während 86% der Partikel durch die Konjugation mit

Antikörpern aggregierten. Es wurde vermutet, dass die geringe Ausbeute auf die hohe Partikelkonzentration während der Reaktion zurückzuführen ist. Die Partikel wurden vor der Konjugationsreaktion mittels Magnetseparation gewaschen, wieder suspendiert ($c = 1 \text{ mg/mL}$) und daraufhin in die Antikörperlösung transferiert. Da die Partikel in konzentrierter Form auf die Antikörperlösung treffen, besteht die Möglichkeit, dass die Antikörper an Partikelaggregate binden und diese anfangs noch losen Aggregate permanent vernetzen, bevor diese Zeit haben, sich durch Mixen (Vortexer) zu lösen.

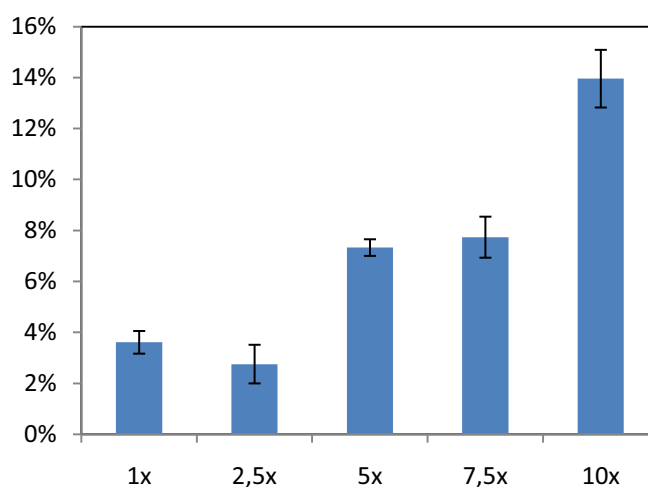


Abbildung 53: Prozentualer Anteil nicht aggregierter Partikel nach Konjugation mit biotinyliertem Antikörper (1)

Um dem entgegen zu wirken, wurden in einem weiteren Ansatz die Konzentrationsverhältnisse umgekehrt. Je $10 \mu\text{g}$ Partikel wurden in $190 \mu\text{L}$ Puffer suspendiert ($c \approx 50 \mu\text{g/mL}$) und in zehn Schritten zu der in nur $10 \mu\text{L}$ verdünnten Antikörperlösung gegeben. Auf diese Art und Weise treffen pro Zugabe nur $1 \mu\text{g}$ Partikel auf eine im Gegensatz zur Partikelmenge konzentrierte Antikörperlösung. Die Antikörper können so an die Partikel binden, bevor das nächste Partikelaliquot zugegeben wird. Hiernach wurde die Konjugation, wie schon oben beschrieben, ausgewertet.

Durch Vergleich der beiden Graphen (Abbildung 53 und Abbildung 54) fällt auf, dass die zweite Konjugationsmethode zu einer besseren Ausbeute an Einzelpartikeln führt als die erste Methode. Allerdings ist der Trend, dass ein größerer Überschuss an Antikörpern zu weniger Partikelaggregaten führt, nicht mehr zu erkennen. Durch die schrittweise Zugabe der Partikel treffen bei Zugabe des ersten Aliquots $1 \mu\text{g}$ Partikel auf einen 25-fachen

Überschuss an Antikörpern im Falle der Probe „2,5-facher Überschuss“. Selbst wenn an jedes Partikel eine Monolage Antikörper bindet, befindet sich noch ein 24-facher Überschuss an Antikörpern in Lösung, wenn das zweite Aliquot zugefügt wird, etc. Durch die Bildung von Aggregaten binden weniger Antikörpermoleküle an ein Partikel als prinzipiell möglich, was den Überschuss an vorhandenen Antikörpern bei der nächsten Aliquotzugabe zusätzlich noch erhöht.

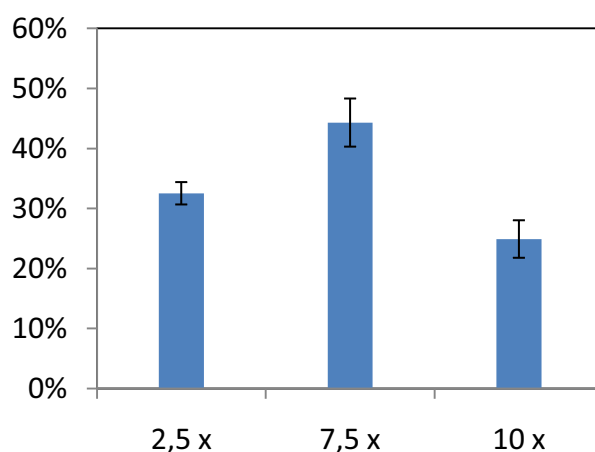


Abbildung 54: Prozentualer Anteil nicht aggregierter Partikel nach Konjugation mit biotinyliertem Antikörper (2)

In Abbildung 55 sind zwei Ausschnitte von Fluoreszenzbildern der kodierten Partikel nach Konjugation mit einem 7,5-fachen bzw. 10-fachen Überschuss an Antikörper dargestellt. Zu sehen sind Einzelpartikel (rote Pfeile) und Partikelaggregate aus zwei oder mehreren Partikeln (gelbe Pfeile). Die Auswertung des Anteils der nicht aggregierten Partikel mit der Software ImageJ führt nur zu einer Abschätzung der Aggregatbildung während der Konjugation. Je nach Form können Aggregate aus beispielsweise drei Partikeln zu einer größeren oder kleineren Fläche führen, nachdem eine Partikelmaske erstellt wurde, je nachdem ob die Partikel kettenförmig oder dicht gepackt vorliegen (beides ist im rechten Bild zu sehen). Diese Variationen wurden im Makro nicht berücksichtigt.

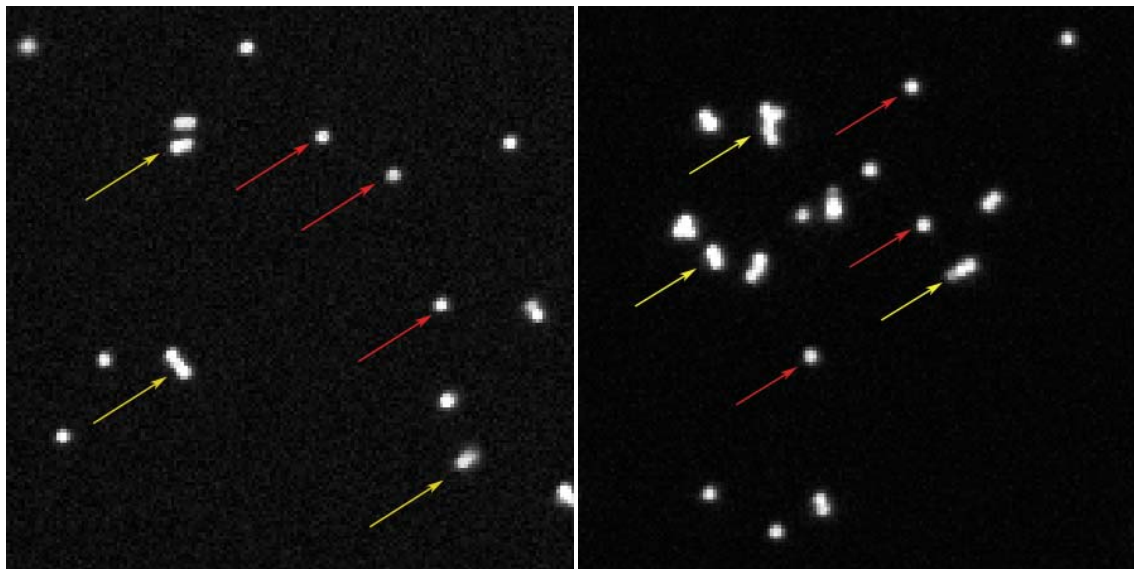


Abbildung 55: Fluoreszenzbilder der kodierten und Antikörper-konjugierten Mikropartikel (links: 7,5 x, rechts: 10 x)

In Abbildung 54 ist kein eindeutiger Trend der Partikelaggregation in Abhängigkeit des eingesetzten Überschusses an Antikörper zu erkennen. Wie in der Abbildung zu sehen, führt ein zehnfacher Überschuss an Antikörpern zu einem größeren Anteil aggregierter Partikel als ein 2,5-facher Überschuss. Es wurde daher davon ausgegangen, dass bei dieser Methode das Aggregationsverhalten nicht direkt vom eingesetzten Überschuss abhängig ist. Nach theoretischen Überlegungen sollte ein 10-facher Überschuss auch bei der schrittweisen Zugabe der Partikel zu der Antikörperlösung zu weniger Aggregaten führen als ein 2,5-facher Überschuss. Bei Zugabe des letzten Aliquots (2,5-facher Gesamtüberschuss an Antikörper) befindet sich noch ein 16-facher Überschuss an Antikörper in der Lösung (ein 91-facher Überschuss bei 10-fachem Gesamtüberschuss). Diese Berechnungen gehen davon aus, dass jedes Partikelaliquot vor Zugabe des nächsten Aliquots bereits eine Monolage an Antikörpern gebunden hat. Sowohl die Geschwindigkeit der Zugabe der Aliquots als auch die Bindungsgeschwindigkeit der biotinylierten Antikörper an die Partikel beeinflussen den in der Lösung vorhandenen Überschuss an Antikörpern. Um auch im Falle einer geringeren Bindungsgeschwindigkeit der Antikörper an die Partikel einen genügend hohen Überschuss an Antikörpern zu gewährleisten, wurde für die Konjugation der Partikel mit biotinylierten Antikörpern im Folgenden die Methode der schrittweisen Partikelzugabe und ein 10-facher Überschuss an Antikörpern verwendet.

4.2.4 Immunassays

4.2.4.1 Immunnachweis von Modellantigenen

Um das Prinzip des Immunnachweises auf den Mikropartikeln zu demonstrieren, wurde eine Partikelpopulation mit biotinyliertem anti-Ziege Antikörper gekoppelt und die Konzentration des „Antigens“ (Fluoreszenz-markierter Ziegenantikörper) wurde variiert. Das gemessene Fluoreszenzsignal entspricht bei diesem Versuch direkt der Menge an gebundenem „Antigen“.

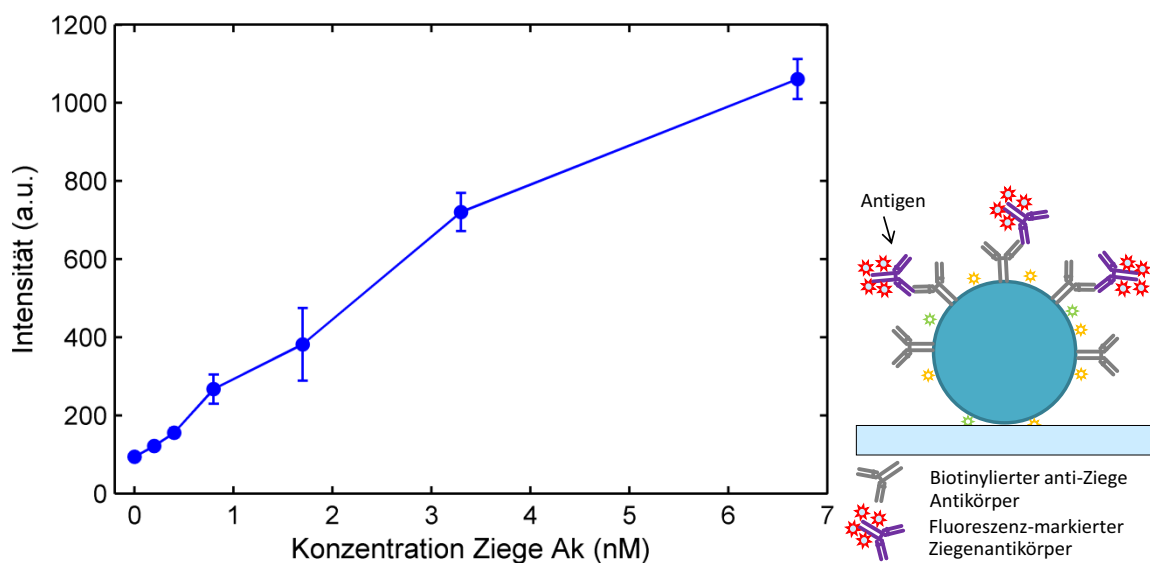


Abbildung 56: Detektion von Fluoreszenz-markiertem Ziegenantikörper als „Antigen“

Aus den erhaltenen Fluoreszenzsignalen (siehe Abbildung 56) lässt sich schließen, dass mit Hilfe des partikelbasierten Immunnachweises Proteinkonzentrationen unter 1 nM detektiert werden können. Die Versuchsanordnung entspricht zwar noch keinem „Sandwich-Immunnachweis“, zeigt aber, dass der Aufbau für einen solchen Immunnachweis prinzipiell geeignet ist. Zudem gibt der Versuch Hinweise darauf, dass die Größenordnung der nachzuweisenden Konzentrationen erhöht werden kann. Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt im Diagramm linear mit der „Antigen“-Konzentration an und erreicht noch nicht die Sättigung, welche letztendlich durch die EMCCD-Kamera limitiert ist. Die Kamera kann Fluoreszenzintensitäten zwischen 0 und 16.000 in der Form von Pixelwerten messen. Eine Überbelichtung der Kamera ist zu vermeiden, da die Kamera dann die Pixelwerte invertiert, was zu nicht auswertbaren

Fluoreszenzbildern führt. Die in den Graphen dargestellten Intensitäten der Y-Achse für die Immunnachweisversuche entsprechen jeweils der mittleren Partikelintensität aus einer Population bzw. einer Versuchsbedingung. Zur Ermittlung der Standardabweichungen wurde die mittlere Intensität eines jeden Partikels, das auf dem Bild etwa eine Fläche von 35 Quadratpixeln einnimmt, bestimmt. Daraufhin wurde der Durchschnitt von jeweils 10 Partikelintensitäten bestimmt und von diesen wurde die Standardabweichung berechnet.

In einem weiteren Versuch wurde eine Partikelpopulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an biotinylierten Anti-Ziege Antikörpern inkubiert. Dieser Antikörper stellte das „Antigen“ dar. Der Nachweis erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Ziegenantikörpern konstanter Konzentration (Überschuss). Wie zu erwarten, ergibt eine höhere „Antigen“-Konzentration auch hier ein stärkeres Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 57). Da in diesem Experiment das „Antigen“ biotinyliert ist und an Streptavidin-funktionalisierte Magnetpartikel bindet, handelt es sich hier nur entfernt um einen immunologischen Nachweis. Biotin hat eine sehr viel höhere Affinität zu Streptavidin als ein Antikörper zu einem Antigen. Entsprechend liegt die Nachweisgrenze bei diesem Versuch etwa eine Größenordnung unter dem in Abbildung 56 dargestellten Versuch.

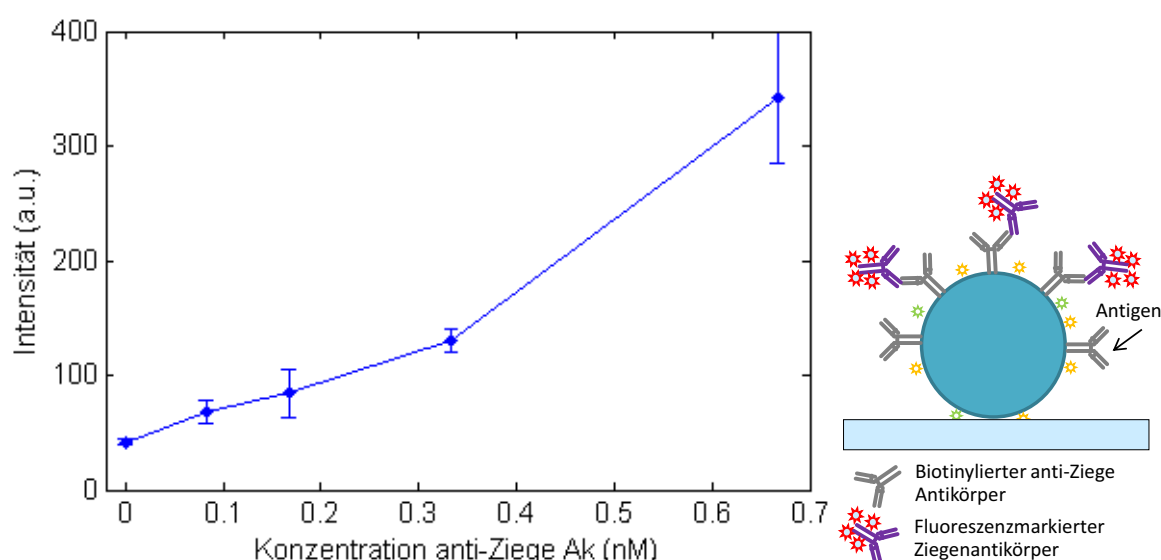


Abbildung 57: Detektion von biotinyliertem anti-Ziege Antikörper als „Antigen“

Bei beiden Experimenten mit Antikörpern als Modellantigenen erkennt nicht der Fluoreszenz-markierte Antikörper den am Partikel gebundenen Antikörper, sondern der

Fluoreszenz-markierte Antikörper wird vom biotinylierten Antikörper, der am Partikel gebunden ist, erkannt. Aus beiden Versuchen lässt sich zudem ableiten, dass die Antikörper spezifisch binden und nur ein geringes Hintergrundsignal verursachen.

Das Konzentrationslimit des nachzuweisenden „Antigens“ lässt sich weiter verringern, indem ein Detektionsantikörper gewählt wird, der den auf dem Partikel immobilisierten Antikörper (Antigen) erkennt, anstatt anders herum wie in den vorigen Experimenten. In dem in Abbildung 58 dargestellten Versuch wurden Partikel mit unterschiedlichen Konzentrationen an biotinyliertem Maus-Antikörper als Antigen (0 pM – 667 pM) inkubiert, die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-markierten polyklonalen anti-Maus Antikörper konstanter Konzentration.

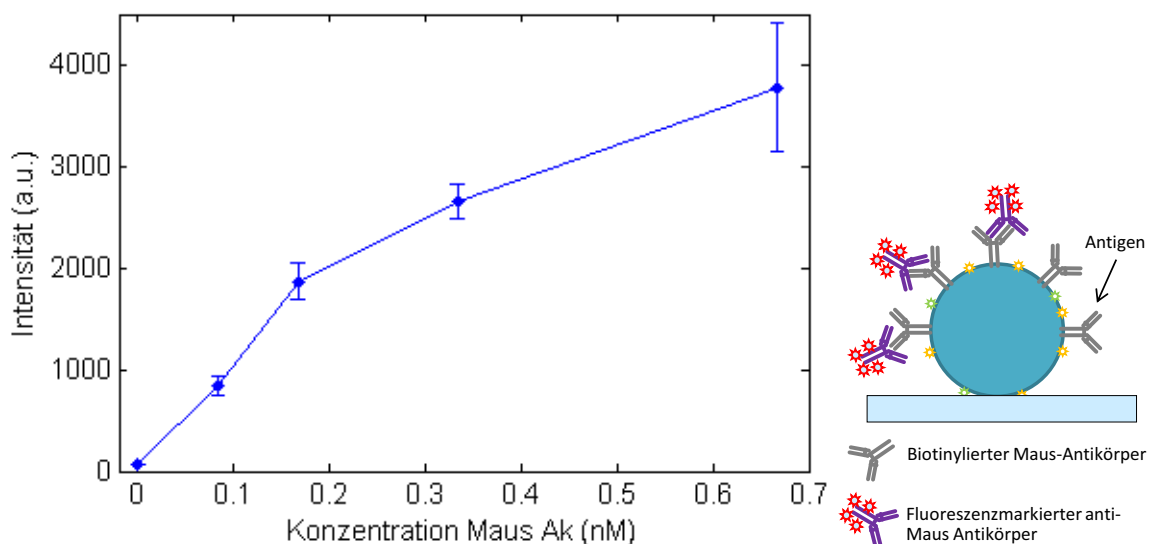


Abbildung 58: Detektion von biotinyliertem Maus Antikörper als „Antigen“

Die Fluoreszenzintensität steigt bei dieser Versuchsanordnung wesentlich schneller an als im vorigen Versuch und erreicht den Sättigungsbereich. Dies liegt hauptsächlich daran, dass bei dem in Abbildung 57 dargestellten Versuch der am Partikel immobilisierte Antikörper den Fluoreszenzmarkierten Antikörper nur dann binden kann, wenn er die richtige Orientierung auf dem Partikel einnimmt, das heißt, wenn die Antigenerkennungsstelle in Richtung der umgebenden Lösung zeigt. Einige am Partikel immobilisierte Antikörper binden folglich keinen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. In der in Abbildung 58 dargestellten Versuchsanordnung wird das „Antigen“ (biotinylierter Antikörper am Partikel) vom Fluoreszenz-markierten

Detektionsantikörper unabhängig von dessen Orientierung erkannt, da der polyklonale Detektionsantikörper an verschiedene Epitope des „Antigens“ binden kann. Die gleiche Versuchsanordnung wurde für zwei weitere Experimente angewandt mit dem Ziel, die Nachweisgrenze (die gerade noch detektierbare niedrigste Antigenkonzentration) zu ermitteln. In Abbildung 59 sind drei Experimente mit unterschiedlichen „Antigen“-Konzentrationsbereichen zusammen gefasst. Um Bereiche geringerer Konzentrationen besser vergleichen zu können, wurden die Daten auf einer doppelt logarithmischen Skala aufgetragen.

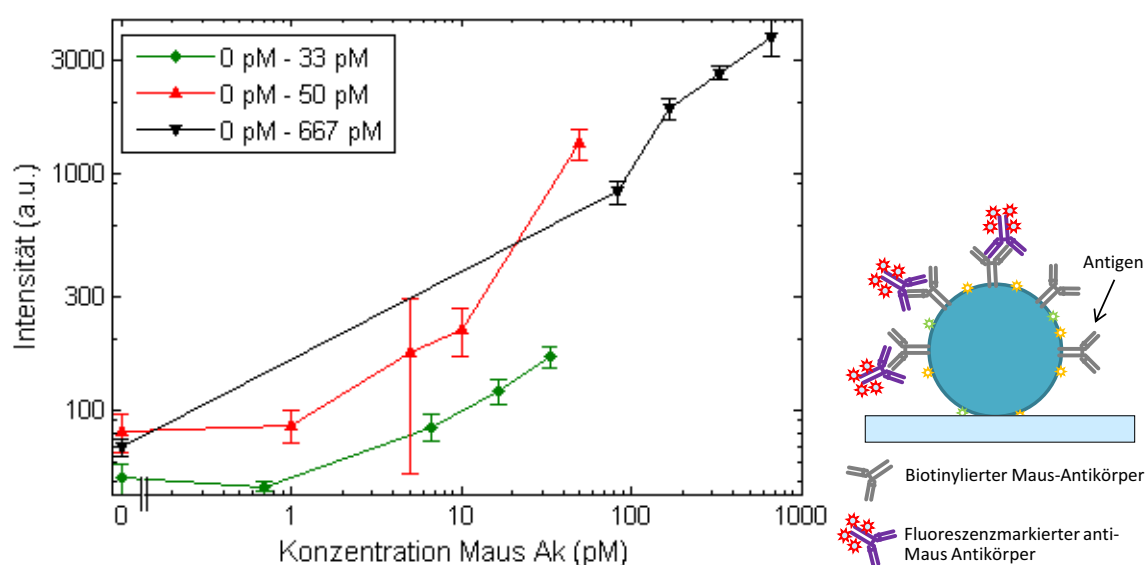


Abbildung 59: Detektion von biotinyliertem Maus Antikörper als „Antigen“ (doppelt logarithmische Skala)

Die niedrigste zu detektierende Konzentration ist etwa 3 pM (gemittelt über rote und grüne Datenpunkte, 0-Wert (kein Antigen) plus 3 x Standardabweichung). Die Daten variieren je nach Experiment sowohl im Hinblick auf das Hintergrundsignal (Partikel ohne Antigen) als auch im Hinblick auf die Steigung der Fluoreszenzintensität. Zu optimierende Stellgrößen sind hier Inkubationsdauer mit dem Detektionsantikörper, Inkubationstemperatur, Konzentration des Detektionsantikörpers und die Zusammensetzung der Blocklösung. Durch Optimierung dieser Parameter könnte die Nachweisgrenze wahrscheinlich weiter gesenkt werden. Wie bei anderen immunologischen Nachweismethoden auch muss bei dieser Methode jeweils eine Standardkurve der nachzuweisenden Proteine erstellt werden.

Die Experimente zum Nachweis eines Modellantigens demonstrieren, dass dieser Versuchsaufbau dazu in der Lage ist, Proteine in geringen Konzentrationen quantitativ nachzuweisen. Eine 3 pM Antikörper-Konzentration entspricht einer Massenkonzentration von etwa 430 pg/mL, da es sich bei Antikörpern um sehr große Proteine handelt. Eine 3 pM Konzentration des Proteins TNF-alpha beispielsweise entspricht einer Massenkonzentration von nur 50 pg/mL. Die mit dem vorgestellten Verfahren messbaren Konzentrationen liegen somit durchaus im Bereich etablierter immunologischer Nachweisverfahren wie ELISA, jedoch ohne sich der enzymatischen Signalverstärkung zu bedienen. Wie schon zuvor diskutiert, bietet dieser Aufbau zudem die Möglichkeit, mehrere Proteine parallel nachzuweisen.

4.2.4.2 Immunassays für den Nachweis eines einzelnen Proteins

In den folgenden Versuchen wurde jeweils ein Zielprotein betrachtet. Die kodierten Partikel wurden mit jeweils einem spezifischen biotinylierten Fangantikörper versehen, im Fluidkanal immobilisiert und daraufhin mit unterschiedlichen Konzentrationen an nachzuweisendem Protein inkubiert. Es wurde pro Fluidkanal nur eine Population immobilisiert und das jeweilige Zielprotein wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde der für das Protein spezifische Detektionsantikörper in die Kanäle injiziert, gefolgt von dem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper. Auf den Partikeln bildet sich dadurch ein Komplex aus vier Komponenten (biotinylierter Fangantikörper, Zielprotein, Detektionsantikörper und sekundärer Fluoreszenz-markierter Antikörper, siehe 3.2.6.2). Es wurden die vier Proteine ErbB2, CRISP3, PSA und TNF-alpha betrachtet.

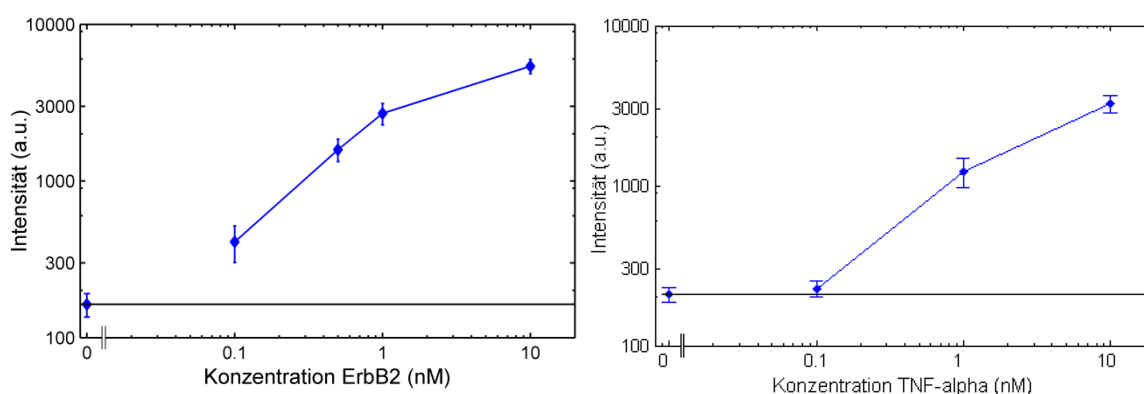


Abbildung 60: Quantitativer Nachweis von ErbB2 und TNF-alpha

Abbildung 60 zeigt die Ergebnisse für die quantitative Analyse der beiden Proteine ErbB2 und TNF-alpha. Die schwarze Linie in den Graphen stellt jeweils die Hintergrundfluoreszenz der Partikel ohne Zielprotein dar (Kontrolle). Das Detektionslimit für ErbB2 liegt bei 0,03 nM. Das entspricht einer Massenkonzentration von 2,9 ng/mL. Der polyklonale Detektionsantikörper für ErbB2 wurde vom Hersteller für ELISA getestet und verspricht eine Nachweisgrenze von 0,15 ng ErbB2 pro well (Vertiefung in der Mikrotiterplatte). Dies entspricht einer Konzentration von 1,5 ng/mL. Dieses Limit liegt im Bereich des dem mit den Partikeln gemessenen Limits. Für TNF-alpha liegt das Detektionslimit bei 0,2 nM (jeweils Intensität des Null-Wertes (kein Zielprotein) plus 3 x Standardabweichung). Das entspricht einer Massenkonzentration von 3,5 ng/mL. Im Falle von TNF-alpha liegt das Detektionslimit laut Herstellerangaben für den Detektionsantikörper bei 2 ng/mL - 4 ng/mL. Die hier gemessenen Nachweisgrenzen für die beiden Proteine zeigen, dass das System in der Lage ist, die Sensitivität der verwendeten Antikörper voll auszunutzen.

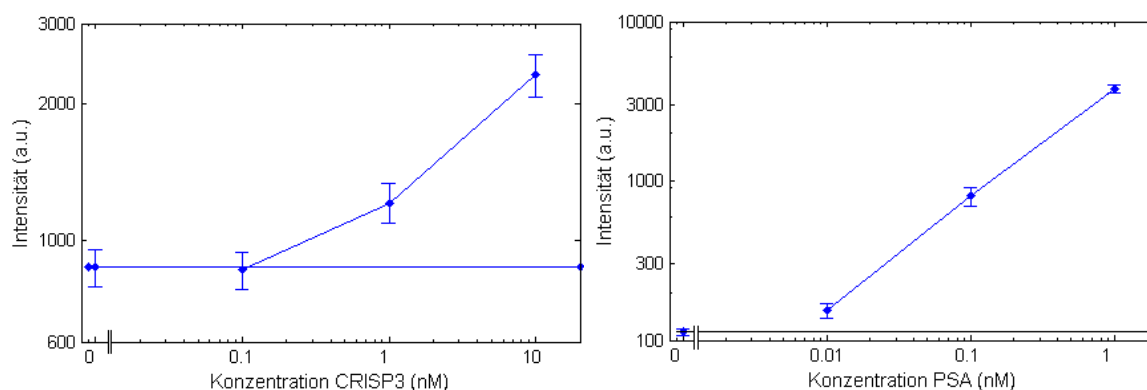


Abbildung 61: Quantitativer Nachweis von CRISP3 und PSA

Das Detektionslimit für CRISP3 liegt in etwa bei 1 nM (Hintergrundsignal plus 3 x Standardabweichung). Das entspricht in etwa 25 ng/mL. Laut Herstellerangaben liegt die Nachweisgrenze für den polyklonalen Detektionsantikörper bei etwa 3 ng/mL im ELISA-Test. Der Versuch zum Nachweis von CRISP3 wurde einige Male wiederholt, da das Hintergrundsignal im Vergleich zu dem Hintergrundsignal der anderen Proteine sehr hoch ist, jedoch erbrachten die vorgenommenen Versuche keine Reduktion dessen. Für die Proteine PSA, CRISP3 und ErbB2 wurde jeweils der gleiche sekundäre Fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet (ein Alexa Fluor 680 markierter anti-Ziege Antikörper). Es

kann also ausgeschlossen werden, dass unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers an die Partikel für das hohe Hintergrundsignal verantwortlich sind, da diese bei den Experimenten mit PSA und ErbB2 nicht auftreten. Wahrscheinlich bindet der für CRISP3 spezifische Detektionsantikörper unspezifisch an die Partikel oder direkt an den CRISP3-Fangantikörper auf den Partikeln, woraufhin der sekundäre Antikörper diesen erkennt und das unspezifische Signal verursacht. Der verwendete Fangantikörper wurde wie auch die Fangantikörper für PSA und ErbB2 selbst biotinyliert.

Bei PSA liegt die Nachweisgrenze etwa eine Größenordnung unter der Nachweisgrenze der drei anderen Proteine (etwa 0,6 ng/mL oder 0,02 nM). Die Nachweisgrenze im ELISA-Test für den Detektionsantikörper liegt laut Hersteller bei etwa 10 ng/mL. In diesem Fall übertrifft der partikelbasierte Nachweis die vom Hersteller genannte Grenze um eine Größenordnung.

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass es möglich ist, auf Mikropartikeln immobilisierte Proteine selbst in geringen Konzentrationen quantitativ nachzuweisen. Die Nachweisgrenzen entsprechen im Großen und Ganzen den Herstellerangaben. Wie schon erwähnt, wurden die Immunassays nicht optimiert. Durch eine Optimierung der üblichen Stellgrößen (Inkubationsdauern, Temperatur, Konzentration der Fang- und Detektionsantikörper, Blocksubstanzen, etc.) könnte die Nachweisgrenze mit den hier verwendeten Antikörperpaaren wahrscheinlich um eine Größenordnung verbessert werden.

4.2.4.3 Immunassays für den parallelen Nachweis von Proteinen I

Für den parallelen Proteinnachweis wurden vier Partikelpopulationen mit jeweils einer Art biotinyliertem Fangantikörper versehen und danach gemischt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Im Multiplex-Versuch eingesetzte Mikropartikel

Population	Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 488 (Moleküle pro Mikropartikel)	Zielprotein
P1	~ 6.000 / ~6.000	CRISP3
P2	~ 60.000 / ~6.000	TNF-alpha
P3	~ 6.000 / ~60.000	PSA
P4	~ 60.000 / ~60.000	ErbB2

Ein Aliquot der Partikelmischung wurde in die Fluidkanäle injiziert und die Partikel wurden immobilisiert. Daraufhin wurde in jeden Fluidkanal eine Mischung aus den nachzuweisenden Proteinen CRISP3, TNF-alpha, PSA und ErbB2 gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde ein Mix aus den für die Proteine spezifischen Detektionsantikörpern in die Kanäle injiziert, gefolgt von den jeweiligen Fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern. Die Partikel wurden dekodiert und die Fluoreszenzintensitäten für die jeweiligen Konzentrationsniveaus ermittelt. In Abbildung 62 links sind die Intensitäten der Partikel in den kodierenden Fluoreszenzkanälen dargestellt.

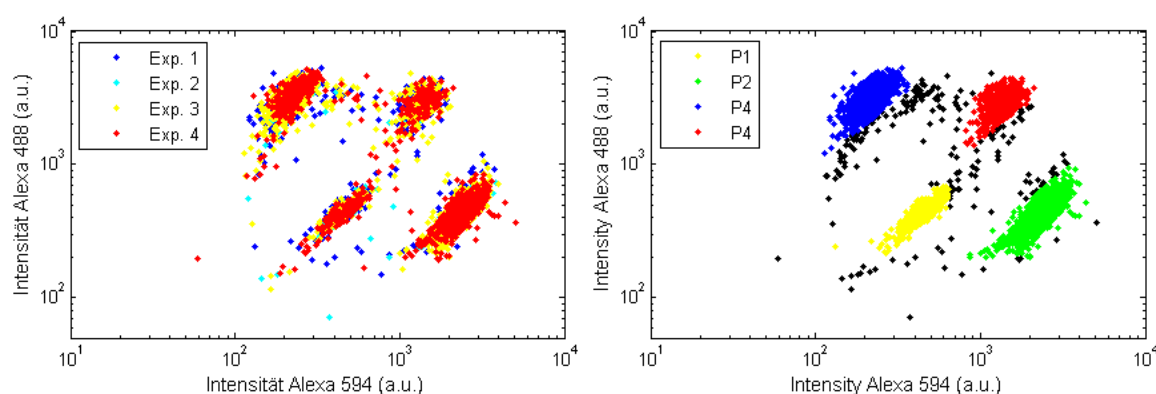


Abbildung 62: Dekodierung der Partikelpopulationen

In dieser Darstellung wurden Partikelintensitäten, die während je eines Experiments (in einem Fluidkanal) gemessen wurden, in einer Farbe dargestellt. Die Dekodierung der Partikel erfolgte wie schon beschrieben mit ImageJ und MATLAB. Partikel, die entsprechend ihrer Fluoreszenzintensitäten der Population 1 (zur Detektion von CRISP3) angehören, sind in der Abbildung rechts gelb dargestellt, TNF-alpha detektierende Partikel sind grün, PSA detektierende Partikel blau und ErbB2 detektierende Partikel sind rot dargestellt. In schwarz dargestellte Partikel wurden nicht betrachtet, da sie den Entschlüsselungskriterien nicht entsprachen.

In Abbildung 63 sind die Intensitäten der einzelnen Partikelpopulationen in Abhängigkeit der in Tabelle 13 aufgelisteten Konzentrationen aufgetragen. Das Fluoreszenzsignal aller Partikelpopulationen steigt wie erwartet mit der Konzentration der Zielproteine.

Tabelle 13: Versuchsschema zum parallelen Proteinnachweis

Experiment	Konzentrationsniveau	CRISP3	TNF-alpha	PSA	ErbB2
Exp.1	C1	0,0 nM	0,0 nM	0,0 nM	0,0 nM
Exp.2	C2	0,1 nM	0,1 nM	0,01 nM	0,1 nM
Exp.3	C3	1,0 nM	1,0 nM	0,1 nM	1,0 nM
Exp.4	C4	10,0 nM	10,0 nM	1,0 nM	10,0 nM

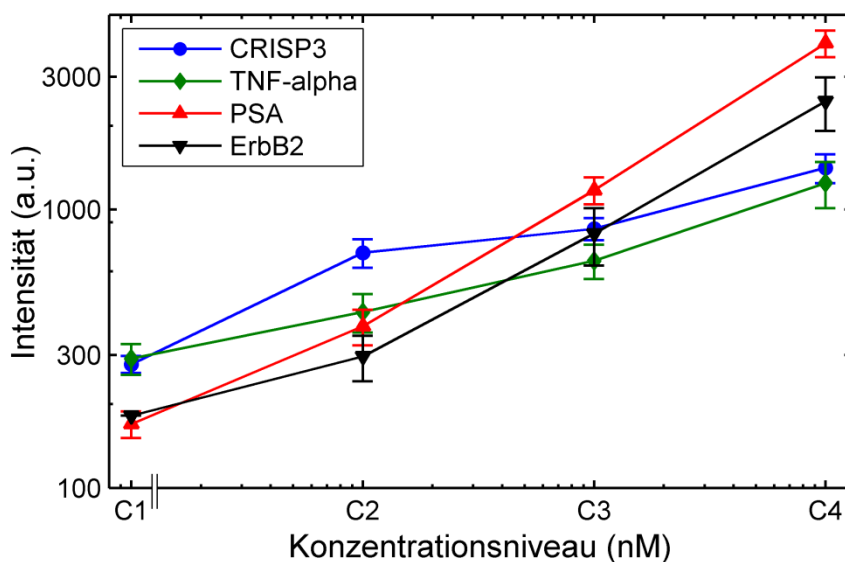


Abbildung 63: Paralleler Nachweis von den Proteinen CRISP3, TNF-alpha, PSA und ErbB2 mit vier Partikelpopulationen. Die Werte der Konzentrationsniveaus sind in Tabelle 13 gelistet.

Durch den Vergleich der Daten aus der Quantifizierung einzelner Proteine mit den Daten des parallelen Immunnachweises lässt sich die nichtspezifische Bindung von Proteinen an Mikropartikel anderer Populationen abschätzen. Die unspezifische Bindung sowohl der Antigene an den „falschen“ Antikörper als auch der Detektionsantikörper an die „falschen“ Zielproteine, wird als Kreuzreaktivität bezeichnet und ist ein bekanntes Hindernis bei der Etablierung von Multiplexanalysen. Durch geeignete Blockreagenzien und Optimierung der Versuchsprotokolle kann die Kreuzreaktivität der einzelnen Komponenten minimiert werden. In diesem Beispiel werden zum parallelen Nachweis von vier Proteinen vier verschiedene Fangantikörper, die vier Zielproteine, vier verschiedene Detektionsantikörper und zwei verschiedene Sekundärantikörper eingesetzt. Die Möglichkeiten der unerwünschten Interaktionen dieser 14 Komponenten sind zahlreich. Die hier dargestellten Versuche wurden in Puffern mit BSA und nicht in Blut oder Serum

durchgeführt. Durch den Einsatz solcher Medien wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Kreuzreaktivitäten durch die Komplexität der Proben noch erhöht.

In Abbildung 64 sind die Fluoreszenzintensitäten aus den Versuchen des Einzelproteinnachweises (Abbildung 60 und Abbildung 61) und des parallelen Proteinnachweises (Abbildung 63) für jeweils ein Protein aufgetragen. Bei allen Experimenten wurde die Kameraeinstellung so gewählt, dass die jeweils höchste Zielproteinkonzentration den Sättigungsbereich der Kamera erreicht, das heißt dass für verschiedene Proteine unterschiedlich lange Belichtungszeiten verwendet wurden. Der jeweils linke Graph in der Abbildung zeigt die Daten direkt aus den vorherigen Abbildungen übernommen, der jeweils rechte Graph zeigt die normalisierten Daten. Hierbei wurden die Daten mit der Fluoreszenzintensität der jeweils höchsten Proteinkonzentration aus dem Multiplex-Experiment normalisiert, um die gleichen Endwerte zu erhalten (Bildsättigung der Kamera). Auffallend ist die gute Übereinstimmung der Signalintensitäten aus den beiden Versuchen für das Protein PSA. Die beiden Kurven beider Graphen (normalisiert und Rohdaten) unterscheiden sich nur geringfügig. Die gute Übereinstimmung der Messdaten im Multiplex-Nachweis und im Einzelnachweis ist ein Hinweis darauf, dass die verwendeten Fang- und Detektionsantikörper nur PSA spezifisch binden und dieses Antikörperpaar auch ohne weitere Optimierung der Versuchsparameter gut in einem Multiplex-System eingesetzt werden kann. Beim Nachweis der drei weiteren Zielproteine steigt die Fluoreszenzintensität im Einzelnachweis jeweils stärker an als im Multiplex-Nachweis. Dies liegt an den verwendeten Kameraeinstellungen. Nach Normalisierung der Daten stimmen die Fluoreszenzintensitäten beider Experimente im Rahmen der Standardabweichung überein, wobei das Protein TNF-alpha bei geringer Konzentration (0,1 nM) eine Ausnahme darstellt. TNF-alpha zeigt im parallelen Immunnachweis die geringste Fluoreszenzintensität. Nach Normalisierung dieser Daten auf das höhere Intensitätsniveau des Einzelnachweises, weicht dieser Wert (0,1 nM im parallelen Nachweis nach Normalisierung) signifikant vom im Einzelnachweis gemessenen Wert ab. Für eine genauere Analyse der Kreuzreaktivitäten wurden Versuche durchgeführt, bei denen alle vier Partikelpopulationen verwendet wurden, jedoch jeweils nur Zielprotein zugegeben wurde. Zur Überprüfung von Kreuzreaktivitäten wurden jeweils alle vier

Detektionsantikörper und beide Sekundärantikörper zugegeben. Auf diese Art kann die unspezifische Bindung aller Detektionskomponenten untersucht werden. Beispielsweise wäre es möglich, dass das Fluoreszenzsignal eines Proteins im Multiplex-System nicht auf das Zielprotein der jeweiligen Partikelpopulation, sondern auf die unspezifische Bindung eines „falschen“ Detektionsantikörpers zurückzuführen ist. Durch die Betrachtung aller Partikelpopulationen und durch Verwendung aller Detektionsantikörper, jedoch nur eines Zielproteins, können diese Wechselwirkungen untersucht werden.

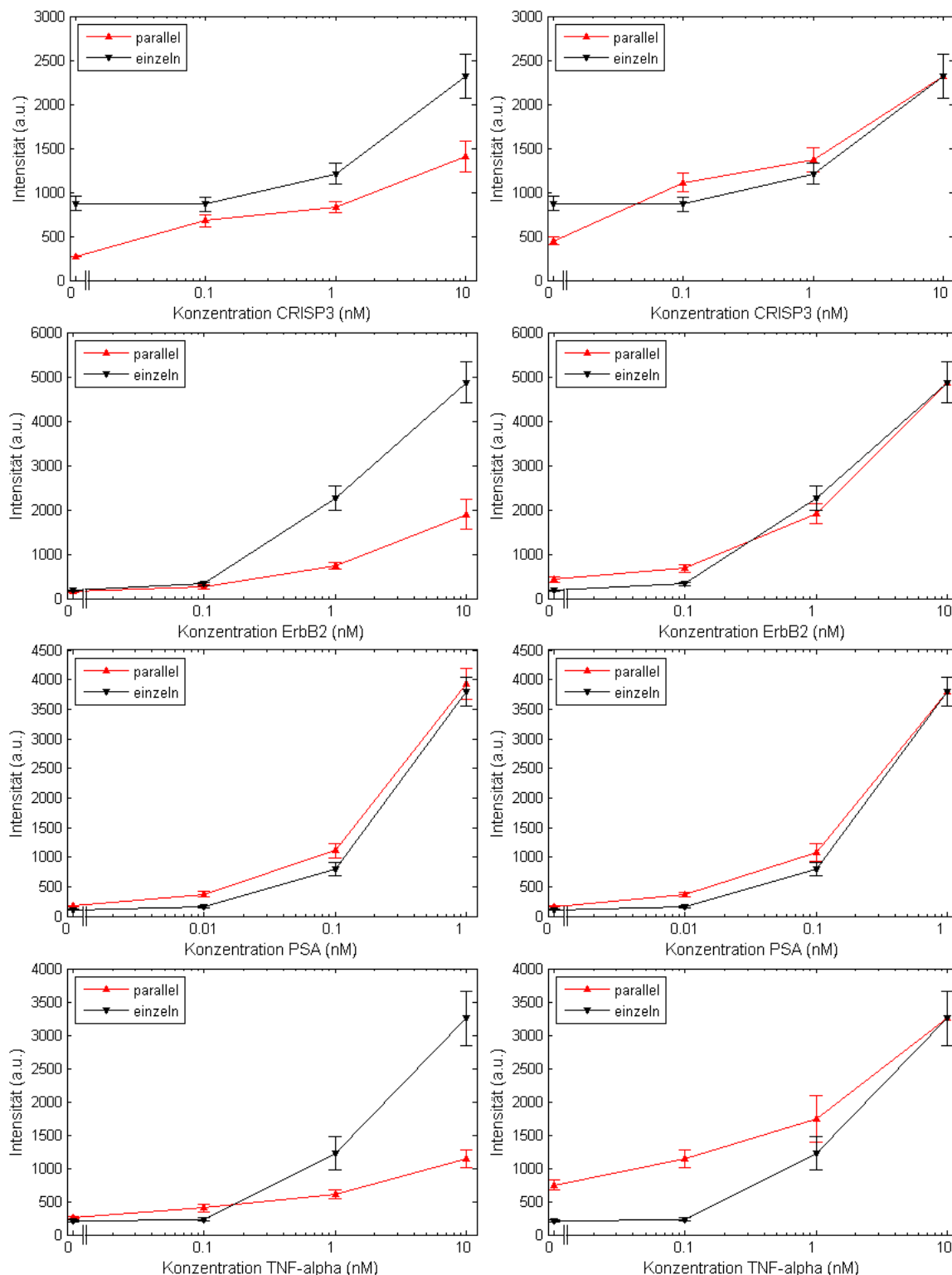


Abbildung 64: Standardkurven der Proteine CRISP3, ErbB2, PSA und TNF-alpha im Einzel- und im parallelen Proteinnachweis. In der linken Spalte sind die Rohdaten, in der rechten die auf das Intensitätsniveau des Einzelnachweises normalisierten Daten abgebildet.

4.2.4.4 Untersuchung der Kreuzreaktivitäten

In Abbildung 65 sind die Ergebnisse von Versuchen dargestellt, in denen jeweils vier Partikelpopulationen zum Nachweis von den vier Zielproteinen CRISP3, TNF-alpha, ErbB2 und PSA in jedem Fluidkanal immobilisiert wurden, aber jeweils nur ein Zielprotein in unterschiedlichen Konzentrationen zur quantitativen Analyse zugegeben wurde.

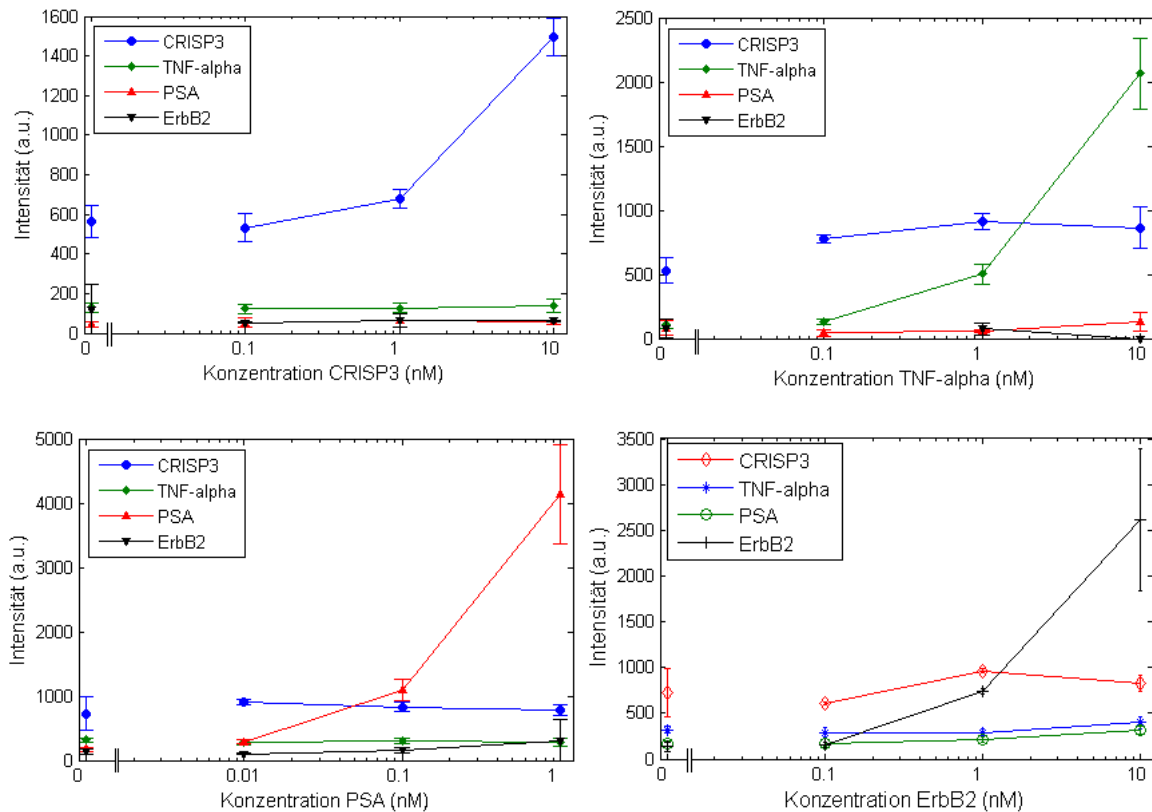


Abbildung 65: Quantitative Analyse je eines Proteins mit vier Partikelpopulationen

Wie schon in früheren Experimenten beobachtet, ist das Hintergrundsignal der Partikelpopulation 1 zur Detektion des Proteins CRISP3 im Vergleich zu den Hintergrundsignalen der anderen Partikelpopulationen sehr hoch (etwa Faktor 4). Dies kann sowohl an Hand des Experiments, bei dem tatsächlich CRISP3 quantifiziert wurde, aber auch an Hand der Experimente, in denen jeweils andere Zielproteine quantifiziert wurden, beobachtet werden. Wie schon zuvor erwähnt, bindet entweder der Detektionsantikörper für CRISP3 an den am Partikel gebundenen Fangantikörper oder der sekundäre Antikörper bindet an den Fangantikörper. In beiden Fällen würde dies zu einem unspezifischen Hintergrundsignal führen. Die Hintergrundfluoreszenz (unspezifische Bindungen nichtspezifischer Komponenten) an die Partikel der

Populationen 2, 3 und 4 ist auch bei steigender Zielproteinkonzentration in allen vier Experimenten relativ gering. Daraus lässt sich schließen, dass die Antikörperpaare für TNF-alpha, PSA und ErbB2 tatsächlich nur ihr Zielprotein binden und, zumindest in dieser Kombination, keine falsch-positiven Ergebnisse im Multiplex-Nachweis verursachen. Jedoch sollte auch darauf hingewiesen werden, dass das Hintergrundsignal der Partikelpopulation 2 (grün, TNF-alpha) etwas über dem Hintergrundsignal der Populationen 3 und 4 (PSA und ErbB2) liegt (siehe Abbildung 65).

4.2.4.5 Vergleich von ELISA mit dem Partikel basierten Nachweisverfahren

Um die Empfindlichkeit der partikelbasierten Methode mit einer konventionellen Immunnachweismethode zu vergleichen, wurden für alle Proteine Standardkurven mit ELISA erstellt. Für den Nachweis von CRISP3 und TNF-alpha wurde der biotinylierte Antikörper als Fangantikörper eingesetzt, für den Nachweis von ErbB2 und PSA wurden die nativen Fangantikörper benutzt*. Als Detektionsantikörper wurden jeweils dieselben Antikörper wie in der partikelbasierten Methode eingesetzt. Die so erhaltenen Standardkurven sind in Abbildung 66 dargestellt.

Alle Standardkurven wurden mit einem logistischen Fit in Matlab erstellt, welcher standardmäßig für ELISA eingesetzt wird [87]. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) war für TNF-alpha, PSA und ErbB2 größer als 0,99. Der hohe R^2 -Wert für die drei Standardkurven bedeutet, dass der angewandte Fit sehr gut mit den Messdaten übereinstimmt. Für die Standardkurve von CRISP3 wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,90 berechnet, der Fit stimmt also mit den gemessenen Daten weniger gut überein, wie auch aus dem Graph selbst hervorgeht. Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) der Proteine wurde bestimmt, indem zwei Standardabweichungen zu dem jeweiligen Kontrollwert (Wert 0, Probe ohne Antigen) addiert wurden.

* Der TNF-alpha Antikörper wurde bereits biotinyliert gekauft und der CRISP3-Antikörper lag zu diesem Zeitpunkt schon biotinyliert vor

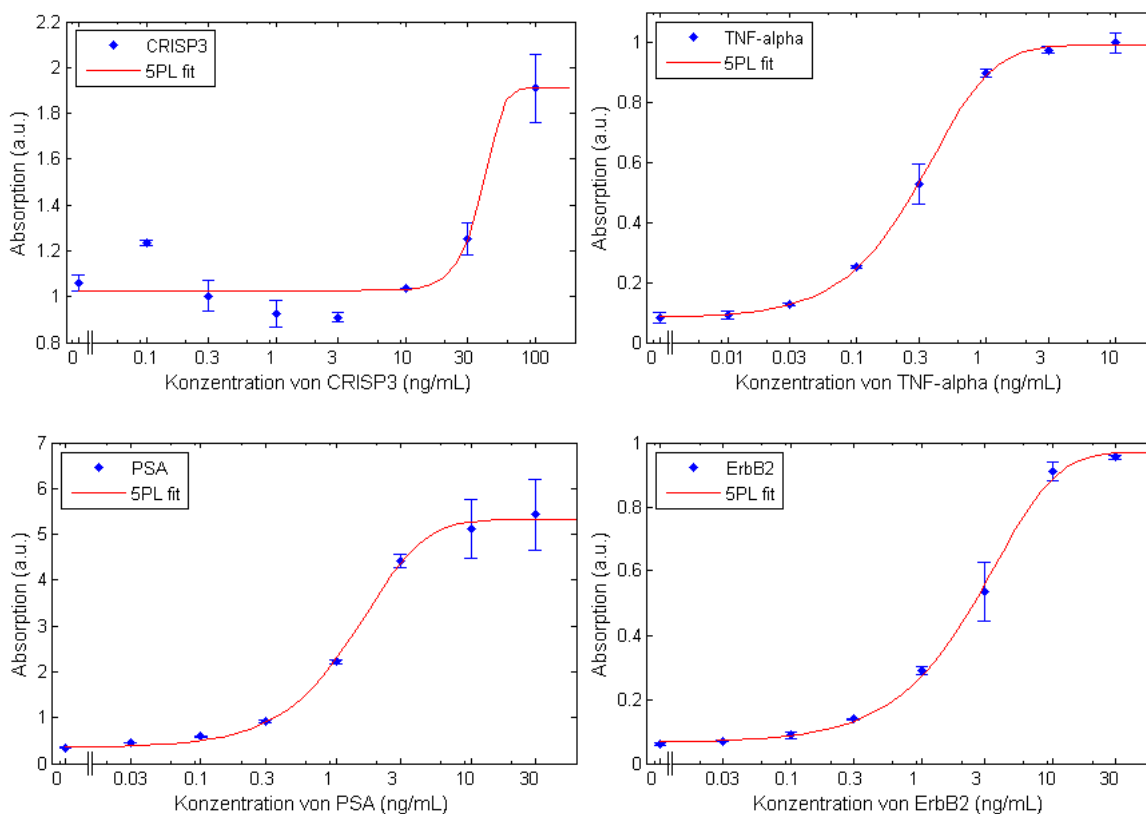


Abbildung 66: ELISA Standardkurven der Proteine CRISP3, TNF-alpha, PSA und ErbB2

Die für ELISA und die partikelbasierte Methode ermittelten Nachweisgrenzen der Proteine und der mittlere Variationskoeffizient der einzelnen Messungen sind in Tabelle 14 zusammen gefasst. Der Variationskoeffizient ist der Quotient aus Standardabweichung und mittlerem Messwert, angegeben in Prozent. Der logistische Fit (5-PL-Fit) umfasst fünf Variablen und beschreibt eine sigmoide Kurve. Die Variablen beschreiben die Werte, an die sich die Kurve bei minus und plus unendlich asymptotisch annähert, eine Variable ist dem Wendepunkt zugeordnet, eine weitere der Steigung im Wendepunkt und die fünfte Variable beschreibt die Symmetrie des Graphen.

Dieser Fit ist für einen Graphen mit nur vier Messwerten wie in Abbildung 60 und Abbildung 61 dargestellt, nicht geeignet. Die Nachweisgrenzen wurden daher wie schon im zugehörigen Abschnitt beschrieben bestimmt. Eine geringere Standardabweichung führt bei gleichem Kontrollwert zu einer geringeren Nachweisgrenze.

Tabelle 14: Vergleich der Proteinnachweisgrenzen mit dem partikelbasierten Assay und mit ELISA

Antigen	LOD ELISA (ng/mL)	VK (%)	LOD Partikel (ng/mL)	VK (%)
CRISP3	23,1	4,2	25	10,5
TNF-alpha	0,03	7,4	3,5	13,8
PSA	0,02	5,7	0,6	9,3
ErbB2	0,03	5,6	2,9	13,4

Die Nachweisgrenzen der Proteine TNF-alpha und ErbB2 gemessen mit ELISA liegen um einen Faktor von etwa 100 unter der Nachweisgrenze im partikelbasierten Test. Für PSA liegt dieser Faktor bei 30. Lediglich die Nachweisgrenze von CRISP3 stimmt in beiden Verfahren in etwa überein. Das generell schlechtere Abschneiden des partikelbasierten Tests kann mehrere Gründe haben. Zum einen wurden die Partikel im Gegensatz zu den Versuchsbedingungen bei ELISA nicht geblockt, was zu einem erhöhten unspezifischen Hintergrundsignal führen kann. Das spezifische Fluoreszenzsignal, verursacht durch Bindung des Antigens, kann durch das unspezifische verdeckt werden und zu einer geringeren Empfindlichkeit des Tests führen. Zudem ist das Probenvolumen bei ELISA 30 Mal größer (100 μ L) als das Probenvolumen des Partikelnachweisverfahrens (hier wurden Probenkammern mit einem Flüssigkeitsvolumen von 3 μ L benutzt). Bei gleicher Antigenkonzentration stehen also im ELISA 30 Mal mehr Antigenmoleküle zur Bindung zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil von ELISA gegenüber dem partikelbasierten Nachweis ist die enzymkatalysierte Signalverstärkung anstelle des Fluoreszenzsignals. Die Fluoreszenz kann zwar ohne Zugabe eines Substrates direkt gemessen werden, was die Durchführung des Immunnachweises vereinfacht und verkürzt, das Signal wird aber nicht verstärkt.

Während einiger Versuche wurde beobachtet, dass die kodierten und mit Antikörpern versehenen Mikropartikel während des Immunassays ausgewaschen werden. Im Laufe des Assays werden die Partikel insgesamt vier Mal mit PBST gewaschen (nach der Immobilisierung, evtl. nach einem Blockschrift, nach Inkubation mit dem Antigen, mit dem Detektionsantikörper und nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper). Das Volumen der Flusszelle beträgt zwischen 3 μ L und 5 μ L, das Volumen eines Waschschriffs im Regelfall 150 μ L, also etwa das 300-fache des Volumens der Flusszelle. Beim Waschen der Flusszelle mit der Computer-gesteuerten Spritzenpumpe wird zwischen den

Inkubationslösungen und der Waschlösung jeweils eine Luftlücke in die Schläuche gelassen, um ein Vermischen der verschiedenen Lösungen zu vermeiden. Infolgedessen wird abwechselnd Luft und Flüssigkeit durch die Flusszelle gepumpt, wodurch Luftblasen in der Flusszelle entstehen können. Die Mikropartikel sind also einerseits der Kraft der durchströmenden Luftblasen als auch der Strömung der Lösung selbst ausgesetzt. Die Biotin-Streptavidin Bindung, mit der die Partikel an der Glasoberfläche immobilisiert sind, sollte nach theoretischen Berechnungen der auf sie wirkenden Scherkraft der Flüssigkeit Stand halten. Das zur Berechnung verwendete Modell bezieht allerdings nicht die durch die Luftlücke induzierte Phasengrenze in Betracht. Beim Eintritt der Flüssigkeit in die Flusszelle nach einer Luftlücke sind die Mikropartikel einer Art Flüssigkeitswelle ausgesetzt, deren Schubkraft die sie immobilisierende Bindung möglicherweise nicht Stand hält. Eine weitere Erklärung für den Verlust von Mikropartikeln während des Assays ist eine unspezifische Bindung von Streptavidin an die Glasoberfläche. Unspezifisch gebundene Streptavidin-Moleküle sind solche, die nicht fest mit der biotinylierten Glasoberfläche verbunden sind, weil sie zum Beispiel als eine zweite Schicht auf der tatsächlich gebundenen Streptavidinschicht aufliegen. Diese Moleküle könnten dem Waschschrift nach Inkubation mit der Streptavidinlösung Stand halten und daraufhin als Anker für die mit biotinylierten Antikörpern versehenen Mikropartikel dienen. Es ist aber durchaus denkbar, dass ein solcher (schlecht fixierter) „Anker“ den auf das Mikropartikel wirkenden Kräften während des Immunassays nicht Stand hält. Aus diesen Gründen wurde als Alternative für die Immobilisierung der Partikel mittels Biotin-Streptavidin eine kovalente Immobilisierungsmethode etabliert.

4.2.4.6 Kovalente Immobilisierung der Partikel und Verbesserung der Nachweisgrenze durch einen Blockschrift

Bei einem weiteren Ansatz wurden vier Partikelpopulation mit Fangantikörpern für CRISP3, TNF-alpha, PSA und ErbB2 versehen. Die Partikel wurden entsprechend 3.2.3.5.2 mit EDC und Sulfo-NHS in den Probenkammern auf einer zuvor carboxylierten Glasoberfläche immobilisiert und nach der Immobilisierung für 20 min geblockt. Es wurden Standardkurven für TNF-alpha in 1% BSA und in Serum gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 67 dargestellt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem Kontrollwert

normalisiert, das heißt das durchschnittliche Fluoreszenzsignal jeder Partikelpopulation wurde durch das des Kontrollwertes (Partikel inkubiert mit reinem Serum oder BSA) geteilt. Auf der y-Achse sind im Folgenden daher die relativen Intensitäten angegeben (relativ zum Kontrollwert). Das Signal der Kontrollprobe wird durch die Normalisierung auf 1 gesetzt. Beispielsweise zeigten Partikel der Population Nr.3, die mit 30 ng/mL TNF-alpha in 1% BSA-Lösung inkubiert wurden, durchschnittlich ein etwa 40 Mal höheres Fluoreszenzsignal als Partikel der gleichen Population, die aber in reiner BSA-Lösung ohne Antigen inkubiert wurden (Abbildung 67, links). Ein 5-PL Fit (siehe 4.2.4.5) wurde zur Berechnung der Nachweisgrenze an die Daten angepasst.

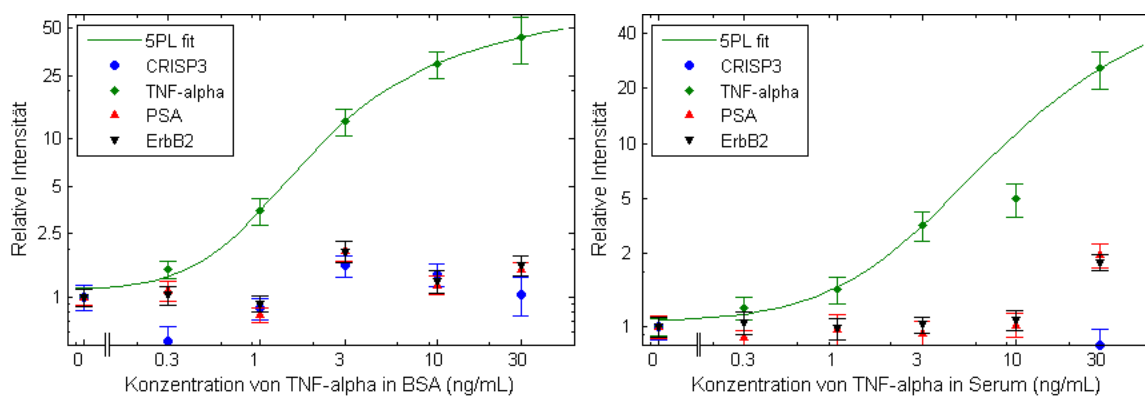


Abbildung 67: Nachweis von TNF-alpha in 1% BSA-Lösung und in Serum im Multiplex-Assay

Bei beiden Experimenten steigt die Fluoreszenzintensität der TNF-alpha detektierenden Partikel mit der Antigenkonzentration, wobei das Hintergrundsignal der weiteren Partikelpopulationen akzeptabel bleibt. Die Daten sind auf einer doppelt logarithmischen Skala aufgetragen. Fluoreszenzunterschiede im unteren Konzentrationsbereich kommen hierdurch besser zur Geltung. Die Nachweisgrenze für TNF-alpha konnte durch Blocken der Partikel um etwa eine Größenordnung gesenkt werden. Sie liegt in 1% BSA-Lösung bei etwa 0,3 ng/mL, in Serum bei etwa 0,4 ng/mL im Gegensatz zu 3,5 ng/mL in 1% BSA ohne Blocken der Partikel (siehe Tabelle 14).

Durch Blocken der Partikel vor Zugabe der Probe konnte auch die Nachweisgrenze für PSA gesenkt werden. Die Assays wurden wie eben beschrieben durchgeführt, nur dass anstelle des Proteins TNF-alpha das Antigen PSA eingesetzt wurde. Die mit dem 5-PL Fit berechneten Nachweisgrenzen liegen bei etwa 0,12 ng/mL in BSA und bei 0,15 ng/mL in

Serum. Hier konnte die Nachweisgrenze etwa um den Faktor 5 verbessert werden (siehe Abbildung 68).

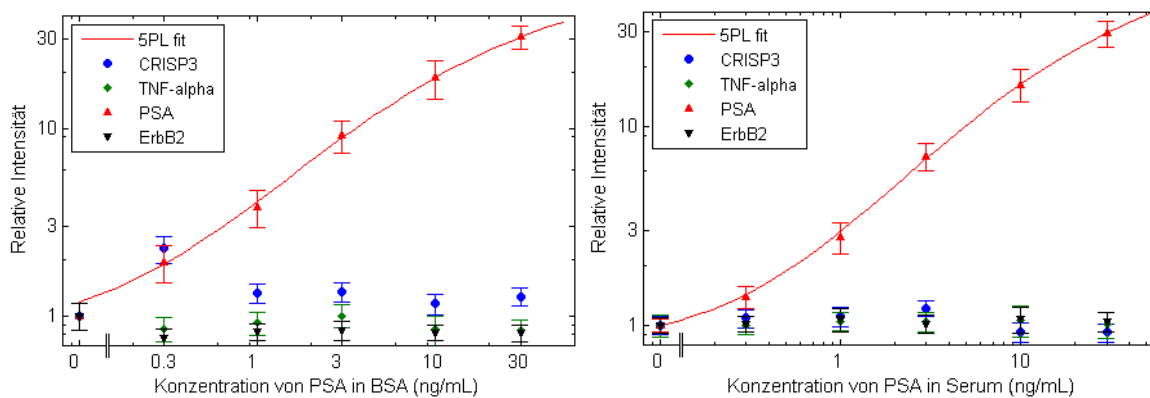


Abbildung 68: Nachweis von PSA in 1% BSA-Lösung und in Serum im Multiplex-Assay

Die Nachweisgrenze für CRISP3 konnte nicht verbessert werden. Ziel der Arbeit war es aber auch nicht, das Verfahren für jeden beliebigen Antikörper zu etablieren, sondern zu demonstrieren, dass das Verfahren (bei geeigneter Auswahl an Antikörpern) für den parallelen Nachweis von Proteinen eingesetzt werden kann. Vor allem Antikörper, die nicht ausdrücklich vom Hersteller für ELISA optimiert und auf Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen bzw. Antikörpern untersucht wurden, können bei diesem Verfahren ein hohes Hintergrundsignal verursachen und damit die theoretisch erreichbare Nachweisgrenze erheblich verschlechtern. Der hier eingesetzte CRISP3-Antikörper wurde vom Hersteller nur im Western Blot getestet und nicht für ELISA optimiert. Die Anforderungen an Antikörper, die im Multiplex-Verfahren eingesetzt werden können, sind nochmals höher als die Anforderungen an Antikörper, die während des Assays lediglich mit einem oder zwei weiteren Antikörpern (wie bei ELISA) in Kontakt kommen (siehe auch 4.2.4.8). Ein Beispiel für einen oftmals in ELISA-Kits verwendeten und optimierten Antikörper ist Interleukin-6 (IL-6). Anstelle des nicht für ELISA optimierten CRISP3-Fangantikörpers wurde daher eine Partikelpopulation mit dem Fangantikörper für IL-6 versehen.

4.2.4.7 Nachweis von ErbB2

Je nach Struktur des Antikörpers kann es vorkommen, dass die Antigenerkennungsstelle durch die Biotinylierung verändert wird oder dass der Biotin-Linker vorwiegend an den

Variablen Teil (an dessen Ende sich die Antigen-Bindungsstelle befindet) des Antikörpers bindet und die Orientierung des Antikörpers auf den Mikropartikeln negativ beeinflusst. In beiden Fällen kann der biotinylierte und am Partikel immobilisierte Antikörper das Zielprotein nicht mehr binden. Eine alternative Methode zur Biotinylierung des Antikörpers ist die kovalente Kopplung der Antikörper an die Mikropartikel mit Hilfe des Crosslinkers EDC (siehe Kap. 3.2.2.3).

Beispielsweise wurde für ErbB2 mit ELISA eine Nachweisgrenze von 30 pg/mL ermittelt, die Nachweisgrenze im partikelbasierten Test mit einem biotinylierten ErbB2-Fangantikörper ist aber um zwei Größenordnungen schlechter. Die Nachweisgrenzen anderer Proteine unterschieden sich weniger drastisch. Im Falle des ErbB2-Fangantikörpers wurde daher vermutet, dass dieser an einer ungünstigen Stelle biotinyliert wurde oder bei der Biotinylierung aggregierte. Anstelle des biotinylierten Antikörpers wurde folglich der ErbB2-Fangantikörper kovalent an eine Partikelpopulation gekoppelt und im Immunnachweis eingesetzt. Hier wurde in einem Experiment nur die Partikelpopulation mit ErbB2-Fangantikörpern eingesetzt (siehe Abbildung 69 links) und in einem weiteren Experiment wurden vier Partikelpopulationen mit den Zielproteinen ErbB2, TNF-alpha, PSA und IL-6 kovalent im Fluidkanal immobilisiert (siehe Abbildung 69 rechts).

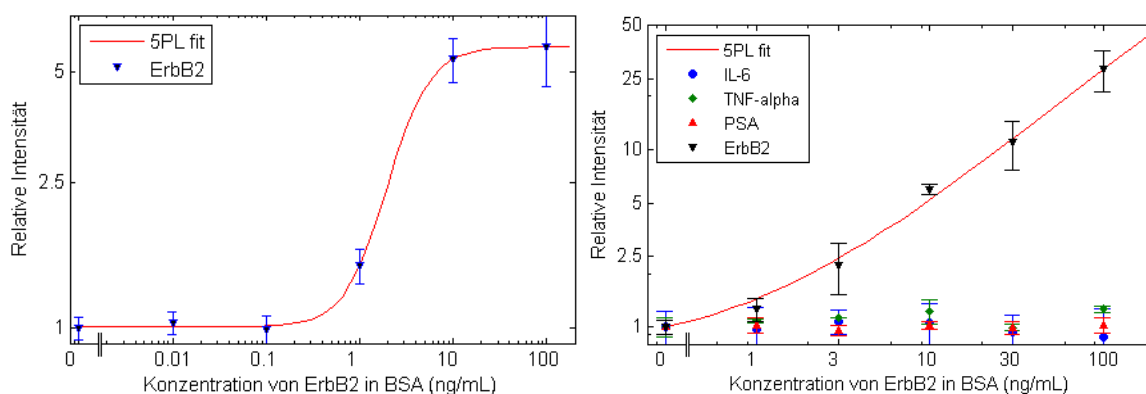


Abbildung 69: Nachweis von ErbB2 mit nur einer Partikelpopulation (links) und im Multiplex-Verfahren (rechts)

Die Partikel wurden geblockt, gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen an ErbB2 in 1% BSA-Lösung inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie schon in 4.2.4.6 beschrieben.

Die Standardkurven wurden mit dem 5PL-Fit ermittelt, das Bestimmungsmaß betrug jeweils 0,99 und die Nachweisgrenze für ErbB2 liegt bei etwa 0,5 ng/mL für das Experiment mit nur einer Partikelpopulation und bei 0,6 ng/mL für das Experiment mit 4 Partikelpopulationen. Das ist eine Verbesserung um den Faktor 6 im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem biotinylierten Antikörper, jedoch liegt die Nachweisgrenze immer noch um einen Faktor von etwa 20 über der Nachweisgrenze mit ELISA. Die niedrigere Nachweisgrenze ist sowohl auf den Blockschrift als auch auf die kovalente Bindung des Antikörpers an die Partikel zurückzuführen.

4.2.4.8 Immunassays für den parallelen Nachweis von Proteinen II

Wie in Kap. 4.2.4.6 wurden bei den im Folgenden vorgestellten Experimenten die Mikropartikel nicht via Streptavidin-Biotin, sondern mit EDC kovalent an carboxylierte Glasträger gebunden. Die genaue Prozedur für die Immobilisierung der Partikel wurde bereits in 3.2.3.5.2 beschrieben. Wieder wurden vier verschieden kodierte Partikelpopulationen eingesetzt, die zuvor mit biotinylierten Fangantikörpern für die Proteine IL-6, IL-8, PSA und TNF-alpha versehen wurden. In Abbildung 70 sind die Fluoreszenzintensitäten der eingesetzten Populationen in den beiden kodierenden Fluoreszenzkanälen dargestellt.

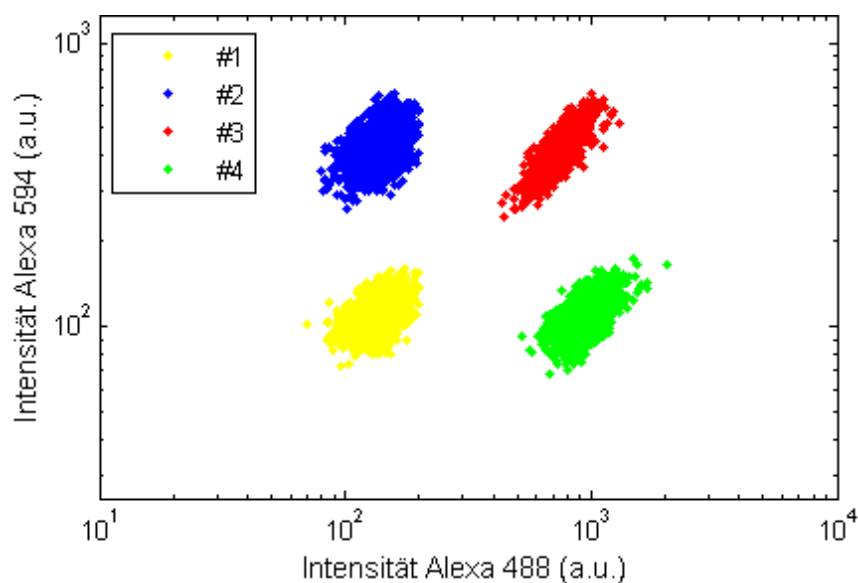


Abbildung 70: Fluoreszenzintensitäten vier kodierter Partikelpopulationen

Tabelle 15: Im Multiplex-Versuch eingesetzte Mikropartikel

Population Nr.	Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 488 (Moleküle pro Mikropartikel)	Zielprotein
1	~ 6.000 / ~6.000	IL-8
2	~ 60.000 / ~6.000	TNF-alpha
3	~ 6.000 / ~60.000	PSA
4	~ 60.000 / ~60.000	IL-6

Die Antigene wurden entweder in 1% BSA-Lösung oder direkt in Serum verdünnt, um zu testen, ob das Immunnachweisverfahren auch für klinisch relevante Patientenproben angewandt werden könnte. Die Ergebnisse der Multiplex-Versuche sind in Abbildung 71 dargestellt. Die Daten wurden, wie zuvor beschrieben, normalisiert und 5-PL Fits wurden in Matlab berechnet und über die Daten gelegt. Der Fit ist jeweils als durchgehende Linie in Abbildung 71 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß des 5-PL Fit betrug jeweils 0,99 oder höher.

Für TNF-alpha ist nicht die relative Intensität, sondern sind die Rohdaten dargestellt. Diese Auftragung wurde gewählt, um das hohe Hintergrundsignal der Partikelpopulation Nr. 2 mit dem Zielprotein TNF-alpha hervorzuheben.

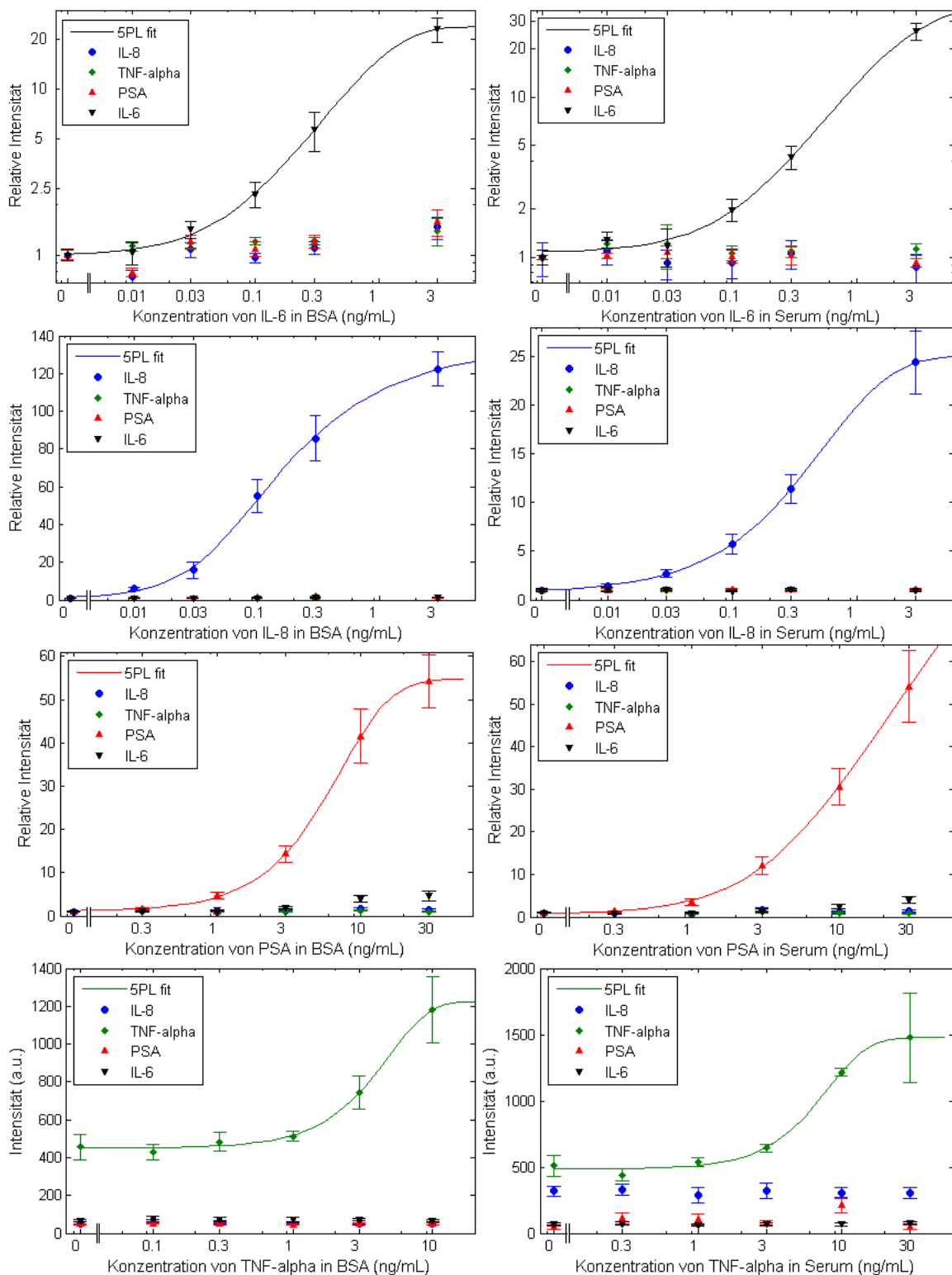


Abbildung 71: Paralleler Nachweis von Antigenen mit vier Partikelpopulationen in 1% BSA-Lösung (links) und in Serum (rechts)

Die Fluoreszenzintensität aller Partikel in der Kontrollprobe ohne Antigen sollte in etwa auf gleichem und relativ niedrigem Niveau liegen (< 100). Die Population 2 zeigt aber, wie in Abbildung 71 d ersichtlich, selbst bei der Kontrollprobe eine hohe Fluoreszenzintensität

(etwa 500). Dieser Umstand lässt sich nur durch unspezifische Bindungen der „falschen“ Antikörper an die Fangantikörper für TNF-alpha auf Population 2 erklären. Ab einer gewissen TNF-alpha Konzentration erscheint das spezifische Signal über dem Hintergrund, das unspezifische Signal erhöht aber die Nachweisgrenze für TNF-alpha erheblich im Gegensatz zur theoretisch möglichen Nachweisgrenze.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein ELISA mit mehreren TNF-alpha Verdünnungen durchgeführt. Eine Probenreihe diente als Kontrolle, hier wurde zum Nachweis von TNF-alpha der polyklonale Antikörper gegen TNF-alpha (pAk TNF-alpha) in Kombination mit dem entsprechenden Sekundärantikörper eingesetzt (siehe Abbildung 72, A). In zwei weiteren Probenreihen wurden polyklonale Antikörper gegen IL-6 und gegen IL-8 (pAk IL-6 bzw. pAk IL-8), also die „falschen“ Antikörper, mit den entsprechenden Sekundärantikörpern eingesetzt (Abbildung 72, B und C). In den Probenreihen B und C wurde zwar das Antigen TNF-alpha zugefügt, jedoch kein TNF-alpha Detektionsantikörper.

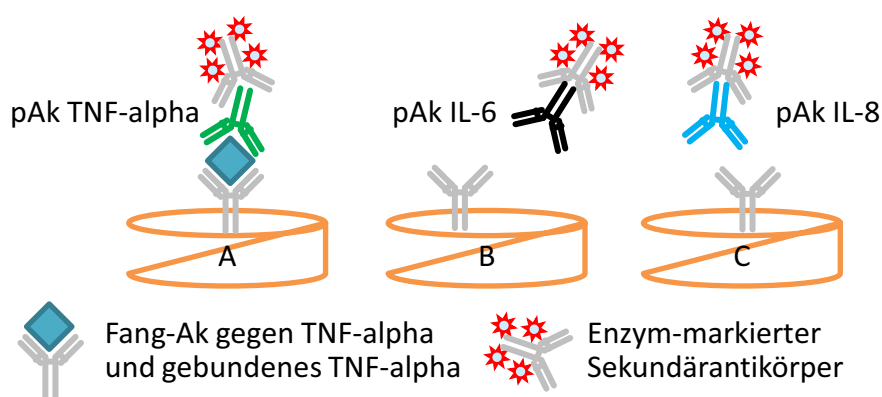


Abbildung 72: Schematische Darstellung des ELISAs zur Überprüfung unspezifischer Bindungen

Die Antikörper gegen IL-6 und IL-8 sollten weder an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Fangantikörper gegen TNF-alpha noch an das Protein selbst binden, die gemessenen Werte dieser Probenreihen (B und C in Abbildung 72) sollten daher in etwa dem Kontrollwert ohne Antigen der TNF-alpha Standardkurve entsprechen. Die Messwerte der Kontrollprobenreihe (A in Abbildung 72) mit dem Detektionsantikörper für TNF-alpha sollten eine für ELISA übliche Standardkurve ergeben. Der Graph in Abbildung 73 zeigt die Absorption der Probenreihen in Abhängigkeit der Antigen-Konzentration.

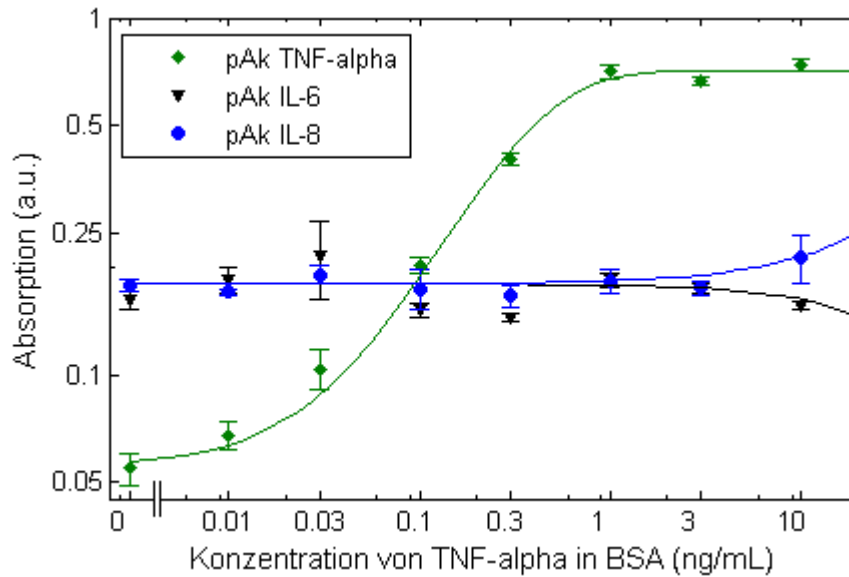


Abbildung 73. Standardkurve von TNF-alpha mit verschiedenen Detektionsantikörpern

Wie aus dem Graphen ersichtlich ist, zeigen auch die Probenreihen, die nur ein geringes Hintergrundsignal hervorrufen sollten (blau und schwarz), eine von der Antigenkonzentration unabhängige und relativ hohe Absorption. Dieses Ergebnis belegt die schon zuvor gestellte Hypothese, dass zwischen den Detektionsantikörpern für IL-6 und für IL-8 und dem Fangantikörper für TNF-alpha unspezifische Bindungen auftreten, die eine Messung geringer Konzentrationen an TNF-alpha im Multiplex-Assay verhindern. Die gleich bleibenden Absorptionswerte der beiden Probenreihen pAk IL-6 und pAk IL-8 weisen darauf hin, dass die beiden „falschen“ Detektionsantikörper nicht an das Protein selbst binden. Würden sie an das Antigen binden, so wäre in Abbildung 73 eine mit der Antigenkonzentration steigende Absorption zu beobachten. Es ist ersichtlich, dass eine Addition der drei Kurven in Abbildung 73 in etwa die Standardkurve von TNF-alpha in Abbildung 71 ergibt. Bei ELISA werden normalerweise nur ein spezifischer Fangantikörper, ein Detektionsantikörper und ein Sekundärantikörper (oder ein anderes Nachweisreagenz) verwendet. Im Multiplex-Verfahren dagegen wird eine Mischung aller Antikörper für alle Zielproteine verwendet. In den vorgestellten Beispielen entspricht das, wie gesagt, vier verschiedenen an den Partikeln immobilisierten Fangantikörpern, vier Detektionsantikörpern und zwei fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern. Der Einsatz vieler verschiedener Reagenzien in nur einem Assay erhöht die Gefahr von Kreuzreaktionen, wie am Beispiel von TNF-alpha deutlich zu erkennen ist.

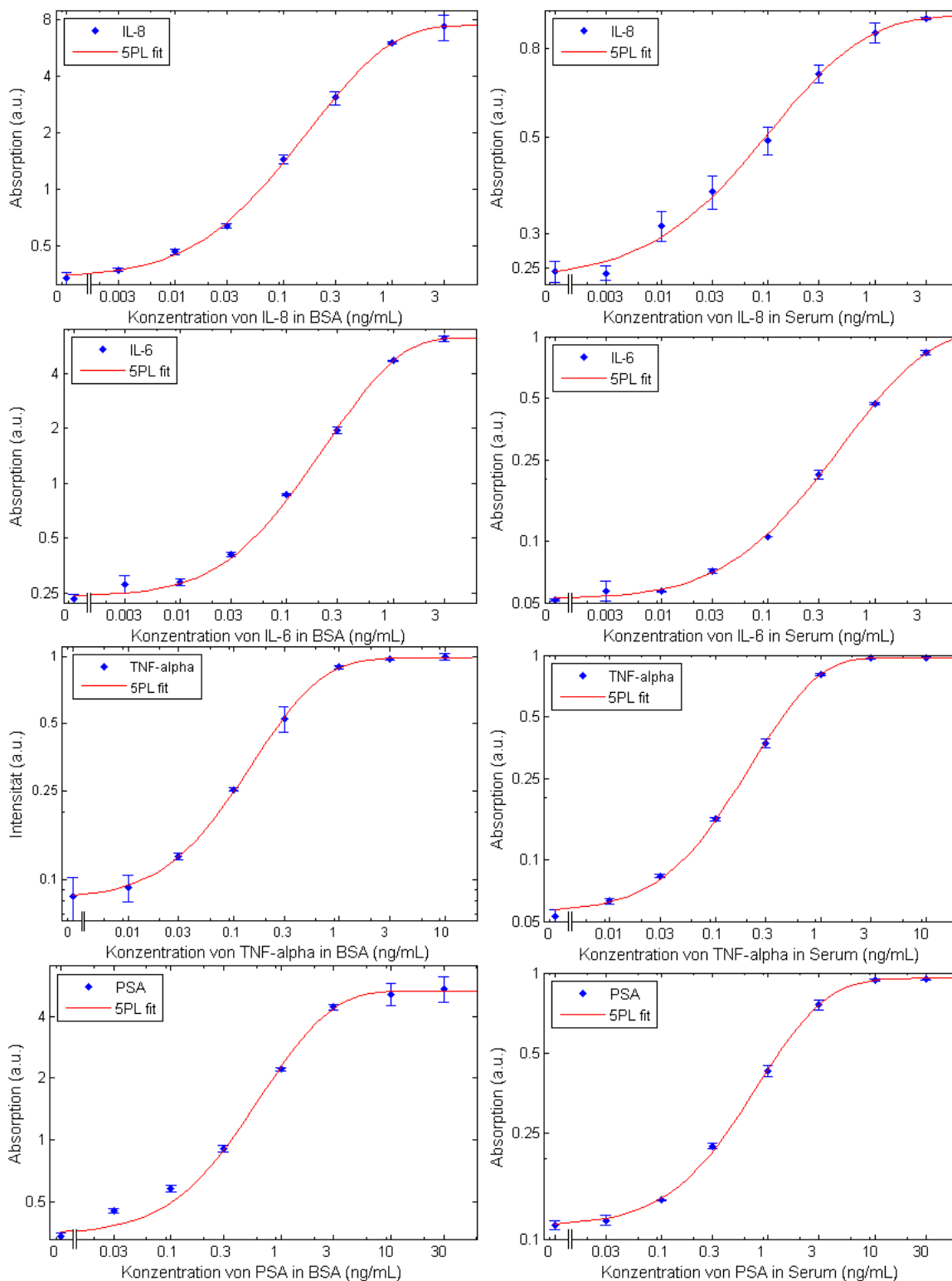


Abbildung 74: ELISA Standardkurven der Proteine IL-8, IL-6, TNF-alpha und PSA in 1% BSA und Serum

Die Nachweisgrenzen für die Antigene IL-6, IL-8, TNF-alpha und PSA wurden auch mit ELISA bestimmt. Die Standardkurven der Proteine in 1% BSA-Lösung und in Serum sind in Abbildung 74 dargestellt. Alle Kurven wurden, wie schon zuvor beschrieben, mit dem 5-PL

Fit in Matlab berechnet. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) war für alle Standardkurven größer als 0,99. Auch die Nachweisgrenzen wurden wie zuvor beschrieben berechnet.

Tabelle 16 stellt eine Übersicht der Nachweisgrenzen und der Variationskoeffizienten der Proteine gemessen mit ELISA und dem Partikel basierten Verfahren dar.

Tabelle 16: Vergleich der Nachweisgrenze der Proteine IL-6, IL-8, PSA und TNF-alpha ermittelt mit dem Partikel basierten Verfahren und ELISA

Antigen	ELISA (pg/mL)		Partikel basierter Nachweis (pg/mL)	
	in 1% BSA (VK)	in Serum (VK)	in 1% BSA (VK)	in Serum (VK)
IL-6	4,3 (4,0%)	2,2 (3,0%)	16,7 (10,9%)	22,3 (14,0%)
IL-8	4,5 (5,9%)	15,0 (6,6%)	1,1 (11,3%)	7,8 (12,3%)
PSA	15,8 (5,7%)	36,3 (2,7%)	81,1 (13,7%)	212,3 (16,2%)
TNF-alpha	26,3 (7,4%)	13,0 (2,7%)	1700 (9,9%)	3210 (17,3%)

Die Nachweisgrenze von IL-8 in BSA im Partikel basierten Verfahren liegt bei nur 1 pg/mL im Vergleich zu einer Nachweisgrenze von 5 pg/mL in BSA im ELISA. Die Nachweisgrenzen von IL-6 sind PSA sind in beiden Verfahren ähnlich, bzw. im Partikel basierten Verfahren etwas höher. Die Nachweisgrenze von TNF-alpha im Multiplex-Verfahren ist zwei bis drei Größenordnungen höher als im ELISA. Der Grund hierfür ist die bereits erwähnte Kreuzreaktion der IL-6 und IL-8 Detektionsantikörper mit dem Fangantikörper gegen TNF-alpha. Die Nachweisgrenze der einzelnen Proteine hängt, wie auch die Experimente dieser Arbeit zeigten, einerseits von der Qualität der eingesetzten Antikörperpaare, als auch von den Versuchsbedingungen ab. Insbesondere spielen Antikörperkonzentration, Inkubationszeit, Inkubationstemperatur und Blocksubstanzen eine bedeutende Rolle. Obwohl bei dem partikelbasierten Multiplex-Verfahren das Signal nicht enzymatisch verstärkt wird und das Probenvolumen erheblich kleiner ist als bei ELISA (3 µL oder 5 µL pro Flusszelle im Gegensatz zu 100 µL pro well), wurde hier gezeigt, dass Proteine im Multiplex-Verfahren in ähnlich geringen Konzentrationen wie mit ELISA nachgewiesen werden können. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens hängt maßgeblich von der Qualität der Antikörper und der Hintergrundfluoreszenz, verursacht durch unspezifische Bindungen von Probenbestandteilen und Antikörpern an die Partikeloberfläche, ab.

5 Resümee und Ausblick

Im Vergleich zu anderen Immunnachweisverfahren mit optisch kodierten Mikropartikeln [23, 24] hat die hier vorgestellte Methode verschiedene Vorteile. So ist die Strategie für die Kodierung der Mikropartikel skalierbar und auch mit anderen kommerziell erhältlichen Mikropartikeln einfach zu implementieren. Jeder beliebige biotinylierte Antikörper kann an die kodierten Mikropartikel gebunden werden. Die verschiedenen Partikelpopulationen können je nach Bedarf gemischt und innerhalb kurzer Zeit in geordneten Arrays oder auf funktionalisierten Glasträgern immobilisiert werden. Zudem kann die Plattform in mikrofluidische Systeme mit automatisierter Probenhandhabung und Probenanalyse integriert werden. In anderen Multiplex-Verfahren erfolgt die Probenvorbereitung oft auf anderen Plattformen (z.B. Filter-Mikrotiterplatten) als die Probenanalyse. Die Proben werden danach erst in die Analysekommer (z.B. einen Durchflusscytometer) überführt. Die hier vorgestellte Flusszelle ist im Gegensatz dazu zugleich der Ort der Probenvorbereitung und der Analyse selbst. Die gesamte Flusszelle kann direkt per Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden. Für ELISA werden typischerweise zwischen 100 μL und 200 μL Antikörper- und Probenlösung verwendet. Für eine Dreifachmessung von vier Proteinen würden einschließlich Fang- Detektions- und Sekundärantikörper 1 mL bis 2 mL Reagenzien benötigt, wohingegen die Probenkammern der Flusszelle mit nur je 5 μL Reagenzien auskommen. Da in einer Probenkammer mehrere Tausend Mikropartikel Platz haben, werden zur Analyse vieler Proteine gleichzeitig insgesamt nur 15 μL Reagenzien benötigt. Durch den geringeren Verbrauch an Reagenzien können Kosten gespart werden, während gleichzeitig viele Proteine parallel analysiert werden können.

Es wurde gezeigt, dass mit drei verschiedenen Fluorophoren in drei Intensitätsniveaus mindestens 27 Mikropartikel-Populationen kodiert und auch wieder entschlüsselt werden können. Vier Partikelpopulationen wurden zur Analyse von vier Antigenen verwendet, die in Serum oder in 1% BSA-Lösung verdünnt wurden. Die erreichten Nachweisgrenzen des Multiplex-Verfahrens mit Antikörperpaaren, die eine ausreichend geringe Kreuzreaktivität aufweisen, liegen im Bereich der Nachweisgrenzen konventioneller Verfahren (ELISA).

In einem Abstand von je 2 μm könnten auf einer Fläche von 100 μm x 100 μm bis zu 2500 Mikropartikel platziert werden. Dieser Partikelabstand ist in einem geordneten Array für die automatisierte Auswertung mit einem entsprechenden Makro ausreichend. Wenn je 10 kodierte Partikel eine Population zur Analyse eines Proteins darstellen, so könnten 250 Proteine parallel auf dieser Fläche untersucht werden, die gerade mal so groß ist wie die Fläche nur eines Testfeldes auf einem konventionellen Antikörper-Mikroarray.

Wahrscheinlich kann die Empfindlichkeit des Multiplex-Verfahrens durch Optimierung der Versuchsbedingungen und durch Verwendung eines Objektivs mit höherer numerischer Apertur weiter verbessert werden. Wie bei anderen Multiplex-Verfahren auch, stellt aber die Verfügbarkeit hoch spezifischer Antikörperpaare mit minimaler Kreuzreaktivität die größte Einschränkung dar. Für den gleichzeitigen Nachweis von nur vier Proteinen wurden hier zehn verschiedene Antikörper verwendet. Mit einer besseren Auswahl könnte diese Zahl um eins reduziert werden, aber generell bedarf es pro Zielprotein einem Antikörperpaar und einem fluoreszierendes Reagenz. Im besten Fall ist das fluoreszierende Reagenz für alle Detektionsantikörper das gleiche oder der Detektionsantikörper selbst. Beispielsweise kann, wenn alle Detektionsantikörper aus dem gleichen Organismus stammen, auch der gleiche fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (Anti-Spezies) für alle Detektionsantikörper verwendet werden. Es gibt zwar eine große Auswahl fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, doch für die meisten Proteine gibt es keine fluoreszenzmarkierten Primärantikörper (in dieser Arbeit durchgehend Detektionsantikörper oder Fangantikörper genannt). Im Prinzip ist es möglich, den Detektionsantikörper mit Fluorophoren zu konjugieren, die Schwierigkeiten dabei sind aber ähnlich denen der Biotinylierung von Antikörpern. Hierdurch könnten die Anzahl der beteiligten Reagenzien und die Durchführungsdauer des Assays reduziert werden. Auch denkbar wären Detektionsantikörper oder Sekundärantikörper, die mit kurzen DNA-Strängen anstelle von Fluorophor-Labeln versehen sind. Als Reportermolekül könnte dann eine komplementäre und mit Fluoreszenzmolekülen versehene DNA-Sequenz eingesetzt werden. Kommerziell erhältliche fluoreszenzmarkierte Antikörper sind meist nur mit 4 oder 5 Fluorophormolekülen pro Antikörper versehen; die DNA dagegen könnte relativ einfach mit Hunderten von Fluorophoren versehen werden. Kurze mit Fluorophoren endende Komplementärsequenzen können innerhalb weniger Minuten an

die Reporter-DNA hybridisieren und damit der Signalverstärkung dienen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung eines Detektionsantikörpers, der mit einem Enzym, dessen Produkt am Boden der Fluidkammer präzipitiert, versehen ist [88]. Auch dieser Ansatz verspricht eine erhöhte Empfindlichkeit des Tests.

Eine weitere Anwendung des hier vorgestellten Verfahrens besteht in der RNA- oder DNA-Analytik. Anstelle eines Immunnachweises könnten Sonden für Nukleinsäuren und Fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren als Reportersystem eingesetzt werden.

Auch die Anzahl der kodierten Partikelpopulationen könnte zum einen durch den Einsatz weiterer Farbstoffe und weiterer Intensitätsniveaus verbessert werden oder zum anderen durch ein positionelles Kodierungsverfahren erweitert werden, bei dem die Partikelpopulationen in mehreren Schritten immobilisiert werden. Nach jeder Immobilisierung wird ein Bild der Partikel aufgenommen. So könnten die gleichen Kodierungen mehrfach verwendet werden und es würde ein Array aus positionskodierten und fluoreszenzkodierten Partikeln entstehen.

Bezüglich einer klinischen Anwendung birgt die Methode ähnliche Möglichkeiten wie partikelbasierte Immunnachweisverfahren, bei denen das Auslesen der Signale und Codes mittels eines Durchflusscytometers erfolgt. Die Software für die Dekodierung und Darstellung der Daten ließe sich leicht in bestehende Systeme integrieren, allerdings muss der Anwender an Stelle eines Durchflusscytometers über ein Fluoreszenzmikroskop verfügen. Im Prinzip könnten bereits entschlüsselte Arrays für eine beliebige Kombination von Zielproteinen angefertigt werden, bei denen lediglich eine kleine Markierung zum Bestimmen der Partikelpositionen angebracht wird. In solchen Arrays könnte auch die Fluoreszenzkodierung der Partikel durch Photobleaching entfernt werden, so dass der Anwender die freie Auswahl für einen Reporterfarbstoff hat. Auf diese Weise würde ein Mikroskop mit einer Lichtquelle und nur einem Fluoreszenzfiltersatz oder einem einzelnen Laser zur Anregung der Reportermoleküle ausreichen. Flusscytometer, die für die Entschlüsselung von Partikelcodes ausgelegt sind, verfügen normalerweise über mindestens drei Laser.

Multiplex-Systeme führender Anbieter (z.B. Luminex) basieren auf Suspensions-Analysen, die einen höheren Probenbedarf haben als das hier vorgestellte System. Das geringe Probenvolumen, das in diesem Verfahren benötigt wird, zusammen mit der Möglichkeit, mehrere Proteine parallel zu analysieren, verspricht auch einen möglichen Einsatz bei der Analyse einzelner Zellen [89, 90]. Die Zellen könnten direkt auf dem Array aufgeschlossen und deren Proteininhalt analysiert werden. Das kleine Probenvolumen sollte auch die Analyse eines einzelnen Blutstropfens ermöglichen, der einem Patienten mit einem Nadelstich in einen Finger entnommen werden könnte. Die Probe könnte durch einen kleinen vorgeschalteten Filter geleitet werden, um die roten Blutzellen abzutrennen und eine Analyse des Blutplasmas zu ermöglichen. Die hier vorgestellten Versuche in Serum sind ein starkes Indiz im Hinblick auf die Kompatibilität des Systems mit „echten“ Patientenproben. Der geringe Probenbedarf der Fließkammer und die Möglichkeit zur Automatisierung des Assays stellen dabei einen enormen Vorteil gegenüber anderer Verfahren dar.

6 Anhang

6.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient der qualitativen Analyse von Proteinen. Die Proteine werden dabei im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) im Probenpuffer (Laemmli-Puffer) überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass die Proteine eine konstante negative Eigenladung pro Masseinheit aufweisen.

Die Glasplatten werden mit Ethanol gereinigt und in die Halterung eingesetzt. Dann wird das Trenngel zwischen die Platten gegossen. Das engmaschige Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet, welches den Kontakt des Trenngels mit Luftsauerstoff unterbindet. Die Polymerisation des Trenngels würde durch Luftsauerstoff verhindert werden. Nach ca. 30 min ist das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol kann abgegossen werden. Auf das Trenngel wird das Sammelgel gegossen. Ein Kamm wird so eingesetzt, dass keine Luftblasen im Sammelgel vorhanden sind. Nach Auspolymerisieren wird der Kamm herausgezogen und die entstandenen Taschen mit einem Zelltuch getrocknet. Die Platten werden in die Elektrophorese-Einrichtung (Mini-Protean Tetra Cell, Biorad) eingesetzt und diese wird mit Laufpuffer aufgefüllt.

SDS-PAGE	10% Trenngel	5% Sammelgel
Endvolumen	10 mL	4 mL
Wasser	4 mL	2,3 mL
Acrylamid	3,3 mL	670 µL
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 mL	
0,5 M Tris pH 6,8		1 mL
10% APS (Ammoniumpersulfat)	100 µL	40 µL
10% SDS (Natriumdodecylsulfat)	100 µL	40 µL
TEMED (N,N,N,N,-Tetramethyldiamin)	4 µL	4 µL

Laufpuffer (10x)	M in g/mol	m in g	V in mL
Tris, pH 8,3	121,14	30,3	
Glyzin	75,07	187,7	
SDS 10%	288,38	10,0	
Wasser			ad. 1 L

Die Proben werden mit dem gleichen Volumen Laemmli-Puffer versetzt und danach für 5 bis 10 min bei 95°C erhitzt. 10 µL von der denaturierten Probe und 5 µL eines Protein-Markers werden in die Taschen pipettiert. Aufgrund des Glycerins im Ladepuffer sind die Proben schwerer als Wasser und sinken somit in die Geltaschen. Die Gelelektrophorese läuft für 45 min bei 160 V. Danach wird die Gelapparatur abgebaut. Die beiden Platten werden vorsichtig mit einem Spatel auseinandergehebelt und das Gel kann angefärbt werden. Der Laemmli-Puffer ist ein Tris-HCl/Tris-Glyzin Puffer. Dieser enthält u.a. DTT (Dithiothreitol), welches die Disulfidbrücken von Proteinen spaltet. Der Farbstoff, Bromphenolblau, im Laemmli-Puffer dient zur Beobachtung der Lauffront der Proben.

Laemmli-Puffer (2x)				
50% (w/v) Glycerin	2,38 mL	für je 1 L	Färbelösung	Entfärbelösung
7,5% SDS	2 mL	Eisessig	100 mL	100 mL
250 mM Tris-HCl, pH 8	1,25 mL	Ethanol	250 mL	250 mL
0,5% Bromphenolblau	Spatelspitze	Wasser	650 mL	650 mL
Dithiothreitol	0,15 g	Coomassie-Blau	1,5 g	-
Wasser	ad. 10 mL			

Das Anfärben des Gels erfolgt mit einer Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischung und dem Farbstoff Coomassie-Blau. Die SDS-PAGE wird in die Coomassie-Lösung gelegt und bei 80 W 15 min in der Mikrowelle erhitzt. Das Gel ist nun angefärbt. Damit nur die Proben angefärbt bleiben, muss das Gel wieder entfärbt werden. Hierzu wird das Gel in dieselbe Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischung, aber ohne den Farbstoff Coomassie-Blau gelegt. Das Gel wird zweimal für 10 min bei 80 W in der Mikrowelle erhitzt. Zwischendurch wird die Entfärbelösung gewechselt. Nach dem Entfärben sind nur noch die Proben und der Protein-Marker gefärbt.

6.2 Polymerasekettenreaktion mit Barcode-DNA

Für jeden Reaktionsansatz werden 5 µL der zu untersuchenden Probe (template), 2 µL 10x PCR-Puffer, 1 µL Taq-Polymerase (0,5 u/µL), 0,75 µL Vorwärts-Primer (10 µM, 5' TGGCCATGGAACAGGTAGC), 0,75 µL Rückwärts-Primer (10 µM, 5' GATGGCGATGTTAATGGGC), 0,4 µL dNTP-Mix, 0,4 µL DMSO und 10,6 µL H₂O gemischt.

Das Endvolumen beträgt jeweils 20 μL . Bei jeder PCR wird eine Positivkontrolle (0,5 pmol komplementäre Barcode-DNA) und eine Negativkontrolle (H_2O) einbezogen. Die PCR wird in einem Thermocycler (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems) nach folgendem Temperaturschema durchgeführt.

Schritt	T in $^{\circ}\text{C}$	t			
Denaturierung	95	2 min			
Denaturierung	95	30 s	} 25 x		
Hybridisierung	60	30 s			
Elongation	72	30 s			
Elongation	72	2 min			
Ende	8	∞			

DNA-Ladepuffer, 10x	M in g/mol	m in g
30% Glycerin		6 mL
0,05 M EDTA	292,25	0,1461
0,25% Xylencyanol	528,6	0,025
0,25% Bromphenolblau	691,9	0,025
Wasser		6,25 mL

Zu jedem Ansatz werden 2 μL 10x DNA-Ladepuffer gegeben. Das Glycerin im Ladepuffer erleichtert das Einsinken der Probe in die Geltaschen. Die Auswertung der PCR erfolgt durch Gelelektrophorese entweder mit einem Agarose- oder einem Polyacrylamidgel.

6.3 DNA-PAGE

Das Polyacrylamidgel wird wie genau wie ein SDS-Gel hergestellt, doch statt des 10% Trenngels und des 5% Sammelgels wird ein 12% Acrylamidgel gegossen. Nach Auspolymerisieren werden 10 μL der PCR Produkte, zu denen 1 μL DNA-Ladepuffer gegeben wurde, und 2 μL des DNA-Markers in die Geltaschen pipettiert. Der Kathodenraum wird mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), pH 8 aufgefüllt. Es wird eine Spannung von 120 V für 45 min angelegt. Nach Aushebeln der Glasplatte wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung für 20 min inkubiert. Unter UV-Licht werden die Nukleinsäuren sichtbar.

12% Acrylamidgel		TBE (10x), pH 8		
		M in g/mol	m in g	
Wasser	5 mL		1 M Tris	121,14
Acrylamid	4 mL		0,02 M EDTA	292,25
10-fach TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	1 mL		0,5 M Borsäure	61,84
10% APS (Ammoniumpersulfat)	70 μL		Wasser	ad. 1 L
TEMED (N,N,N,N,-Tetramethyldiamin)	5 μL			

6.4 DNA-Gelelektrophorese (Agarosegel)

Zur Herstellung eines 2% Agarosegels werden 0,8 g Agarose in 40 mL 1x TBE-Puffer gelöst. Die Mischung wird aufgekocht und während das Gel noch flüssig ist werden 2 µL 1% Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Das Gel wird in den Gelschlitten gegossen, ein Kamm wird eingesetzt und die Lösung erkaltet bei RT. Der Schlitten wird in die Apparatur mit 1x TBE-Puffer gelegt und der Kamm wird herausgezogen. 10 µL jeder Probe werden in die Taschen pipettiert. In die erste Tasche werden 4 µL DNA-Marker (Kat. Nr. 25-3110, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland) eingefüllt. Die Apparatur wird verschlossen und es wird eine Spannung von 120 V für 25 min angelegt. Das Gel wird in einer Geldokumentieranlage mit UV-Licht bestrahlt und die Nukleinsäuren werden sichtbar (Typ Image Master, Amersham Pharmacia Biotech).

6.5 Western Blot

Es werden eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) in 100% Methanol und zwei Filterpapiere, sogenannte Blotpapiere, sowie das SDS-Gel in Blotpuffer äquilibriert. Die Graphitelektroden des Blotgerätes werden mit Wasser angefeuchtet. Das Filterpapier wird luftblasenfrei auf die untere Blotapparatur, die Anode, positioniert. Die PVDF-Membran wird kurz mit Blotpuffer gewaschen und luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Das SDS-Gel wird nun auf die Membran platziert und mit dem Filterpapier wird das Blotsandwich (Blotpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Blotpapier) abgeschlossen. Nun wird die obere befeuchtete Blotapparatur auf das Blotsandwich gesetzt. Es wird eine Spannung von 3 mA/cm² Membran angelegt. Nach einer Stunde wird die Blotapparatur ausgeschaltet und die Membran in PBS aufbewahrt. Die Proteine wurden auf die Membran übertragen und können von den Antikörpern erkannt werden.

Blotpuffer (10x)		PBS, pH 7,4 (10x)	
Glyzin	145 g	NaCl	80 g
Tris	29 g	KCl	2 g
Wasser	ad. 1 L	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
		KH ₂ PO ₄	2,4 g
		Wasser	ad. 1 L

Die PVDF-Membran wird in 10% Milchpulver (5 g Milchpulver in 50 mL PBS-Puffer) für eine Stunde auf dem Schwenktisch inkubiert. Die Milchproteine lagern sich an die freien Stellen auf der Membran an. Dadurch werden freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert, was die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers unterbinden soll. Die Membran wird dreimal für 10 min in PBST (1 L PBS und 3 mL Tween20) gewaschen. Eine Antikörperlösung wird aus 2 mL 5% Milchpulver (2,5 g Milchpulver in 50 mL PBS) und monoklonalem Primärantikörper hergestellt. Die Membran wird mit der Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch (Rotoshake Genie, Scientific Industries) inkubiert. Danach wird die Membran dreimal in PBS + Tween20 gewaschen. Eine zweite Antikörperlösung wird aus 2 mL 5% Milchpulver und Sekundärantikörper hergestellt. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase kovalent verbunden. Die Membran wird für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert. Danach wird die Membran erneut dreimal mit PBS + Tween20 gewaschen. Nun wird eine Luminollösung auf die Membran pipettiert. Das Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Umsetzung von Luminol zu einem chemilumineszierenden Produkt, welches mit einem Detektionsgerät und entsprechenden Filtern gemessen werden kann.

6.6 Programm für den automatisierten Biobarcode-Assay

Die Automatisierung des Assays erfolgte mit dem Magnetseparationsmodul „Prepito“ der Firma *chemagen Biopolymer-Technologie AG*. Das speziell für den Assay entwickelte Programm wird im Folgenden beschrieben.

Der Arm des Magnetseparationsmoduls wird in Z- (Höhe) und Y-Richtung (Position über der Titerplatte) bewegt. Die Höhe wird durch den Befehl [POSITIONING] festgelegt, die Position über der jeweiligen Reihe der Titerplatte wird durch die Befehle [POS_A] - [POS_H] gesteuert, auch die Geschwindigkeit der Bewegung kann bestimmt werden. Die Magnetpartikel mit der Probe und die Goldpartikel werden in den Positionen [POS_1] und [POS_2] vorgelegt. Auch die Aufnahme und der Abwurf der Plastikhülsen über den Magnetstiften, sowie die Magnetisierung und Rotation der Magnetstifte werden durch Befehle gesteuert. Im Folgenden ist ein kommentierter Auszug des Protokolls dargestellt.

Befehl		Zeit in s
[GET_TIPS_1]	<i>Aufnahme der Hülsen</i>	0
		0
[POS_2]	<i>KOPPLUNG des Antigens</i>	0
[POSITIONING]		4
POSITION	53000	4
SPEED	12000	4
[MAGNET]	Magnet	4
DIR	OFF	4
[ROTATION]	<i>Partikel suspendieren</i>	4
DIR	ON2	4
[TIMER]		4
TIME	600	4
[ROTATION]	<i>Inkubation</i>	604
DIR	OFF	604
[TIMER]		604
TIME	300	604
[ROTATION]	<i>Partikel suspendieren</i>	904
DIR	ON2	904
[TIMER]		904
TIME	600	904
[ROTATION]	<i>aus</i>	1504
DIR	OFF	1504

Die Bewegung des Arms kann in Abhängigkeit der Zeit grafisch dargestellt werden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Höhe der Magnetstifte, die Rotation und die Magnetisierung. In Abbildung 75 sind die Bewegungen des Modularms bei der Antigenkopplung dargestellt. Die Magnetpartikel werden mit der Probe in POS_2 vorgelegt. Die Rotation des Magnetstabs gewährleistet die Suspendierung der Partikel, daraufhin erfolgen eine Inkubationsphase und eine erneute Suspendierung. Die Partikel werden dann magnetisch separiert (A in Abbildung 76), in der ersten Reihe (POS_A) der Titerplatte gewaschen (B), erneut separiert (C) und in der Goldpartikellösung (POS_1) suspendiert. Daraufhin erfolgt eine weitere Inkubation, wie schon bei der Antigenkopplung dargestellt. In Abbildung 77 und Abbildung 78 sind die sieben Waschschriffe nach der Kopplung der Goldpartikel dargestellt. Bei den Waschschriffen sollen unspezifisch gebundene Goldpartikel ausgewaschen werden. Der letzte Schritt ist die Suspendierung der Magnetpartikel in Wasser oder einer anderen Lösung (POS_1). Da das Magnetseparationsmodul insgesamt 10 Reihen an Kavitäten besitzt, der Assay aber aus 11 Schritten besteht, wurden die Reaktionsgefäße in POS_1 nach erfolgter Goldpartikelkopplung ausgewechselt und durch frische Reaktionsgefäße ersetzt.

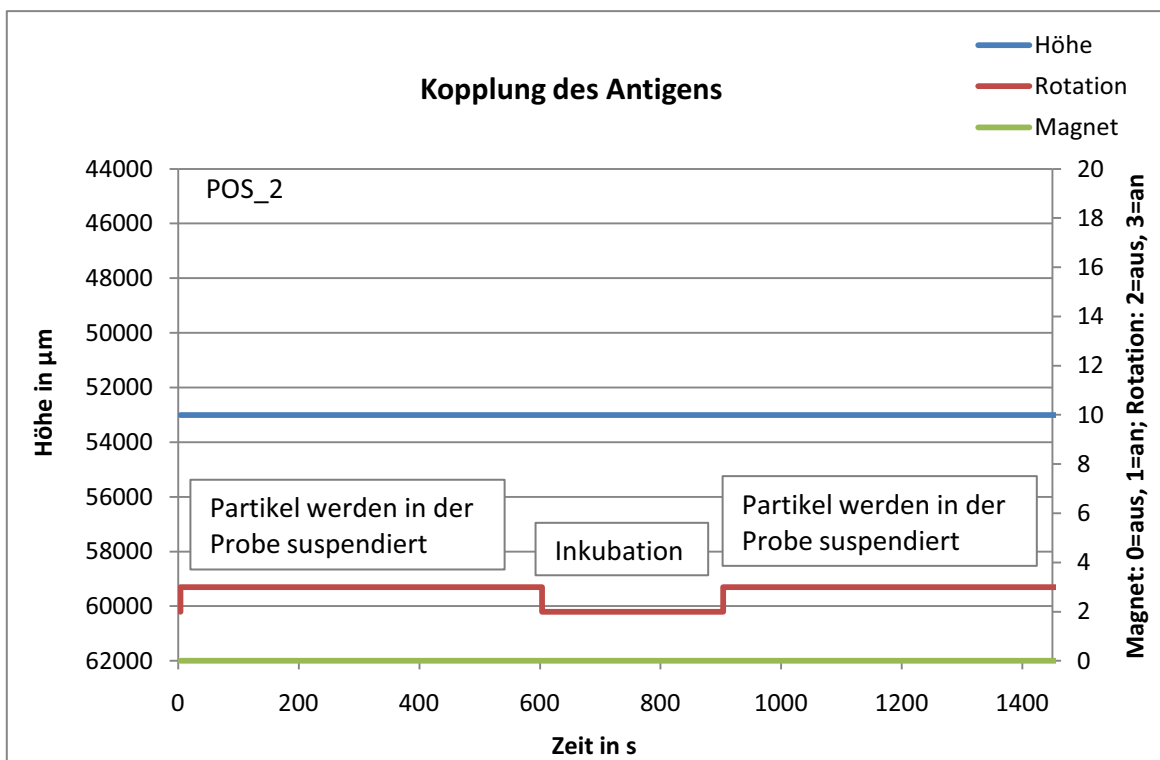


Abbildung 75: Darstellung der Bewegungen des Magnetarms des „Prepito“. Gezeigt ist die Inkubationsphase der MP mit der Probe. Die Partikel werden abwechselnd durch Rotation der Magnetstäbe suspendiert oder ohne Rotation inkubiert.

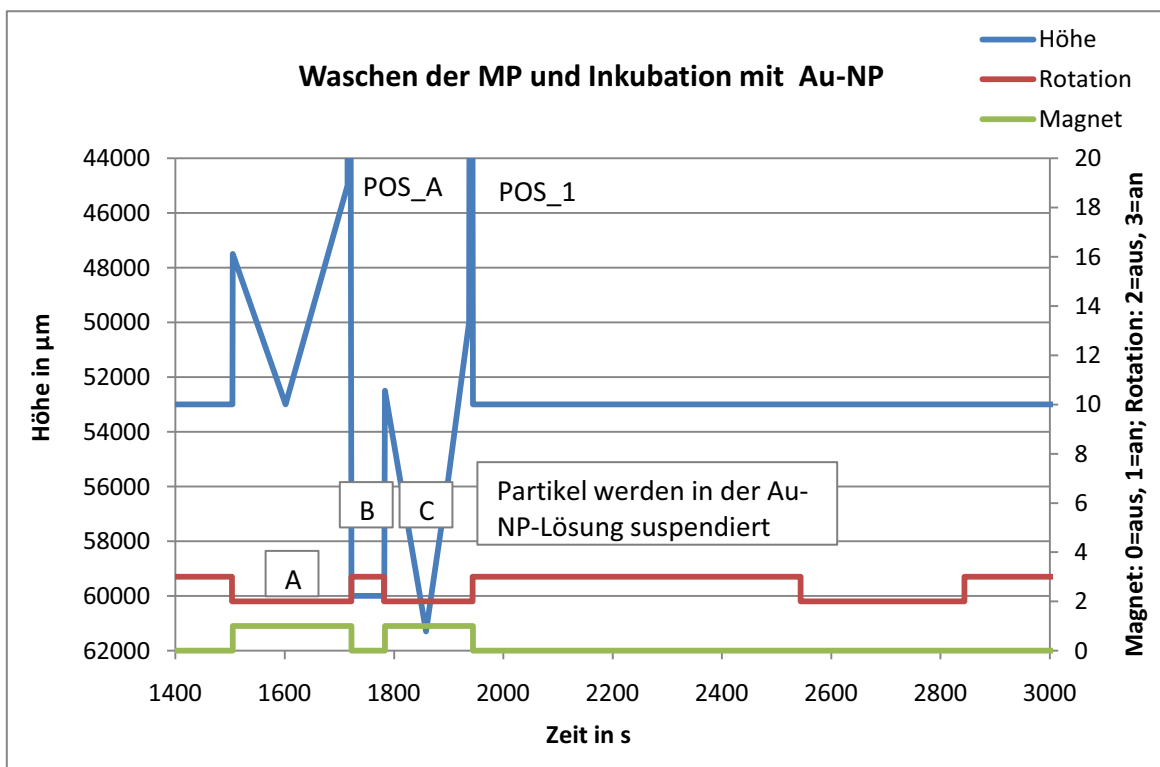


Abbildung 76: Darstellung der Bewegungen des Magnetarms des „Prepito“. Die Magnetpartikel werden zunächst magnetisch separiert (A), dann gewaschen (B), erneut magnetisch separiert (C) und daraufhin in der Au-NP-Lösung suspendiert und inkubiert.

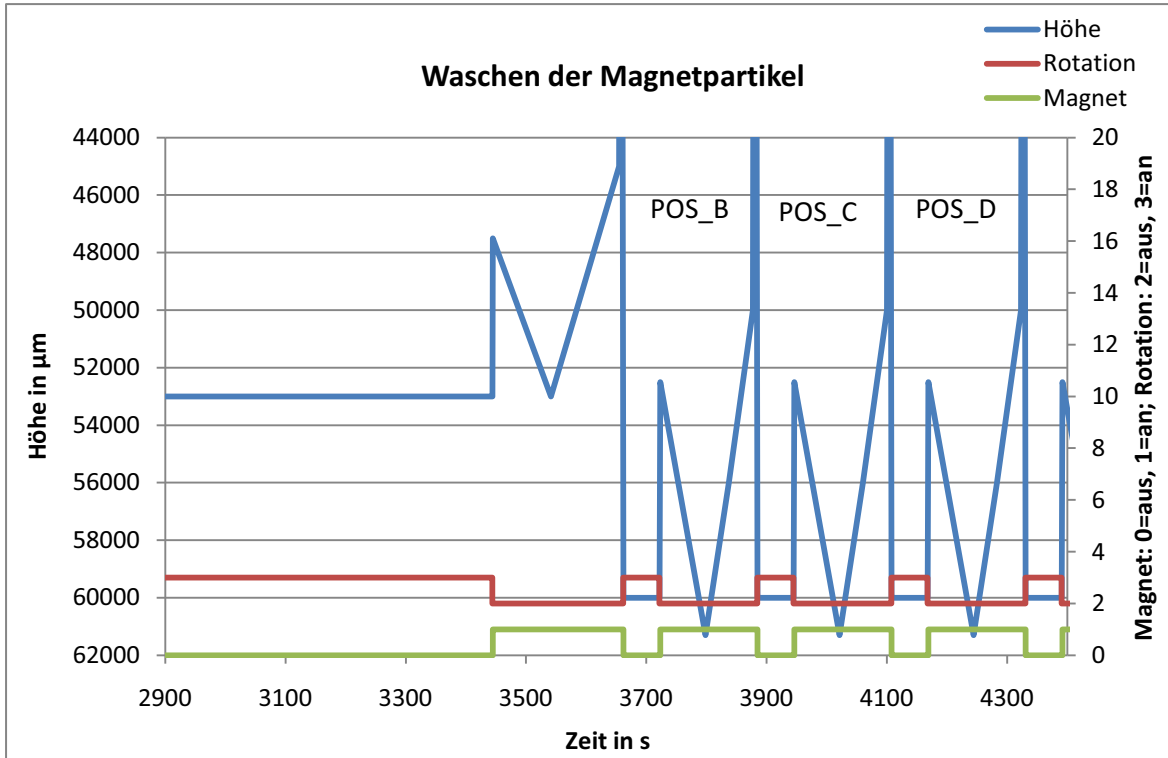


Abbildung 77: Dargestellt ist das Ende der Inkubationsphase der MP mit den Au-NP, die folgende Magnetseparation und drei Waschschrte, jeweils mit anschließender Magnetseparation (POS_B, POS_C und POS_D)

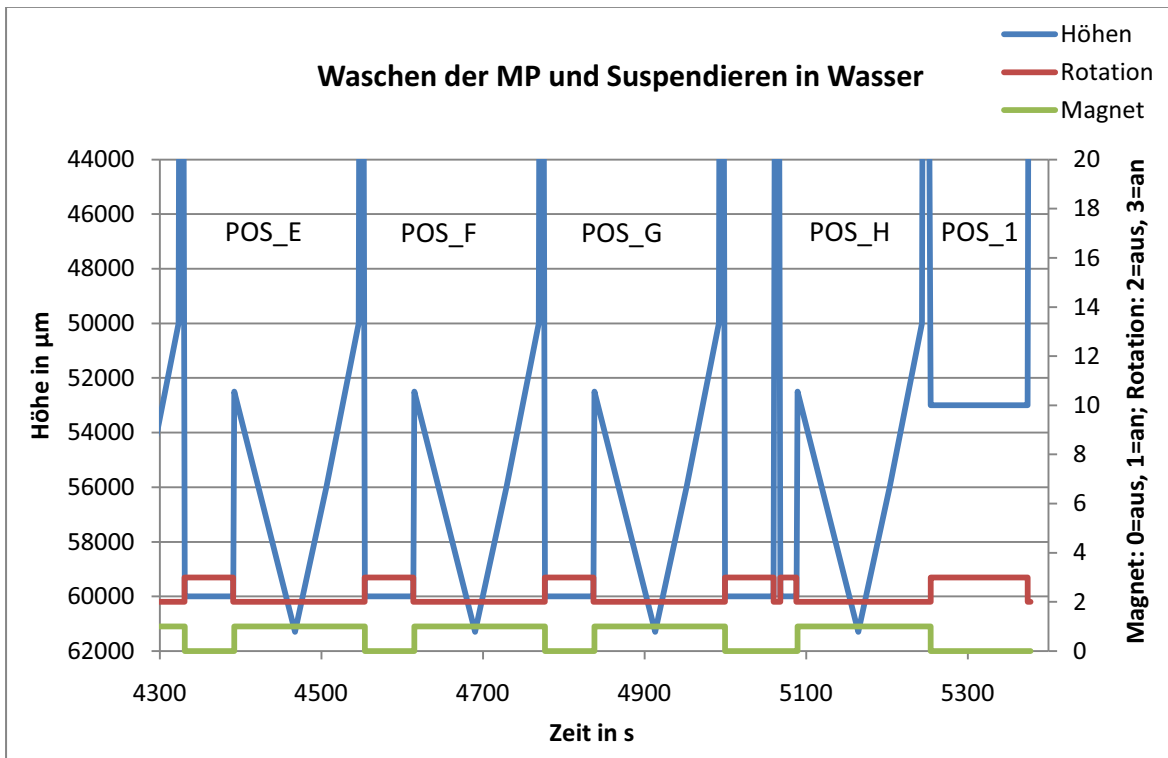


Abbildung 78: Darstellung der letzten vier Waschschrte (POS_E, POS_F, POS_G, POS_H) und der Suspension der MP in Wasser (POS_1) für die folgende Analyse mittels PCR. Bei x=5080 werden die Plastikhülsen abgeworfen und neue aufgenommen, um Kontaminationen zu verhindern.

6.7 ImageJ Makro für die Analyse von Fluoreszenzaufnahmen

In jeder Reaktionskammer der Flusszelle werden mehrere Sichtfelder betrachtet, wobei von jedem Sichtfeld eine Aufnahme je Fluoreszenzkanal erfolgt. Sollen beispielsweise für die Analyse einer Reaktionskammer fünf Sichtfelder (Field of View, FOV) betrachtet werden, so werden hierfür 15 Aufnahmen benötigt. Zwei Fluoreszenzaufnahmen dienen der Dekodierung der Partikel im jeweiligen Sichtfeld, die dritte Aufnahme dient der Quantifizierung des Antigens. Jede Bildreihe wird in einem Ordner gespeichert, der z.B. den Namen „100 pg/mL PSA in Serum“ erhält. Somit enthält ein Ordner nur die Aufnahmen einer Reaktionskammer bzw. einer Bedingung des Experiments. Die einzelnen Ordner werden wiederum in einem übergeordneten Ordner abgelegt, der z.B. „Quantifizierung von PSA in Serum“ genannt wird. Daraufhin wird das Makro in ImageJ aufgerufen, um die Fluoreszenzaufnahmen zu analysieren. Bei mit „//“ beginnendem Text handelt es sich um Kommentare.

ImageJ Makro

```
// To decode different bead populations in one FOV. Thresholdfilter: Otsu, images of encoding channels are
//added to locate particles that are bright in at least one of the fluorescence channels. Later a mask to
//locate dim particles is created
// Second channel shifted (one pixel) --> correction included

// INSERT HERE
//-----
//Particle range:
//smallest particle
s=6;
//biggest particle
b=15;
//number of fluorescent channels:
f=3;
//-----

a=b+1;
t=s-1;

// Select Folder with fluorescence images subfolders
dir_FL = getDirectory("Choose directory with fluorescent images subfolders");
list_FL = getFileList(dir_FL);
dir_Save = getDirectory("Save results in...");

////////// Begin loop
for (i=0; i<list_FL.length; i++) {
    k=0;
    setBatchMode(true);
    run("Set Measurements...", "area mean shape integrated redirect=None decimal=3");
```

```

        sublist= getFileList(dir_FL+list_FL[i]);
        Array.sort(sublist);
        l=lengthOf(sublist);
        n=l/f;
// Create temporary directory
        tmp = getDirectory("temp");
        if (tmp=="") exit("No temp directory available");
        myDir = tmp+"my-test-dir"+File.separator;
        File.makeDirectory(myDir);
        if (!File.exists(myDir)) exit("Unable to create directory");

// Save images illumination corrected
for (j=(f-1); j<l; j+=f) {
// Save original FITC image
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j]); run("Subtract Background...", "rolling=5"); rename("rolling");
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j]); rename("original"); imageCalculator("Subtract create",
"original", "rolling");
        run("Invert"); rename("backInv"); imageCalculator("Add create", "original", "backInv");
        run("Select All"); run("Cut"); run("Fill"); makeRectangle(-0, -1, 1004, 1002); run("Paste");
        saveAs("tiff", myDir+"cFITC"); run("Close All Without Saving");

// Save original Cy3.5 image
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j-1]); run("Subtract Background...", "rolling=5"); rename("rolling");
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j-1]); rename("original"); imageCalculator("Subtract create",
"original", "rolling");
        run("Invert"); rename("backInv"); imageCalculator("Add create", "original", "backInv");
        saveAs("tiff", myDir+"bCy35"); run("Close All Without Saving");

if (f==3) {
// Save original Cy5.5 image
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j-2]); run("Subtract Background...", "rolling=5"); rename("rolling");
        open(dir_FL+list_FL[i]+sublist[j-2]); rename("original"); imageCalculator("Subtract create",
"original", "rolling");
        run("Invert"); rename("backInv"); imageCalculator("Add create", "original", "backInv");
        saveAs("tiff", myDir+"aCy55"); run("Close All Without Saving");}

// Add encoding channels and create mask
        open(myDir+"bCy35.tiff"); rename("Cy3.5"); open(myDir+"cFITC.tiff"); rename("FITC");
        imageCalculator("Add create", "FITC", "Cy3.5"); saveAs("Tiff", myDir+"merged");
        setAutoThreshold("Otsu dark"); run("Convert to Mask"); saveAs("tiff", myDir+"OtsuBackCorr");
        run("Analyze Particles...", "size="+s+"-"+b+" circularity=0.9-1.00 show=Masks exclude");
        run("Mean...", "radius=0.5"); run("Find Maxima...", "noise=10 output=[Single Points] light");
        run("Find Maxima...", "noise=10 output=[Point Selection] light");
        run("Point Tool...", "mark=6 selection=yellow");
        ID=0; ID=getImageID(); sel=0; selectImage(ID); sel=selectionType(); getSelectionBounds(x, y, width,
height);
        if (sel != -1)
        {run("Draw"); run("Convert to Mask"); run("Analyze Particles...", "size=31-33 circularity=0.00-1.00
show=Masks exclude clear");}
        run("Invert LUT"); saveAs("Tiff", myDir+"maskValid"); close();
        run("Analyze Particles...", "size=34-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks");
        run("Invert"); run("Invert LUT");
        saveAs("tiff", myDir+"maskTooClose");
        run("Close All Without Saving");

```

```

// Create 0-Mask for aggregated particles
open(myDir+"OtsuBackCorr.tif");
run("Analyze Particles...", "size="+a+"-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks include");
run("Invert");
run("Invert LUT");
saveAs("tiff", myDir+"maskBig");
run("Close All Without Saving");

// Create 0-Mask for particles that are not round
open(myDir+"OtsuBackCorr.tif");
run("Analyze Particles...", "size="+s+"-"+b+" circularity=0.00-0.899 show=Masks include");
run("Invert");
run("Invert LUT");
saveAs("tiff", myDir+"maskNotround");
run("Close All Without Saving");

// Open the 3 masks and multipliccate them
open(myDir+"maskValid.tif");
open(myDir+"maskNotround.tif");
open(myDir+"maskBig.tif");
imageCalculator("Multiply create", "maskBig.tif", "maskValid.tif");
imageCalculator("Multiply create", "maskNotround.tif", "Result of maskBig");
run("16-bit"); setAutoThreshold("Otsu dark"); run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=31-33 circularity=0.00-1.00 show=Masks exclude");
saveAs("Tiff", myDir+"maskFinal");
run("Close All Without Saving");

// Create mask to multiply with original image. Blocks all the bright particles and aggregates
open(myDir+"merged.tif"); run("Subtract Background...", "rolling=5"); open(myDir+"maskFinal.tif");
run("Invert"); run("Invert LUT");
open(myDir+"maskBig.tif"); open(myDir+"maskNotround.tif");
imageCalculator("Multiply create", "maskBig.tif", "maskNotround.tif");
imageCalculator("Multiply create", "maskFinal.tif", "Result of maskBig");
open(myDir+"maskTooClose.tif");
imageCalculator("Multiply create", "Result of maskFinal", "maskTooClose.tif");
run("Dilate");run("Dilate");run("Dilate");
run("Divide...", "value=255");
rename("Zero");
imageCalculator("Multiply create", "Zero", "merged.tif");
setAutoThreshold("Triangle dark"); run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=10-39 circularity=0.9-1.00 show=Masks exclude");
run("Mean...", "radius=0.5"); run("Find Maxima...", "noise=10 output=[Single Points] light");
run("Find Maxima...", "noise=10 output=[Point Selection] light");
ID=0; ID=getImageID(); sel=0; selectImage(ID); sel=selectionType(); getSelectionBounds(x, y, width,
height);
if (sel != -1)
{run("Draw"); run("Convert to Mask"); run("Analyze Particles...", "size=31-33 circularity=0.00-1.00
show=Masks exclude clear");}
saveAs("Tiff", myDir+"maskDim"); run("Close All Without Saving");

// Add mask of dim particles to mask of bright particles
open(myDir+"maskFinal.tif");
open(myDir+"maskDim.tif");
imageCalculator("Add create", "maskDim.tif", "maskFinal.tif");
setAutoThreshold("Otsu"); run("Analyze Particles...", "size=31-33 circularity=0.00-1.00 show=Masks
exclude");

```

```

saveAs("Tiff", myDir+"maskTwo");
run("Close All Without Saving");

// Analyze first fluorescence channel image
open(myDir+"cFITC.tif"); name=getTitle();
run("Set Measurements...", "mean center redirect=cFITC.tif decimal=0"); run("Subtract
Background...", "rolling=5");
open(myDir+"maskTwo.tif"); run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear");
ort = dir_Save+list_FL[i]; replace(ort, "/", File.separator); File.makeDirectory(ort);
// Save mask (just in case)
// mask = dir_Save+"Masks "+list_FL[i]; replace(mask, "/", File.separator); File.makeDirectory(mask);
// selectWindow("maskTwo.tif"); saveAs("Tiff", mask+File.separator+k+name);

selectWindow("Results"); saveAs("text", ort+k+name);
run("Close All Without Saving");

// Analyze second fluorescence channel image
open(myDir+"bCy35.tif"); name=getTitle();
run("Set Measurements...", "mean center redirect=bCy35.tif decimal=0"); run("Subtract
Background...", "rolling=5");
open(myDir+"maskTwo.tif"); run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear");
ort = dir_Save+list_FL[i]; replace(ort, "/", File.separator); File.makeDirectory(ort);
selectWindow("Results"); saveAs("text", ort+k+name);
run("Close All Without Saving");

if (f==3) {
// Analyze third fluorescence channel image
open(myDir+"aCy55.tif"); name=getTitle();
run("Set Measurements...", "mean center redirect=aCy55.tif decimal=0"); run("Subtract
Background...", "rolling=5");
open(myDir+"maskTwo.tif"); run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear");
ort = dir_Save+list_FL[i]; replace(ort, "/", File.separator); File.makeDirectory(ort);
selectWindow("Results"); saveAs("text", ort+k+name);
run("Close All Without Saving");}

//Delete created images in temporary directory
delete = File.delete(myDir+"maskFinal.tif");
delete = File.delete(myDir+"OtsuBackCorr.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskDim.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskBig.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskNotround.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskValid.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskTwo.tif");
delete = File.delete(myDir+"maskTooClose.tif");
delete = File.delete(myDir+"added.tif");
delete = File.delete(myDir+"merged.tif");
delete = File.delete(myDir+"cFITC.tif");
delete = File.delete(myDir+"bCy35.tif");
delete = File.delete(myDir+"aCy55.tif"); k=k+1;
run("Set Measurements...", "area mean integrated redirect=None decimal=3");}
} // End loop
run("Set Measurements...", "area mean integrated redirect=None decimal=3");
delete = File.delete(myDir); exit("Results are saved.");

```


Das Makro speichert die Position und die jeweiligen mittleren Pixelwerte jedes Partikels in Textdateien. Die Ordnerstruktur der Fluoreszenzaufnahmen wird auch hier beibehalten.

6.8 Matlab-Script für den Datenimport und die Datenauswertung

Mit einer für MATLAB geschriebenen Funktion können die Textdateien automatisiert in eine Matrix importiert werden. Bei mit „%“ beginnendem Text handelt es sich um Kommentare. Die mittleren Partikelintensitäten aus je einer Reaktionskammer werden in der Matrix „newdata“ gespeichert. Die ersten beiden Spalten beinhalten die Daten der Kodierung, die dritte Spalte beinhaltet die Daten zur Quantifizierung des Antigens. Diese Struktur wird für jede Reaktionskammer wiederholt.

%Import textdata generated by ImageJ fluorescence analysis. Multiple channels %and field of views (FOVs) can be imported at once. Data is plotted as one %color per flow channel.

%Variables: folder – name of folder with subfolders to be imported

%flChannels - # of fluorescent channels

%FpSx - # OF FOLDERS per flow channel

%Sampx – Description of Sample in flow channel

function

funcImp(folder,flChannels,FpS1,FpS2,FpS3,FpS4,FpS5,FpS6,Samp1,Samp2,Samp3,Samp4,Samp5,Samp6);

F=[folder, '\'];

dirlist=dir(F);

numbCh=flChannels;

c1=FpS1; c2=FpS2; c3=FpS3; c4=FpS4; c5=FpS5; c6=FpS6;

S = strvcats(Samp1,Samp2,Samp3,Samp4,Samp5,Samp6);

%-----

%Variables:

% m-count for subfolders

% z-number of subfolders

% b-row of newdata

% v-row of original data

% k-length of original data

% i-number of subfolder

% go through folders 3 to last c1-folder

newb=1;

m=1;

for i=3:(2+c1)

impChannels;

end

% go through folders of channel c2

if c2~=0

newb=1;

m=m+numbCh;

for i=i+1:i+c2

impChannels;

end

end

% go through folders of channel c3

if c3~=0

newb=1;

m=m+numbCh;

for i=i+1:i+c3

impChannels;

end

end

```

% go through folders of channel c4
if c4~=0
    newb=1;
    m=m+numbCh;
    for i=i+1:i+c4
        impChannels;
    end
end
% go through folders of channel c5
if c5~=0
    newb=1;
    m=m+numbCh;
    for i=i+1:i+c5
        impChannels;
    end
end
% go through folders of channel c6
if c6~=0
    newb=1;
    m=m+numbCh;
    for i=i+1:i+c6
        impChannels;
    end
end

%Plot the data in different colors per channel
figure;
x=1;
% Use colormap "jet"
Z=jet(length(S(:,1)));
for i=1:length(S(:,1));
    %plot(newdata(:,x),newdata(:,x+1),'b. ');

plot(newdata(:,x),newdata(:,x+1),' ','Color',Z(i,:));
    hold on;
    x=x+flChannels;
end
xlabel('Intensity          Alexa          594
(a.u.)','FontWeight','bold','FontSize',12,...
'FontName','Arial');
ylabel('Intensity          Alexa          488
(a.u.)','FontWeight','bold','FontSize',12,...
'FontName','Arial');
set(gca,'YScale','log','XScale','log');
legend(S);
hold off;

```

Subroutine „impChannels“

% First fluorescence channel to be imported is the second image, then third %if 3 channels), then first.

```

path=[F,dirlist(i,1).name,'\'];
dir2=ls(path);
b=newb;

if numbCh==3
    %import Alexa 594 channel
    for j=4:numbCh:size(dir2,1)-1
        arrayimport;
    end
    %import Alexa 488 channel
    m=m+1;
    b=newb;
    for j=5:numbCh:size(dir2,1)
        arrayimport;
    end
    %import Alexa 680 channel
    m=m+1;
    b=newb;
    for j=3:numbCh:size(dir2,1)-2
        arrayimport;
    end
    newb=b;
    m=m-2;
end

if numbCh==2
    %import Alexa 594 channel
    for j=3:numbCh:size(dir2,1)-1
        arrayimport;
    end
    %import Alexa 488 channel
    m=m+1;
    b=newb;
    for j=4:numbCh:size(dir2,1)
        arrayimport;
    end
    newb=b;
    m=m-1;
end

if numbCh==1
    %import Cy3.5 channel
    for j=3:numbCh:size(dir2,1)
        arrayimport;
    end
    newb=b;
end

```

Subroutine „arrayimport“

%Subscript for impChannel routine to import data from ImageJ textfiles.

```
data=importdata([path,dir2(j,:)]);
array=isstruct(data);
if array ==1;
    k=length(data.data(:,2));
    for v=1:k
        newdata(b,m)=(data.data(v,2));
        b=b+1;
    end
end
```

Nachdem die Fluoreszenzintensitäten (mittlere Pixelwerte der Partikel) importiert wurden, werden die verschiedenen Partikelpopulationen dekodiert. Je nach Fluoreszenzintensität und dem Verhältnis der beiden kodierenden Fluoreszenzintensitäten zueinander werden die Partikel einer bestimmten Population zugewiesen. Die hierbei erhaltenen Daten werden in der Matrix „results“ gespeichert. Im Folgenden ist ein Beispiel für die Dekodierung von vier verschiedenen Populationen dargestellt.

%Decoding of 4 bead population, data stored in 'results'.

```
clear results;
i=1; %column of "results"
rows=length(newdata(:,1)); %number of rows
columns=length(newdata(1,:)); %number of columns
b=1;

for i=1:3:columns
    a1=1; a2=1; a3=1; a4=1;
    for a=1:rows
        x=newdata(a,i);
        y=newdata(a,i+1);
        z=newdata(a,i+2);
        % Population 1 and 3
        if x>50 && x<400
            if y>100 && y<1000 && y/x<2 && y/x>0.5
                results(a1,b)=x;
                results(a1,b+1)=y;
                results(a1,b+2)=z;
                a1=a1+1;
            end
            if y>400 && y/x>6 && y/x<3.5
                results(a3,b+6)=x;
                results(a3,b+7)=y;
                results(a3,b+8)=z;
                a3=a3+1;
            end
        end
    end

    % Population 2 and 4
    if x>600
        if y>100 && y<1000 && y/x<0.28 &&
            y/x>0.1
            results(a2,b+3)=x;
            results(a2,b+4)=y;
            results(a2,b+5)=z;
            a2=a2+1;
        end
        if y>500 && y/x>0.5 && y/x<2
            results(a4,b+9)=x;
            results(a4,b+10)=y;
            results(a4,b+11)=z;
            a4=a4+1;
        end
    end
    b=b+12;
end
```

In einem weiteren Schritt werden Partikel, die im Quantifizierungskanal (Alexa 680) Fluoreszenzintensitäten aufweisen, die weit außerhalb des Mittelwertes liegen, gelöscht. Auf diese Weise werden „Ausreißer“ eliminiert. Die Daten werden daraufhin in der Matrix „normal“ gespeichert.

```
%Normalize z data with x and y, throw out outliers
%Data stored in "normal"
save beads newdata results
clear all
load beads

rows=length(results(:,1));
columns=length(results(1,:));
a_norm=1;
for a=1:3:columns
    i_norm=1;
    %count the number of beads per population in
    each experiment
    ende=0;
    for i=1:rows
        if results(i,a)>0;
            ende=ende+1;
        end
    end
    av_x=mean(results(1:ende,a));
    av_y=mean(results(1:ende,a+1));
    av_z=median(results(1:ende,a+2));
    norm=(z/av_z)/(0.5*(x/av_x+y/av_y));
    if norm>0.5 && norm<1.5
        normal(i_norm,a_norm)=results(i,a);
        normal(i_norm,a_norm+1)=results(i,a+1);
        normal(i_norm,a_norm+2)=results(i,a+2);
        i_norm=i_norm+1;
    end
    a_norm=a_norm+3;
end

for i=1:rows
    x=results(i,a);
    y=results(i,a+1);
    z=results(i,a+2);
```

Ausgehend von den so erhaltenen Daten werden die Mittelwerte der Partikelintensitäten jeder Population und die jeweiligen Standardabweichungen berechnet, daraufhin werden die Daten visualisiert.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Cazares, L. H., *et al.* (2002) Normal, Benign, Preneoplastic, and Malignant Prostate Cells Have Distinct Protein Expression Profiles Resolved by Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Clinical Cancer Research*. **8**, 2541-2552
- 2 Citron, M., *et al.* (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid [beta]-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*. **3**, 67-72
- 3 Hartwell, L., *et al.* (2006) Cancer biomarkers: a systems approach. *Nat Biotech*. **24**, 905-908
- 4 Anderson, N. L. and Anderson, N. G. (2002) The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. **1**, 845-867
- 5 Thadikkaran, L., *et al.* (2005) Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics*. **5**, 3019-3034.
- 6 Wulfkühle, J. D., *et al.* (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*. **3**, 267-275
- 7 Brawer, M. K. (2001) Alpha-1-antichymotrypsin complexed prostate specific antigen. In *Prostate Specific Antigen*. p. 18, Marcel Dekker, Inc., New York
- 8 Ferrara, G., *et al.* (2006) Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *The Lancet*. **367**, 1328-1334
- 9 Csordas, A., *et al.* (2010) Detection of Proteins in Serum by Micromagnetic Aptamer PCR (MAP) Technology. *Angewandte Chemie International Edition*. **49**, 355-358
- 10 Thompson, I. M. and Ankerst, D. P. (2007) Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer. *CMAJ*. **176**, 1853-1858
- 11 Mirkin, C. A. W., IL, *et al.* (2006) Bio-barcodes based on oligonucleotide-modified particles. Nanosphere, Inc.
- 12 Cardenas, M., *et al.* (2006) Thiol-Specific and Nonspecific Interactions between DNA and Gold Nanoparticles. *Langmuir*. **22**, 3294-3299
- 13 Nadler, R. B., *et al.* (1995) Effect of Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia on Elevated Serum Prostate Specific Antigen Levels. *The Journal of Urology*. **154**, 407-413
- 14 Klotz, L. H. (1997) PSAdynia and other PSA-related syndromes: A new epidemic--A case history and taxonomy. *Urology*. **50**, 831-832
- 15 Etzioni, R., *et al.* (2003) The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer*. **3**, 243-252
- 16 Andriole, G. L., *et al.* (2009) Mortality Results from a Randomized Prostate-Cancer Screening Trial. *N Engl J Med*. **360**, 1310-1319
- 17 Schröder, F. H., *et al.* (2009) Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. *N Engl J Med*. **360**, 1320-1328
- 18 Udby, L., *et al.* (2002) An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *Journal of Immunological Methods*. **263**, 43-55
- 19 Olayioye, M. (2001) Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*. **3**, 385 - 389

- 20 Moulder, S. L., *et al.* (2001) Epidermal Growth Factor Receptor (HER1) Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) Inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* **61**, 8887-8895
- 21 Younes, A. and Kadin, M. E. (2003) Emerging Applications of the Tumor Necrosis Factor Family of Ligands and Receptors in Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* **21**, 3526-3534
- 22 Haffner, S. M., *et al.* (2002) Effect of Rosiglitazone Treatment on Nontraditional Markers of Cardiovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation.* **106**, 679-684
- 23 Blicharz, T. M., *et al.* (2009) Fiber-Optic Microsphere-Based Antibody Array for the Analysis of Inflammatory Cytokines in Saliva. *Analytical Chemistry.* **81**, 2106-2114
- 24 Diercks, A. H., *et al.* (2009) A microfluidic device for multiplexed protein detection in nanoliter volumes. *Analytical Biochemistry.* **386**, 30-35
- 25 Sivagnanam, V., *et al.* (2009) On-Chip Immunoassay Using Electrostatic Assembly of Streptavidin-Coated Bead Micropatterns. *Analytical Chemistry.* **81**, 6509-6515
- 26 Jung, J. W., *et al.* (2009) Label-free and quantitative analysis of C-reactive protein in human sera by tagged-internal standard assay on antibody arrays. *Biosensors & Bioelectronics.* **24**, 1469-1473
- 27 Kopf, E. and Zharhary, D. (2007) Antibody arrays - An emerging tool in cancer proteomics. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **39**, 1305-1317
- 28 Hall, D. A., *et al.* (2007) Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development.* **128**, 161-167
- 29 Haab, B. B. (2006) Applications of antibody array platforms. *Current Opinion in Biotechnology.* **17**, 415-421
- 30 Nielsen, U. B. and Geierstanger, B. H. (2004) Multiplexed sandwich assays in microarray format. *Journal of Immunological Methods.* **290**, 107-120
- 31 Fan, R., *et al.* (2008) Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat Biotechnol.* **26**, 1373-1378
- 32 Caiazzo, R. J., *et al.* (2009) Protein microarrays as an application for disease biomarkers. *Proteomics Clinical Applications.* **3**, 138-147
- 33 Schweitzer, B., *et al.* (2000) Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **97**, 10113-10119
- 34 Schena, M. (1996) Genome analysis with gene expression microarrays. *BioEssays.* **18**, 427-431
- 35 Kusnezow, W. and Hoheisel, J. D. (2002) Antibody Microarrays: Promises and Problems *Biotechniques.* **33**, 14-23
- 36 Miller, J. C., *et al.* (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics.* **3**, 56-63.
- 37 Rimini, R., *et al.* (2009) Validation of serum protein profiles by a dual antibody array approach. *Journal of Proteomics.* **73**, 252-266
- 38 Birtwell, S. and Morgan, H. (2009) Microparticle encoding technologies for high-throughput multiplexed suspension assays. *Integrative Biology.* **1**, 345-362
- 39 Fulton, R. J., *et al.* (1997) Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin. Chem.* **43**, 1749-1756

- 40 Nolan, J. P. and Mandy, F. (2006) Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry A*. **69**, 318-325
- 41 Nichkova, M., *et al.* (2007) Multiplexed immunoassays for proteins using magnetic luminescent nanoparticles for internal calibration. *Analytical Biochemistry*. **369**, 34-40
- 42 Nolan, J. P. and Sklar, L. A. (2002) Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. *Trends in Biotechnology*. **20**, 9-12
- 43 Sivagnanam, V., *et al.* (2009) Sandwich immunoassay on a microfluidic chip using patterns of electrostatically self-assembled streptavidin-coated beads. *Microelectronic Engineering*. **86**, 1404-1406
- 44 Chen, A., *et al.* (2009) Antifouling Surface Layers for Improved Signal-to-Noise of Particle-Based Immunoassays. *Langmuir*. **25**, 13510-13515
- 45 Grüttner, C., *et al.* (2007) Synthesis and antibody conjugation of magnetic nanoparticles with improved specific power absorption rates for alternating magnetic field cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **311**, 181-186
- 46 Darmanis, S., *et al.* Sensitive Plasma Protein Analysis by Microparticle-based Proximity Ligation Assays. *Mol Cell Proteomics*. **9**, 327-335
- 47 Wu, W. W., *et al.* (2009) Antibody Array Analysis with Label-based Detection and Resolution of Protein Size. *Molecular & Cellular Proteomics*. **8**, 245-257
- 48 Schwenk, J. M., *et al.* (2009) Comparative protein profiling of serum and plasma using an antibody suspension bead array approach. *Proteomics*. **10**, 532-540
- 49 Gunderson, K. L., *et al.* (2004) Decoding Randomly Ordered DNA Arrays. *Genome Research*. **14**, 870-877
- 50 Wilson, R., *et al.* (2006) Encoded Microcarriers For High-Throughput Multiplexed Detection. *Angewandte Chemie International Edition*. **45**, 6104-6117
- 51 Ma, Q., *et al.* (2007) Multicolor quantum dot-encoded microspheres for the detection of biomolecules. *Talanta*. **72**, 1446-1452
- 52 Han, M., *et al.* (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat. Biotechnol.* **19**, 631-635
- 53 Eastman, P. S., *et al.* (2006) Qdot nanobarcode for multiplexed gene expression analysis. *Nano Letters*. **6**, 1059-1064
- 54 Bielinska, A. U., *et al.* (1999) DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: Implications for transfection. *Bioconjugate Chem.* **10**, 843-850
- 55 Zhi, Z.-l., *et al.* (2003) Multianalyte immunoassay with self-assembled addressable microparticle array on a chip. *Analytical Biochemistry*. **318**, 236-243
- 56 Nam, J.-M., *et al.* (2004) Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*. **126**, 5932-5933
- 57 Moser, C., *et al.* (2006) Microsphere sedimentation arrays for multiplexed bioanalytics. *Analytica Chimica Acta*. **558**, 102-109
- 58 Kim, E.-Y., *et al.* (2006) A real-time PCR-based method for determining the surface coverage of thiol-capped oligonucleotides bound onto gold nanoparticles. *Nucleic Acids Research*. **34**, e54-e54
- 59 Hill, H. D., *et al.* (2007) Nonenzymatic Detection of Bacterial Genomic DNA Using the Bio Bar Code Assay. *Analytical Chemistry*. **79**, 9218-9223

- 60 Goluch, E. D., *et al.* (2006) A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection. *Lab Chip*. **6**, 1293-1299
- 61 Goluch, E. D., *et al.* (2009) A microfluidic detection system based upon a surface immobilized biobarcode assay. *Biosensors and Bioelectronics*. **24**, 2397-2403
- 62 Lee, T. M.-H., *et al.* (2005) Effects of gold nanoparticle and electrode surface properties on electrocatalytic silver deposition for electrochemical DNA hybridization detection. *The Analyst*. **130**, 364-369
- 63 Möller, R., *et al.* (2003) Molecular Detection with Gold Nanoparticles: Principles and Fields of Application. *tm - Technisches Messen*. **70**, 582-584
- 64 Schmidt, E. and Weiss, C. (1996) Method of marking biomolecules using horseradish peroxidase. 5989842. Biotex Berlin Buch GmbH
- 65 Blab, G. A., *et al.* (2005) Optical readout of gold nanoparticles-based DNA microarrays without silver enhancement. *Biophys. J.*, biophysj.105.076182
- 66 Thaxton, C. S., *et al.* (2009) Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**, 18437-18442
- 67 Liu, X. Q., *et al.* (2005) Preparation and characterization of magnetic polymer nanospheres with high protein binding capacity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **293**, 111-118
- 68 Bozhinova, D. P. (2004) Synthesis, modification and characterisation of magnetic micro-matrices for covalent immobilisation of biomolecules. Model investigations with penicillin amidase from E.coli.
- 69 Stoeva, S. I., *et al.* (2006) Multiplexed Detection of Protein Cancer Markers with Biobarcode Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8378-8379
- 70 Turkevich, J., *et al.* (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. **11**, 55-75
- 71 Hill, H. D. and Mirkin, C. A. (2006) The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nat. Protocols*. **1**, 324-336
- 72 Qiao, F.-Y., *et al.* (2008) Antibody and DNA dual-labeled gold nanoparticles: Stability and reactivity. *Applied Surface Science*. **254**, 2941-2946
- 73 Storhoff, J. J., *et al.* (2002) Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Langmuir*. **18**, 6666-6670
- 74 Yang, J., *et al.* (2006) Inhibition of DNA hybridization by small metal nanoparticles. *Biophysical Chemistry*. **120**, 87-95
- 75 Nam, J. M., *et al.* (2003) Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. **301**, 1884-1886
- 76 <http://www.chemagen.com/chemagic-prepito-technology.html>
- 77 Barbee, K. D. and Huang, X. H. (2008) Magnetic assembly of high-density DNA arrays for genomic analyses. *Analytical Chemistry*. **80**, 2149-2154
- 78 Abramoff, M. D., *et al.* (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Intl.* **11**, 36-42
- 79 Otsu, N. (1979) A Threshold Selection Method from Gray-Level Histogram. *IEEE Trans. Systems, Man, Cybernetics*. **SMC-9**, 62-66

- 80 Widjojatmodjo, M. N., *et al.* (1993) Comparison of immunomagnetic beads coated with protein A, protein G, or goat anti-mouse immunoglobulins Applications in enzyme immunoassays and immunomagnetic separations. *Journal of Immunological Methods*. **165**, 11-19
- 81 Fuentes, M., *et al.* (2005) Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics*. **20**, 1380-1387
- 82 Stakenborg, T., *et al.* (2008) Increasing the stability of DNA-functionalized gold nanoparticles using mercaptoalkanes. *Journal of Nanoparticle Research*. **10**, 143-152
- 83 Bao, Y. P., *et al.* (2006) Detection of Protein Analytes via Nanoparticle-Based Bio Bar Code Technology. *Analytical Chemistry*. **78**, 2055-2059
- 84 Demers, L. M., *et al.* (2000) A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*. **72**, 5535-5541
- 85 http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=gui:process:subtract_background
- 86 Tessler, L. A., *et al.* (2009) Protein Quantification in Complex Mixtures by Solid Phase Single-Molecule Counting. *Analytical Chemistry*. **81**, 7141-7148
- 87 Findlay, J. and Dillard, R. (2007) Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*. **9**, E260-E267
- 88 Speel, E. J. M., *et al.* (1993) Multicolour preparations for in situ hybridization using precipitating enzyme cytochemistry in combination with reflection contrast microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*. **100**, 357-366
- 89 Sedgwick, H., *et al.* (2008) Lab-on-a-chip technologies for proteomic analysis from isolated cells. *J R Soc Interface*. **5**, S123-S130
- 90 Chao, T. C. and Ros, A. (2008) Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. *J R Soc Interface*. **5 Suppl 2**, S139-150

Lebenslauf

Nora Theilacker

Geb. 22.März 1981 in Heilbronn

Ausbildung

University of California, San Diego Nov. 2009 - jetzt

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Karlsruher Institut für Technologie Jan. 2007 - Okt. 2009

Anfertigung einer Dissertation über das Thema „Entwicklung eines partikelbasierten Verfahrens für den parallelen Nachweis von Proteinen“ unter Prof. Dr.-Ing. M. Franzreb.

Technische Universität München Okt. 2001 - Jan. 2007

M.Sc. in Life Sciences mit Schwerpunkt Biochemie, Gesamtnote: 1,6 Jan. 2007

Master's Thesis über das Thema „Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Dendrimeren zur DNA-Isolierung“ unter Prof. Dr. Sonja Berensmeier am Karlsruher Institut für Technologie

B.Sc. in Biologie mit Schwerpunkt Biochemie, Gesamtnote: 1,4 Aug. 2005

Bachelor's Thesis über das Thema „Einfluss endokriner Disruptoren auf die Genexpression beim Zebrafisch“ unter Prof. Dr. Wolfgang Höll

Praktika

Ministerio de Medio Ambiente, Cádiz, Spanien Jan. 2005 – März 2005

Praktikum bei Demarcación de Costas, Umweltministerium in Spanien

Technische Universität München, Lehrstuhl für Zellbiologie Juli 2004 – Sept. 2004

Hilfswissenschaftlerin

Max-Planck-Institut, München Aug. 2004

Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie

Auslandserfahrung

University of California, San Diego, USA	Okt. 2008 – März 2009
Forschungsaufenthalt im Rahmen der Dissertation	
Universidad de Cádiz, Spanien	Nov. 2004 – Aug. 2005
Auslandssemester an der Fakultät für Meereswissenschaften	
Ciudad de Guatemala, Guatemala	Juli. 1998 – Juni. 1999
Einjähriger Auslandsaufenthalt mit Schulbesuch in Guatemala	

Stipendien

Karlsruhe House of Young Scientists	2008
Stipendium für Forschungsaufenthalt an der <i>University of California, San Diego, USA</i>	
Socrates/Erasmus – Stipendium	2004
für ein Auslandssemester an der <i>Universidad de Cádiz, Spanien</i>	
e – fellows.net	2001
„Stipendium für besondere Leistungen“ beim Abitur, Heilbronn	

Veröffentlichungen

Theilacker N, Roller EE, Barbee KD, Franzreb M and Huang X. Multiplexed protein analysis using encoded antibody-conjugated microbeads. *J. R. Soc. Interface, im Druck*

Berensmeier S, Theilacker N. Magnetic Particles for Separation and Purification of Nucleic Acids. *BioTech international, 19(1): 6-10, 2007*

Sylwia Sekula, Jeanette Fuchs, Susanne Weg-Remers, Peter Nagel, Stefan Schuppler, Joe Fragala, Nora Theilacker, Matthias Franzreb, Christer Wingren, Peter Ellmark, Carl A. K. Borrebaeck, Chad A. Mirkin, Harald Fuchs, Steven Lenhert. Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on sub-cellular scales for templating of functional proteins and cell culture. *Small, 4(10):1785-93, 2008*

Poster: Sensitive detection of proteins using magnetic microparticles. 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, May 21-24, 2008, Vancouver, Kanada

Poster: The Biobarcode –Assay as an automated approach for the ultrasensitive detection of proteins. 22nd International Symposium on Microscale Bioseparations and methods for systems biology, March 9-13, 2008, Berlin

Poster: Magnetic Dendribeads for DNA-Separation. FRONTIERS Annual Meeting, October 24-26, 2006, Sizilien, Italien

Heilbronn, den 7.7.2011

Nora Theilacker