

# **Lateral Flow Test zur Abstoßungs- diagnostik mittels Antikörper**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Lisa Katharina Seiler, M. Sc.

2021

Referentin: Prof. Dr. med. Cornelia Blume  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Korreferent: Prof. Dr. med. Peter Heering  
Tag der Promotion: 17.09.2021

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Cornelia Blume bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Technische Chemie anzufertigen; zudem hat sie mir ein interessantes Forschungsthema anvertraut.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper für die Aufnahme an seinem Institut sowie die Übernahme des Korreferats. Ebenso möchte ich Herr Prof. Dr. med. Peter Heering meinen Dank für die Übernahme des Korreferats ausdrücken. Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Rebecca Jonczyk und Johanna Walter für ein stetig offenes Ohr bei Problemen im Labor und bei der Auswertung von Daten. Vielen Dank für euren Optimismus während der Laborarbeiten und vielen Dank für die konstruktiven Besprechungen meiner Dissertation, Rebecca. Ebenfalls gilt mein Dank Martina Weiß und Martin Pähler, die mir jederzeit im Labor und bei Bestellungen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt Herrn Christian Erck für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfe während der Antikörper-Entwicklung!

Yvonne und Charlotte: ohne euch würde ich auch heute noch im Labor stehen. Vielen Dank für eure großartige Hilfe während euren Bachelorarbeiten und als wissenschaftliche Hilfskräfte sowie eurer Spontanität bei den Arbeitszeiten!

Außerdem möchte ich dem ganzen TCI für eine wunderbare und unvergessliche Zeit danken. Ganz besonders meinen Kollegen in Büro 163 und all seinen Dauergästen für die unkomplizierte Unterstützung bei wissenschaftlichen sowie unwissenschaftlichen Fragen, vielen Kuchenstücken, gemeinschaftlichen Toiletten-Klingel-Momenten und gemeinsamen Unternehmungen. Für eine stimmungsvolle und musikalische Zeit im Labor mit vielen komplexen Rechnungen möchte ich mich vor allem bei Alina und Torsten bedanken. Genauso für das stundenlange Korrekturlesen meiner Arbeit bin ich dir sehr dankbar, Alina.

Mein persönlicher und besonderer Dank gilt meiner Familie sowie meinen Freunden für eure bedingungslose Unterstützung, eure Geduld und euer Verständnis sowie das Vertrauen, das ihr mir entgegengebracht habt.



## Kurzfassung

Nierentransplantationen gehören zu den häufigsten Transplantationen weltweit. Nierentransplantatempfänger unterziehen sich regelmäßigen Untersuchungen, u. a. um eine Nierenabstoßung frühzeitig festzustellen. Für die Diagnose wird oft der Anstieg des Serum-Kreatinin-Werts zum Anlass für die Durchführung einer Transplantatbiopsie genommen, sie gilt als diagnostischer Goldstandard für Abstoßung. Die Biopsie ist allerdings aufwändig, schmerzhaft und mit möglichen Komplikationen (Blutung, Infektionsrisiko) verbunden. Der Serum-Kreatinin-Anstieg zeigt häufig auch unspezifisch andere Transplantatstörungen an. Daher werden Alternativen zur spezifischen Früherkennung der Nierentransplantatabstoßung gesucht. Dabei eignet sich der Nachweis spezifischer, immunologisch bedeutsamer Biomarker, die bei einer Abstoßung vom Körper produziert werden. Deren Analyse könnte als Point-of-Care-Test eine schnelle, hoch sensitive sowie schmerz- und nebenwirkungsfreie Möglichkeit der Abstoßungsdiagnostik bieten. Ein Lateral Flow Assay (LFA) bietet sich hier als Testplattform an, die innerhalb von Minuten nachweist, ob der Biomarker z. B. im Urin vorliegt.

In dieser Arbeit wurden die Biomarker C-reaktives Protein (CRP), der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R $\alpha$ , auch sCD25) und CXCL9 (auch MIG, Monokine induced by Gamma-Interferon) ausgewählt. Durch mehrere Biomarkerstudien wurden die Biomarker sCD25 und CXCL9 mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant erhöht während verschiedener Formen einer Nierenabstoßung identifiziert. CRP zählt zu den Akute-Phase-Proteinen und dient zur Abgrenzung einer allgemeinen Entzündungsreaktion. Für das Chemokin CXCL9 wurden Antikörper generiert und mittels *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay* validiert, für CRP und sCD25 kommerziell erhältliche Antikörper verwendet. Vor der LFA-Entwicklung wurden Microarrays als Modell verwendet, um zunächst die Bindungseigenschaften der Antikörper zu untersuchen. Zur Visualisierung des Testergebnisses auf dem LFA wurden mittels Flokkulationstest Konjugate aus Goldnanopartikeln und Antikörpern untersucht. Anschließend wurde für jeden Biomarker ein LFA aufgebaut, optimiert und etabliert. Die Validierung der etablierten LFAs zur Detektion von sCD25 und CXCL9 fanden anhand von Urin- und Plasmaproben von Nierentransplantat-Empfängern, deren Diagnose nach BANFF-Kriterien erstellt wurde, statt. Somit konnte für den sCD25-LFA eine Sensitivität von 87,5 % und eine Spezifität von 84,6 % erreicht werden. Bei Verwendung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate auf Basis des Serum-Kreatinin-Wertes am Tag der Transplantatbiopsie zur Diagnosestellung einer Abstoßung wurde nur eine Sensitivität von 85 % bei einer Spezifität von 30,8 % erzielt. Der LFA zur Detektion von CXCL9 zeigte eine Sensitivität von 53 % und eine Spezifität von 71 % auf.

**Schlagwörter:** Lateral Flow Assay, Point-of-Care Test, Antikörper, Nierentransplantatabstoßung, Goldnanopartikel, Diagnostik

## **Abstract**

Kidney transplantations are one of the most frequent transplantations in the world. Kidney transplant recipients must undergo regular checkup examinations to diagnose kidney rejection at an early stage. Among other reasons, e. g. an increased serum creatinine level as expression of a deteriorated graft function may lead to performance of a biopsy of the graft representing the gold standard for rejection diagnosis. Since graft biopsies are time-consuming, painful and comprise possible complications (bleeding, infection) and since increased serum creatinine levels are not very specifically indicating rejection but an unspecific kidney graft function loss, alternatives for the early detection of kidney transplant rejection are urgently being studied. The detection of immunologically relevant, specific biomarkers, produced during rejection, is suitable for this purpose. Analysis of these biomarkers could be performed directly by the patient or trained personnel as a point-of-care-test and provide a rapid, highly sensitive, painless way without side-effects to detect kidney rejection at an early stage. Lateral flow assays are able to detect biomarkers of interest in serum or urine samples within minutes.

In this work, the biomarkers C-reactive protein (CRP) as well as soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R $\alpha$ , also sCD25) and CXCL9 (also MIG, monokines induced by gamma interferon) were selected. By several biomarker studies, the biomarkers sCD25 and CXCL9 were identified as significantly increased during renal rejection by Mann-Whitney-U-Test. CRP is one of the acute phase proteins and is used in this work to discriminate a general inflammatory response. Antibodies against CXCL9 were generated and validated by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), antibodies against CRP and sCD25 were commercially purchased. Microarrays were used as a model to investigate the binding properties of the antibodies specific for the respective protein. Stable conjugates of gold nanoparticles and antibodies were prepared by flocculation test for visualization of the test result of the LFA. Subsequently, an LFA was constructed, optimized and established for each biomarker. Validation of the established LFAs took place using urine and plasma samples from kidney transplant recipients diagnosed according to BANFF criteria. Therefore, a sensitivity of 87.5% and a specificity of 84.6% could be achieved for the sCD25-LFA. When the serum creatinine-related estimated glomerular filtration rate at the day of biopsy was used to discriminate the samples from the same patients, only a sensitivity of 85% and a specificity of 30.8% were achieved. The LFA for detection of CXCL9 showed a sensitivity of 53% and a specificity of 71%.

**Keywords:** Lateral Flow Assay, Point-of-Care Test, antibody, kidney rejection, gold nanoparticle, diagnostics

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| Danksagung.....  | I         |
| Kurzfassung .....  | III       |
| Abstract .....   | IV        |
| Inhaltsverzeichnis .....   | V         |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | VII       |
| <b>1 Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 Zielsetzung .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3 Theoretische Grundlagen .....</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>3.1 Nierentransplantation.....</b>                                | <b>4</b>  |
| 3.1.1 Einführung in die Abwehrreaktion des Immunsystems.....         | 5         |
| 3.1.2 Einfluss der Immunreaktion auf eine Nierentransplantation..... | 7         |
| 3.1.3 Abstoßungsarten.....   | 9         |
| <b>3.2 Biomarker bei einer Abstoßungsreaktion.....</b>               | <b>14</b> |
| 3.2.1 CRP.....   | 15        |
| 3.2.2 sCD25.....   | 16        |
| 3.2.3 CXCL9.....   | 17        |
| <b>3.3 Antikörper .....</b>  | <b>19</b> |
| 3.3.1 Genereller Aufbau.....   | 19        |
| 3.3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper.....                       | 21        |
| <b>3.4 Lateral Flow Assay .....</b>                                  | <b>22</b> |
| 3.4.1 Aufbau eines Lateral Flow Assays.....                          | 23        |
| 3.4.2 Eigenschaften der Komponenten eines Lateral Flow Assays.....   | 24        |
| <b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>                             | <b>28</b> |
| <b>4.1 Bestimmung der Goldnanopartikelgröße .....</b>                | <b>29</b> |
| 4.1.1 Rasterelektronenmikroskopie.....                               | 30        |
| 4.1.2 UV-Vis Spektroskopie und Nanoparticle Tracking Analysis .....  | 30        |
| <b>4.2 CRP .....</b>   | <b>31</b> |
| 4.2.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration.....         | 31        |
| 4.2.2 Bindungsstudien mittels Microarray.....                        | 32        |
| 4.2.3 Lateral Flow Assay zur Detektion von CRP .....                 | 42        |
| <b>4.3 sCD25 .....</b>   | <b>63</b> |
| 4.3.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration.....         | 63        |
| 4.3.2 Bindungsstudien mittels Microarray.....                        | 65        |
| 4.3.3 Lateral Flow Assay zur Detektion von sCD25 .....               | 74        |
| <b>4.4 CXCL9 .....</b>   | <b>88</b> |
| 4.4.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration.....         | 89        |
| 4.4.2 Antikörpergenerierung .....                                    | 90        |
| 4.4.3 Bindungsstudien mittels Microarray.....                        | 97        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.4.4      | Lateral Flow Assay zur Detektion von CXCL9 .....                                      | 104        |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>  | <b>122</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>7</b>   | <b>Anhang.....</b>  | <b>138</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Zusätzliche experimentelle Daten.....</b>  | <b>138</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Material.....</b>  | <b>149</b> |
| 7.2.1      | Geräte und Materialien.....   | 149        |
| 7.2.2      | Software .....  | 150        |
| 7.2.3      | Verwendete Chemikalien und Kits .....   | 150        |
| 7.2.4      | Puffer und Lösungen.....  | 151        |
| 7.2.5      | Verbrauchsmaterialien.....  | 152        |
| 7.2.6      | Antikörper und andere Proteine .....  | 152        |
| <b>7.3</b> | <b>Methoden.....</b>  | <b>154</b> |
| 7.3.1      | Bestimmung der Goldnanopartikelgröße und -konzentration .....                         | 154        |
| 7.3.2      | Validierung der Hybridomaüberstände mittels ELISA.....                                | 155        |
| 7.3.3      | Bestimmung der sCD25- und CXCL9-Konzentrationen in Patientenproben mittels ELISA..... | 156        |
| 7.3.4      | Untersuchung der Bindungseigenschaften der Antikörper mittels Microarray.....         | 157        |
| 7.3.5      | Lateral Flow Assay.....   | 161        |
|            | <b>Betreute Abschlussarbeiten.....</b>  | <b>164</b> |
|            | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>  | <b>165</b> |
|            | <b>Tabellenverzeichnis.....</b>   | <b>176</b> |
|            | <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>177</b> |
|            | <b>Publikationsliste .....</b>  | <b>178</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| AMR              | Antikörper-vermittelte Abstoßung (engl.: <i>antibody-mediated rejection</i> )           |
| APC              | antigenpräsentierende Zelle (engl.: <i>antigen-presenting cell</i> )                    |
| A <sub>450</sub> | Absorption bei 450 nm   |
| A <sub>spr</sub> | Absorptionsmaximum  |
| AU               | arbitrary unit  |
| AUC              | Fläche unter der Kurve (engl.: <i>area under the curve</i> )                            |
| AuNP             | Goldnanopartikel (engl.: <i>gold nanoparticle</i> )                                     |
| B                | Borderline Abstoßung  |
| BSA              | Rinderserumalbumin  |
| CDR              | Komplementaritätsbestimmende Region (engl.: <i>Complementarity determining region</i> ) |
| cm               | Zentimeter  |
| CRP              | C-reaktives Protein   |
| CXCL9 / MIG      | CXC-Ligand 9 (/engl.: <i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i> )                     |
| CZ               | Kontrollzone  |
| DA               | Detektionsantikörper  |
| DSA              | Donorspezifische Antikörper   |
| eGFR             | Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate  |
| ELISA            | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>  |
| FA               | Fängerantikörper  |
| Fab              | Fragment antigen binding  |
| Fc               | Fragment crystallizable   |
| h                | Stunde  |
| hCG              | Humanes Choriongonadotropin   |
| HLA              | Humanes Leukozytenantigen   |
| HRP              | Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horseredish peroxidase</i> )                          |
| HSA              | Humanes Serum Albumin   |
| HZ               | Hilfszone   |
| IF               | interstitielle Fibrose  |
| Ig               | Immunoglobulin  |
| IL-2R            | Interleukin-2-Rezeptor  |
| IL-2             | Interleukin-2   |
| kDA              | Kilodalton  |
| LFA              | Lateral Flow Assay  |
| nm               | Nanometer   |

|                |  |
|----------------|--|
| MHC            | Haupthistokompatibilitätskomplex                               |
| MIG            | <i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i> (auch CXCL9)       |
| Min            | Minute   |
| mg             | Milligramm   |
| NaCl           | Natriumchlorid   |
| ng             | Nanogramm  |
| NTA            | Nanoparticle Tracking Analysis                                 |
| PBS            | Phosphatgepufferte Salzlösung                                  |
| pg             | Picogramm  |
| pH             | <i>Potentia hydrogenii</i>                                     |
| pI             | Isoelektrischer Punkt  |
| REM            | Rasterelektronenmikroskop                                      |
| RPM            | Umdrehungen pro Minuten (engl.: <i>revolution per minute</i> ) |
| ROC            | Receiver Operating Characteristics                             |
| RT             | Raumtemperatur   |
| s              | Sekunde  |
| sCD25 / sIL-2R | Löslicher Interleukin-2 Rezeptor                               |
| TA             | tubuläre Atrophie  |
| TCMR           | T-Zell-vermittelte Abstoßung                                   |
| TCR            | T-Zellrezeptor (engl.: <i>T-cell receptor</i> )                |
| TZ             | Testzone   |
| UV             | Ultraviolett   |
| Vis            | Sichtbar (engl.: <i>visible</i> )                              |

## 1 Einleitung

Während der Corona-Pandemie haben sich weltweit bislang über 148 Millionen Menschen mit Sars-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) infiziert. Um Infizierte zu identifizieren und eine Ausbreitung des Virus zu vermeiden, werden seit Beginn Rachen- und Nasenabstriche von Personen mit potentiellen Symptomen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Zur Aufrechterhaltung der Infrastrukturen in Krankenhäusern und Pflegeheimen wurden zunehmend Schnelltests in Form eines Lateral Flow Assays (LFA) eingeführt. Schnelltests können innerhalb von Minuten nachweisen, ob eine Infektion vorliegt. Durch die einfache Anwendung und kurze Analysezeit können LFAs eine hohe Testkapazität eröffnen. LFAs werden bereits in vielen Bereichen, wie der frühzeitigen Identifikation einer Schwangerschaft oder allergener Lebensmittel, eingesetzt.

Eine frühzeitige Erkennung ist nicht nur bei einer Infektion mit Sars-CoV-2, sondern auch bei anderen Erkrankungen ausschlaggebend. So ist die Diagnose einer Abstoßungsreaktion nach einer Nierentransplantation essentiell, um sie schnell therapeutisch eindämmen zu können und somit die Nierenfunktion aufrechterhalten zu können. Trotz zahlreicher Untersuchungen der potentiellen Spenderniere und des Empfängers ist ein Hauptgrund für den Verlust einer transplantierten Niere die Abstoßung des körperfremden Gewebes. In Deutschland sind mehr als die Hälfte aller transplantierten Organe Nieren. 2019 wurden 2132 Nierentransplantationen durchgeführt. Ein Jahr nach der Transplantation werden bis zu 30 % akut und später bis zu 80 % der transplantierten Nieren chronisch abgestoßen.

Zur Untersuchung der transplantierten Niere werden die Patienten lebenslang einer periodischen Überwachung unterzogen, die in den ersten Monaten besonders ausgeprägt ist und engmaschig erfolgt. Am häufigsten wird der schnelle Anstieg des Serum-Kreatinin-Werts für die Überwachung des Transplantats verwendet und häufig als Anlass genommen, um ein Nierentransplantat zu biopsieren. Diese Funktionswertveränderung könnte jedoch auch Ausdruck ganz anderer Nierentransplantatstörungen sein, er ist unspezifisch für Abstoßung. Eine Biopsie ist aufwendig, schmerzhaft, und kann mit einem Infektionsrisiko verbunden sein, obgleich sie zu einer eindeutigen histomorphologischen Diagnose führt (Bewertung nach BANFF-Klassifikation, in der verschiedene Abstoßungstypen unterschieden werden). Daher werden zunehmend Alternativen zur Früherkennung der Nierentransplantatabstoßung erforscht. Dabei eignet sich der Nachweis spezifischer immunologischer Proteine (sogenannte Biomarker), die im Rahmen einer Abstoßung von Immunzellen nach Antigenkontakt und Darbietung des Antigens durch das phagozytierende zelluläre System (wie dendritische Zellen oder Makrophagen) entweder als frühe Signalstoffe wie das Chemokin CXCL9 produziert werden, um eine zelluläre Abräumreaktion durch zytotoxische

Leukozyten (antigenspezifische T-Lymphozyten) zu provozieren, oder als Ausdruck eben dieser Aktivierung von T-Lymphozyten. Hier wird CD25 als „cluster of determination“ auf der Membran der T-Lymphozyten exprimiert und zeigt eine antigenspezifische Aktivität an. Es kann daher auch als „soluble CD25“ in Plasma oder Urin des von einer solchen T-Zell-medierten Rejektion betroffenen Transplantatempfängers nachgewiesen werden. Hinweis auf den indikativen Charakter dieser Marker gaben Literaturstellen sowie eine aufwändige Multianalyse von bis zu 60 verschiedenen Biomarkern in Plasma und Urin nierentransplantierte Patienten im Falle einer Abstoßung, die dieser Arbeit vorangingen. Die Analyse solcher sensitiver und spezifischer Biomarker z.B. mittels LFAs könnte eine schnelle, hochsensitive, schmerz- und nebenwirkungsfreie Möglichkeit bieten, eine Nierenabstoßung frühzeitig festzustellen. Eine Biopsie würde dann nur noch als Bestätigung und zur klaren histomorphologischen Einordnung der Abstoßungsvariante dienen. Nicht-Abstoßer könnten spezifisch ausgeschlossen werden. Vorteil des LFAs ist auch, dass dieser Test zuhause als Screening-Instrument angewandt werden kann und weite Wege in ein Transplantationszentrum erspart bleiben.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines Multi-Parameter-Lateral Flow Assay (LFA)-Systems zur Früherkennung einer Abstoßungsreaktion nach einer Nierentransplantation. Die Arbeit wurde durch den ‚Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung‘ (EFRE) mit dem Projekttitel ‚Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik‘ gefördert. Das Projekt wurde mit den Kooperationspartnern Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, D) und Fassisi Deutschland GmbH (Göttingen, D) sowie im Verbund mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Stephan Immunschuh vom Institut für Transfusionsmedizin (ITM, MHH, Hannover, D) und der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr.-Ing. Oliver Bott von der Abteilung Informatik und Kommunikation (IK, HsH, Hannover, D) durchgeführt.

Zur Diagnose-Stellung einer Nierenabstoßung wird anlassbezogen in der Regel eine Nierenbiopsie verwendet. Als schnelle, hoch sensitive und schmerz- sowie nebenwirkungsfreies Präscreening zur Früherkennung einer Nierentransplantatabstoßung eignet sich hier der Nachweis spezifischer Biomarker mithilfe von LFAs. Hierfür sollen in dieser Arbeit die Proteine C-reaktives Protein (CRP), löslicher Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R, auch sCD25) und *Monokine induced by Gamma-Interferon* (MIG, auch CXCL9) dienen. Dabei wird CRP als Abgrenzungsfaktor gegenüber einer systemischen Entzündung eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeit kann in drei Bereiche eingeteilt werden, die für jeden Biomarker separat untersucht wurden: (i) die Bestimmung hochaffiner Antikörper-Kombinationen aus Fängerantikörper (FA) und Detektionsantikörper (DA) mittels Microarray-Studien als Modell für den LFA, (ii) die Validierung stabiler und spezifischer Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate für die Visualisierung des Testergebnisses auf dem LFA mittels Flokkulationstests und (iii) die Etablierung eines LFAs, der optimiert und etabliert werden soll. Die Validierung der etablierten LFAs soll anhand von Urin- und Plasmaproben von Nierentransplantat-Empfängern, deren Diagnose nach histomorphologischer Beurteilung des Nierentransplantatbiopsats anhand der jedes Jahr aktualisierten sogenannten „BANFF-Klassifikation“ erstellt wird, erfolgen.

### **3 Theoretische Grundlagen**

In dieser Arbeit soll ein Lateral Flow Assay (LFA) zur Früherkennung einer Abstoßungsreaktion nach einer Nierentransplantation entwickelt werden. Zur Einführung wird zunächst der theoretische Hintergrund einer Nierentransplantation mit ihrem Ablauf, den möglichen Abstoßungsarten sowie involvierten Biomarkern beleuchtet. Anschließend werden der Aufbau und die Durchführung eines LFAs beschrieben.

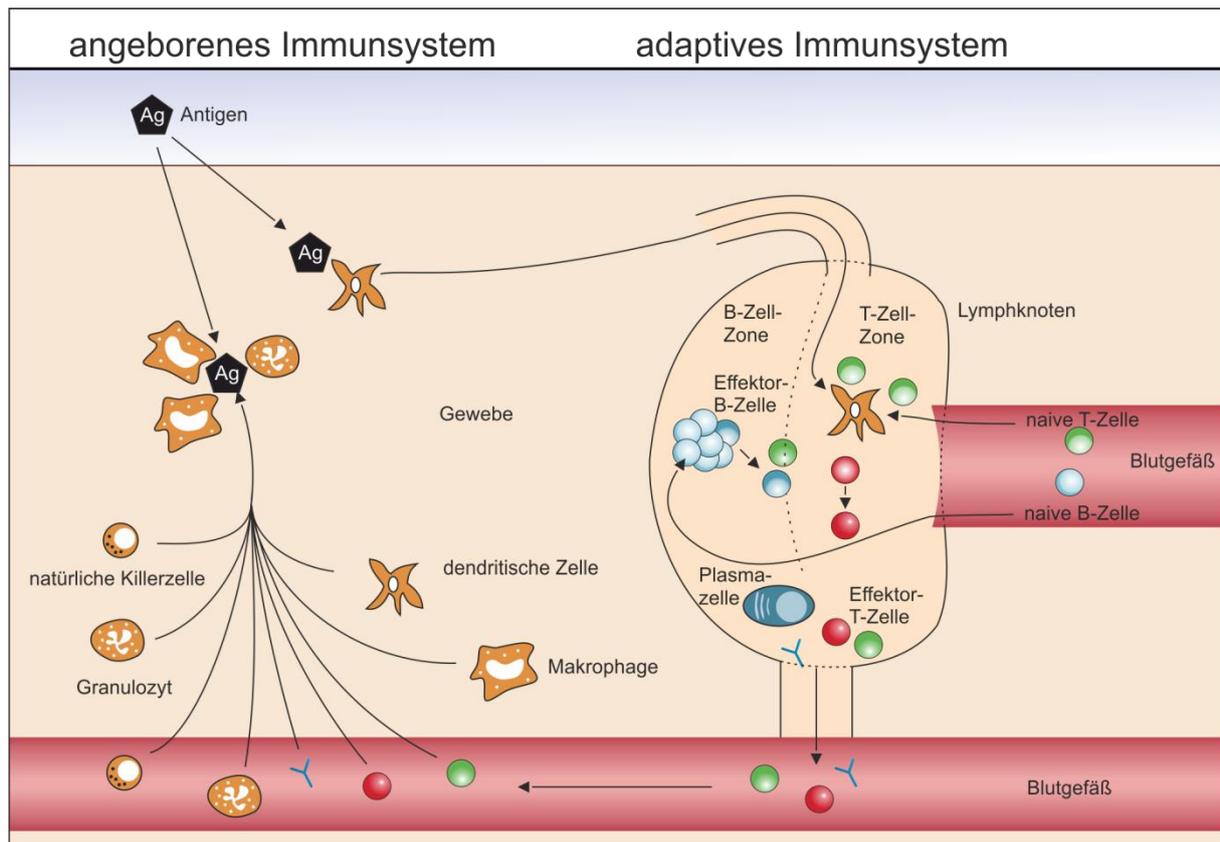
#### **3.1 Nierentransplantation**

Die Niere ist das am häufigsten benötigte und transplantierte Organ. In Deutschland wurden 2019 insgesamt 2132 Nieren transplantiert. Ende 2019 standen allerdings 11827 Menschen auf der Warteliste für eine Niere, sodass eine deutliche Diskrepanz zwischen durchgeführten und benötigten Nierentransplantationen in Deutschland besteht.<sup>1</sup> Eine Niere kann auf zwei verschiedenen Wegen gespendet werden: die Leichenspende sowie die Lebendspende. Bei beiden Wegen müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Bei einer Leichenspende handelt es sich um eine postmortale Organspende von Verstorbenen, bei denen u.a. der Hirntod von zwei erfahrenen und unabhängig arbeitenden Ärzten festgestellt werden muss. Die Verteilung von Organen durch Leichenspende wird von der Organisation ‚Eurotransplant‘ in den Mitgliedsländern (Österreich, Belgien, Kroatien, Deutschland, Ungarn, Luxemburg, den Niederlanden und Slowenien) geregelt. In Deutschland beträgt die Wartezeit für eine Leichennierenspende etwa sieben Jahre.<sup>2</sup> Bei der Lebendnierenspende muss der Spender ein naher Verwandter sein oder in besonderer Beziehung zum Empfänger stehen, um dem Organhandel vorzubeugen. Weiterhin muss ein Lebendspender auch zwei gesunde Nieren haben, die über einen guten allgemeinen Gesundheitszustand verfügen, damit er mit nur einer verbleibenden Niere eine normale Lebenserwartung hat.

Die erste erfolgreiche menschliche Lebendspendennierentransplantation wurde 1954 in Boston von J. Murray zwischen zwei eineiigen Zwillingen durchgeführt und 1990 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Der Zwilling mit der transplantierten Niere verstarb acht Jahre später an Herzversagen. Der Zwilling, der die Niere gespendet hat, lebte über 50 Jahre mit nur einer Niere.<sup>3</sup> Diese Spenderniere wurde nicht abgestoßen, da sie eine Lebendspende zwischen eineiigen Zwillingen war; viele Nieren wurden und werden jedoch nach erfolgreicher Transplantation aufgrund der Abwehrreaktion des Immunsystems nach einiger Zeit vom Transplantatempfänger abgestoßen. Bei dem Auftreten einer Abstoßung wird die transplantierte Niere vom Körper als ‚fremd‘ eingestuft und angegriffen. Die Entwicklung verschiedener immunsuppressiv wirkender Medikamente und fortlaufende Forschung führen bis heute zu einem deutlich längeren Transplantatüberleben. Nierenabstoßungen können akut oder chronisch verlaufen und in terminalem Nierenversagen enden.

### 3.1.1 Einführung in die Abwehrreaktion des Immunsystems

Die Immunologie beschreibt die Abwehr von Krankheitserregern, wie Bakterien, Viren und Pilzen, oder anderen körperfremden Stoffen durch den Körper. Das Immunsystem besteht zum einen aus dem angeborenen, unspezifischen und zum anderen aus dem adaptiven, spezifischen Immunsystem. Beide Bereiche des Immunsystems sind wichtig für die Gesamtheit der Immunabwehr und greifen ineinander über (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von angeborenem und adaptivem Immunsystem in Gegenwart eines körperfremden Antigens (Abbildung modifiziert nach Rink et al.<sup>4</sup>).**

Wird vom menschlichen Körper eine Struktur (unter anderem ein Antigen) als körperfremd erkannt, kommt es zu einer Immunabwehrreaktion. Zunächst wird das angeborene Immunsystem bestehend aus einer Reihe Phagozyten, wie den Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen sowie dem Komplementsystem aktiviert.<sup>4-6</sup> Dabei phagozytieren unter anderem einige Granulozyten und Makrophagen das Pathogen und machen vor allem Viren, Bakterien und Pilze so unschädlich. Natürliche Killerzellen eliminieren Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, die auf ihrer Oberfläche kein Haupthistokompatibilitäts-komplex (MHC) -Molekül der Klasse I aufweisen. Das Komplementsystem unterstützt das Immunsystem durch Anlagerung von Proteinen auf dem Pathogen. Dadurch werden sowohl Entzündungsreaktionen ausgelöst und Phagozyten angezogen, als auch die Lyse des Pathogens durch Einfügen von Poren eingeleitet. Dendritische Zellen phagozytieren ebenfalls das Pathogen,

präsentieren es an ihrer Oberfläche und wandern in lymphatisches Gewebe. Zusätzlich produzieren dendritischen Zellen und Makrophagen Zytokine und setzen diese frei. Zu den Zytokinen gehören Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine und Chemokine. Sie gehören ebenfalls zum adaptiven Immunsystem und sind an der Aktivierung, Differenzierung sowie Proliferation der Immunzellen beteiligt. Durch die Zytokine wird die Akute-Phase-Reaktion eingeleitet, bei der Leberzellen angeregt werden Akute-Phase-Proteine, wie z.B. C-reaktives Protein (CRP), zu produzieren und somit die Immunantwort zu verstärken. Chemokine erzeugen eine Wanderung von z.B. Leukozyten durch Chemotaxis zu den Zielzellen. Mit Hilfe von Chemokinen gelangen die dendritischen Zellen mit den Informationen über das Pathogen, dessen Peptidfragmente sie auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, zu dem adaptiven Immunsystem ins lymphatische Gewebe (z.B. Lymphknoten) zur sogenannten T-Zell-Zone. In der T-Zell-Zone treffen dendritische Zellen auf naive T-Zellen, die differenzieren und proliferieren, wenn sie auf ihr Antigen treffen, und zur Effektorzellen werden. Antigenpräsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen, besitzen entweder MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und präsentieren Peptidfragmente, die aus dem Zytosol stammen oder MHC-Klasse-II-Moleküle, die Peptidfragment aus dem Extrazellulärraum präsentieren. Zellen mit MHC-Klasse-I-Molekülen werden von zytotoxischen T-Zellen, den CD8<sup>+</sup>-Zellen, gebunden. Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen werden hingegen von CD4<sup>+</sup>-Helferzellen erkannt. Körper eigene Zellen weisen MHC-Moleküle auf, sodass mit Hilfe der MHCs körpereigene von körperfremden Zellen unterschieden werden können. Die Effektorzellen verlassen anschließend das lymphatische Gewebe, um körpereigene Zellen, die körperfremde Peptidfragmente präsentieren, aufzuspüren und über ihren T-Zell-Rezeptor zu binden. Bei dem Menschen wird der MHC auch humanes Leukozytenantigen (HLA)-System genannt und spielt bei Transplantationen eine wichtige Rolle. Unterschiede in den HLA-Merkmalen von Spender und Empfänger können zu Abstoßungsreaktionen führen, da diese Zellen als fremd eingestuft werden.

Neben den T-Zellen reifen auch die B-Zellen im lymphatischen Gewebe, in der B-Zell-Zone. B-Zellen erkennen und präsentieren ebenfalls mit ihrem Rezeptor Antigene. Wird das Antigen von einer passenden T-Helferzelle erkannt, differenziert die naive B-Zelle zu einer Plasmazelle und ist in der Lage hochaffine Antikörper zu produzieren. Die freigesetzten Antikörper können u.a. ein Pathogen für den Abbau markieren, wodurch dann Proteine des Komplementsystems binden können. Ebenfalls können naive B-Zellen durch Aktivierung zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, sodass zu einem späteren Zeitpunkt bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort hervorgerufen werden kann.<sup>4-6</sup>

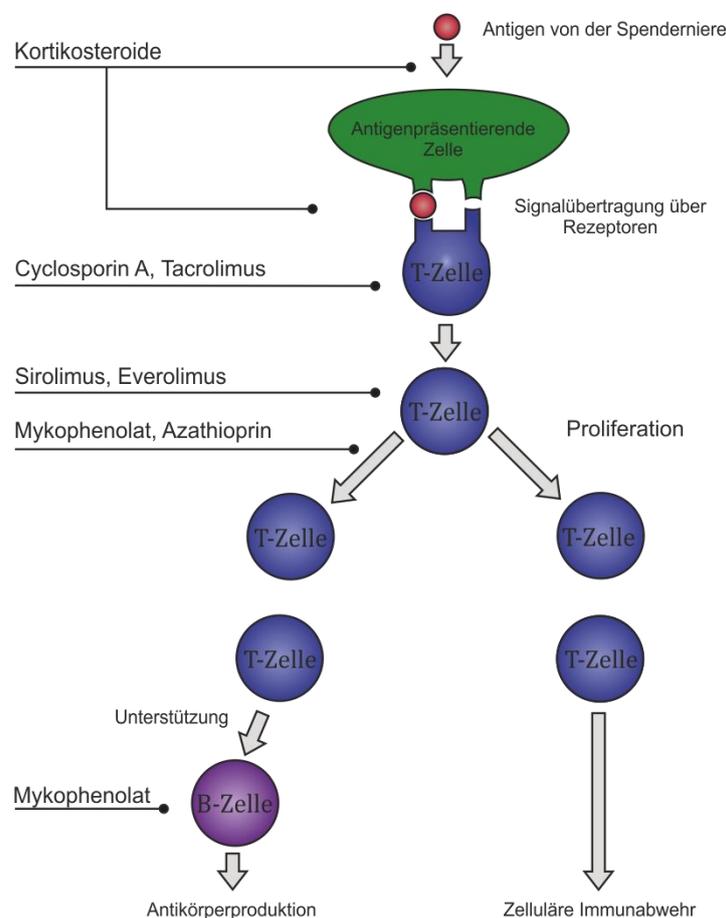
### 3.1.2 Einfluss der Immunreaktion auf eine Nierentransplantation

Bevor eine Transplantation vorgenommen werden kann, werden Spender und Empfänger auf ihre Histo-Kompatibilität untersucht. Hierbei wird das Hauptaugenmerk auf die Übereinstimmung der Blutgruppe, eine HLA-Typisierung und bereits vorhandene Antikörper gegen HLA-Merkmale des Spenders gelegt. Bei der HLA-Typisierung wird das Empfängerserum gegen verschiedene Lymphozyten inkubiert, bei bereits vorhandenen Antikörpern gegen die HLA-Strukturen der verwendeten Lymphozyten sterben die Lymphozyten ab. Anhand dieser Typisierung kann bei der Organvergabe vorweg ein virtueller Abgleich der Spender und Empfänger-HLA-Merkmale erfolgen. Kurz vor der möglichen Nierentransplantation wird die sogenannte Kreuzprobe (Crossmatch) durchgeführt. Dabei werden wie bei der HLA-Typisierung möglicherweise bereits präformierte Antikörper des Empfängers gegen die Spenderniere ausgeschlossen. Diesmal werden jedoch Lymphozyten des Spenders direkt mit Serum des Empfängers gemischt. Wenn die Zellen des Empfängers zerstört werden, ist die Kreuzprobe positiv und die Transplantation wird nicht durchgeführt.<sup>7</sup> Bei einer Lebendnierentransplantation zeigen blutgruppenkompatible und blutgruppeninkompatible Transplantationen vergleichbare Ergebnisse.<sup>8</sup> Bei einer Lebendnierspender kann schon Wochen vor der Transplantation durch Desensibilisierung mittels Anti-CD20-Antikörpern, Plasmapherese oder Immunabsorption die Abstoßungsreaktion verringert und dadurch eine Transplantation ermöglicht werden.<sup>9,10</sup> Spender mit Krebs und Infektionskrankheiten wie HI-Viren, Hepatitisviren B und C, und Syphilis werden generell ausgeschlossen.<sup>11,12</sup>

Um auch nach der Transplantation einer Abstoßung vorzubeugen, wird der Patient mit verschiedenen Untersuchungen überwacht und bekommt Immunsuppressiva verabreicht. Als Goldstandard zur möglichst frühzeitigen Erkennung einer Abstoßungsreaktion gilt die Nierenbiopsie. Die Erhöhung des Serum-Kreatinin-Spiegels wird als unspezifischer Marker ebenfalls herangezogen.<sup>13</sup> Zusätzlich gilt die Proteinurie als Zeichen einer bereits irreversiblen Schädigung der glomerulären (die Nierenknäulchen umgebenden) Filtrationsbarriere. Abstoßungsbedingte Veränderungen des Gewebes treten meistens verteilt auf, weshalb bei einer Biopsie zwei Proben (mind. 5x5x5 mm)<sup>14</sup> genommen werden, bei denen mindestens zehn Glomeruli (Nierenknäulchen) und zwei kleine Arterien (Blutgefäße) enthalten sind.<sup>15,16</sup> Zur Untersuchung der transplantierten Niere sind Patienten mit einem Nierentransplantat regelmäßigen Besuchen im Krankenhaus ausgesetzt. So werden an der Medizinischen Hochschule Hannover Transplantatempfänger in dem ersten Monat nach der Transplantation zwei bis drei Mal pro Woche untersucht, in dem zweiten und dritten Monat erfolgt die Untersuchung wöchentlich und monatlich im vierten bis zwölften Monat. Ab dem zwölften Monat erfolgen die Untersuchungen entweder monatlich oder alle drei bis sechs Monate. Auf Grund der hohen Unwägbarkeiten bei der Voraussage und Diagnosestellung einer Nierenabstoßung ist bis heute

eine Transplantatbiopsie zur Klassifizierung einer Abstoßung unabdingbar, weshalb in der Regel Protokollbiopsien sechs, zwölf und 26 Wochen nach der Transplantation durchgeführt werden.<sup>17,18</sup> Allerdings sind Biopsien nicht ungefährlich und bergen wie jeder andere invasive Eingriff Risiken wie Blutungen oder Infektionen.<sup>14,19,20</sup>

Zur immunsuppressiven Behandlung wird dem Patienten zunächst ein monoklonaler Antikörper gegen den Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R/CD25, Kapitel 3.2.2), der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, verabreicht, um die akute Abstoßung zu minimieren. Zusätzlich können unterschiedliche Arzneistoffe aus verschiedenen Gruppen verabreicht werden, um die Aktivierung, Proliferation und Vermehrung der T-Zellen zu unterbinden. Außerdem können Steroide zur Unterdrückung von akuten Entzündungsreaktionen eingesetzt werden (Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Einsatz verschiedener Medikamente zur Minimierung einer Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantats (Abbildung modifiziert nach Halloran et al.<sup>21</sup>).**

Häufige Ursachen für Nierenversagen sind unter anderem langjähriger Diabetes mellitus<sup>22</sup>, Glomerulonephritis<sup>23</sup>, chronische Nierenbeckenentzündungen, eine Nierenerkrankung bei Bluthochdruck<sup>11</sup>, Atherosklerose<sup>24</sup>, eine Nierenerkrankung bei Tumoren<sup>25</sup> oder eine Nierenerkrankung bei anderen Systemerkrankungen. Neben den vom Körper eingeleiteten Abwehrmechanismen können noch weitere Faktoren zum Nierenversagen führen.<sup>26</sup> Hohes Alter

des Spenders geht häufig einher mit marginaleren Organfunktionen und einem erhöhten Risiko des Organzerfalls sowie schlechterer Durchblutung des Organs.<sup>27</sup> Ebenfalls spielt auch das Alter des Empfängers eine große Rolle, wobei Studien zeigen, dass die Anzahl der Abstoßungen bei jüngeren Empfängern höher ist als bei Älteren.<sup>26,27</sup> Dazu kommt die Non-Adhärenz, bei der die Patienten ihre auf sie eingestellte Arzneimitteltherapie nicht einhalten. Ebenso führt auch eine verlängerte kalte Ischämiezeit, die Zeit in der die Niere nicht durchblutet ist, sowie eine verzögerte Transplantatfunktionsaufnahme zu einer erhöhten Gefahr der Abstoßung.<sup>28,29</sup> Hier verbleiben manche Organe durch den Stress der Transplantation zunächst im Stadium eines akuten Nierenversagens. Zusätzlich können auch virale Infektionen wie das BK-/Polyomavirus und Cytomegalovirus oder andere Infektionen das Immunsystem angreifen und Abstoßungsreaktionen triggern, wodurch das Transplantat geschädigt wird.

Trotz der zahlreichen Vor- und Nachuntersuchen des Nierentransplantats wird die transplantierte Niere häufig auf humoraler oder zellulärer Ebene abgestoßen. Leichennierenspenden werden im Durchschnitt nach 13,8 Jahren abgestoßen, wohingegen Lebendnierenspenden erst nach 21,6 Jahren abgestoßen werden.<sup>30</sup>

### **3.1.3 Abstoßungsarten**

Um die Nierenabstoßung systematisch einordnen zu können, wurde 1991 die BANFF-Klassifizierung eingeführt, welche seither regelmäßig aktualisiert wird.<sup>31</sup> Bei der BANFF-Klassifizierung wurden die folgenden Diagnose-Kategorien festgelegt (Tabelle 3-1):

Kategorie 1: Normal

Kategorie 2: Antikörper-vermittelte Abstoßung (AMR)

Kategorie 3: Borderline-Abstoßung (B)

Kategorie 4: T-Zell-vermittelte Abstoßung (TCMR)

Kategorie 5: Interstitielle Fibrose (IF) und tubuläre Atrophie (TA)

Kategorie 6: Sonstige Veränderungen.

Hierbei wird besonderes Augenmerk auf morphologische Kriterien und den Zeitpunkt des Auftretens nach der Transplantation gelegt. Erst dank der Klassifizierung konnte eine Unterscheidung zwischen AMR und TCMR getroffen werden.<sup>32</sup> Die auf die Diagnose folgenden Therapieansätze sind dabei verschieden und therapeutisch von hoher Relevanz.

**Tabelle 3-1: BANFF-Kriterien zur Einordnung der Abstoßungsart nach Nierentransplantation (Tabelle aus Loupy et al.<sup>33</sup>).**

|   |
|---|
| Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes  |
| Category 2: Antibody-mediated changes   |
| Active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis   |
| <p>1. Histologic evidence of acute tissue injury, including 1 or more of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microvascular inflammation (<math>g &gt; 0</math> and/or <math>ptc &gt; 0</math>), in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, <math>ptc \geq 1</math> alone is not sufficient and <math>g</math> must be <math>\geq 1</math></li> <li>• Intimal or transmural arteritis (<math>v &gt; 0</math>)</li> <li>• Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause</li> <li>• Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause</li> </ul> <p>2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including 1 or more of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linear C4d staining in peritubular capillaries or medullary vasa recta (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d &gt; 0 by IHC on paraffin sections)</li> <li>• At least moderate microvascular inflammation (<math>[g + ptc] \geq 2</math>) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, <math>ptc \geq 2</math> alone is not sufficient and <math>g</math> must be <math>\geq 1</math></li> <li>• Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, of thoroughly validated</li> </ul> <p>3. Serologic evidence of circulating donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met</p> |
| Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis   |
| <p>1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following:</p> <p>Transplant glomerulopathy (<math>cg &gt; 0</math>) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscope (EM) alone (<math>cg1a</math>)</p> <p>Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (<math>ptcml1</math>; requires EM)</p> <p>Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favour chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required</p> <p>2. Identical to criterion 2 for active ABMR, above</p> <p>3. Identical to criterion 3 for active ABMR, above, including strong recommendation for DSA testing whenever criteria 1 and 2 are met. Biopsies meeting criterion 1 but not criterion 2 with current or prior evidence of DSA (posttransplant) may be stated as showing chronic ABMR, however remote DSA should not be considered for diagnosis of chronic active or active ABMR</p>  |

|  |
|--|
| Chronic (inactive) ABMR  |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. cg&gt;0 and/or severe ptcml (ptcml1)</li> <li>2. Absence of criterion 2 of current/recent antibody interaction with the endothelium</li> <li>3. Prior documented diagnosis of active or chronic active ABMR and/or documented prior evidence of DSA</li> </ol>   |
| C4d staining without evidence of rejection; all 4 features must be present for diagnosis   |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4&gt;0 by IHC on paraffin sections)</li> <li>2. Criterion 1 for active or chronic active ABMR not met</li> <li>3. No molecular evidence for ABMR as in criterion 2 for active and chronic active ABMR</li> <li>4. No acute or chronic active TCMR, or borderline changes</li> </ol>   |
| Category 3: Borderline (Suspicious) for acute TCMR   |
| <p>Foci of tubulitis (t1,t2, or t3) with mild interstitial inflammation (i1), or mild (t1) tubulitis with moderate-severe interstitial inflammation (i2 or i3)</p> <p>No intimal or transmural arteritis (v = 0)</p>   |
| Category 4: TCMR   |
| Acute TCMR   |
| <p>Grade IA: Interstitial inflammation involving &gt;25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including tubules that severely atrophic</p> <p>Grade IB: Interstitial inflammation involving &gt;25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including tubules that severely atrophic</p> <p>Grade IIA: Mild to moderate intimal arteritis (v1), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis</p> <p>Grade IIB: Severe intimal arteritis (v2), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis</p> <p>Grade III: Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid necrosis involving medial smooth muscle with accompanying mononuclear cell intimal arteritis (v3), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis</p> |
| Chronic active TCMR  |
| <p>Grade IA: Interstitial inflammation involving &gt;25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-FTA3) <u>AND</u> &gt; 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with moderate tubulitis (t2 or t-IFTA2) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules; other known causes of i-IFTA should be ruled out</p> <p>Grade IB: Interstitial inflammation involving &gt;25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-FTA3) <u>AND</u> &gt; 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with severe tubulitis (t3 or t-IFTA3)</p>   |

involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules; other known causes of i-IFTA should be ruled out

Grade II: Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neointima). This may also be manifestation of chronic active or chronic ABMR or mixed ABMR/TCMR

Category 5: polyomavirus nephropathy

---

PVN Class 1

pvl 1 and ci 0-1

PVN Class 2

pvl 1 and ci 2-3 OR

pvl 2 and ci 0-3 OR

pvl 3 and ci 0-1

PVN Class 3

Pvl 3 and ci 2-3

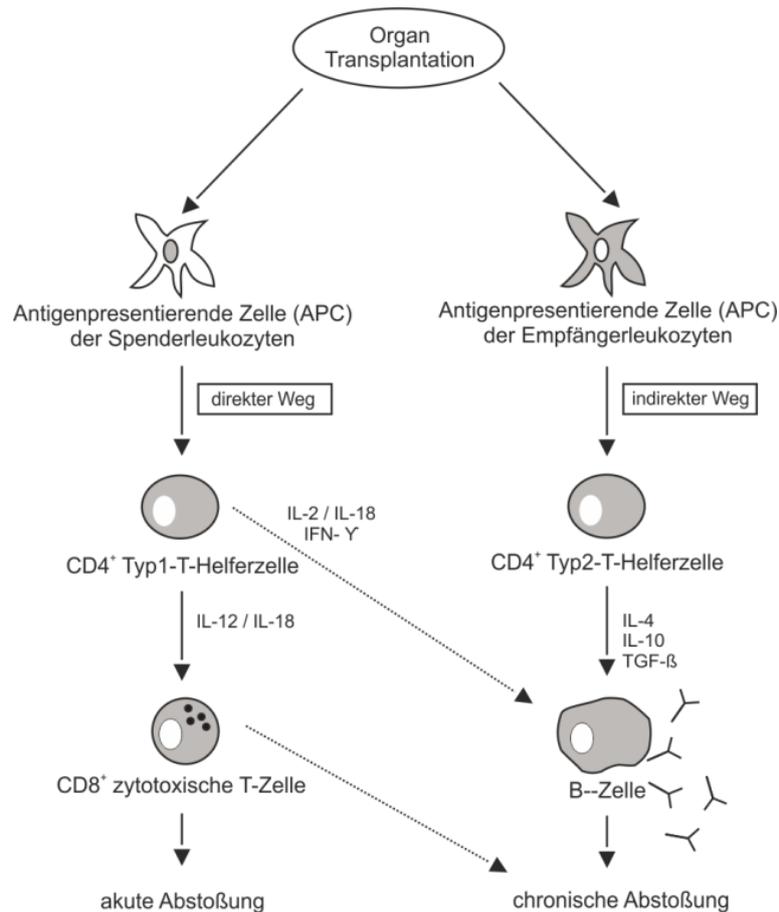
### 3.1.3.1 T-Zell-vermittelte Abstoßung

Bei der T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR) werden aktive Effektorzellen nach Kontakt mit Fremddantigenen (Alloantigenen) ausgebildet und T-Zellen werden durch eine Signalkaskade aktiviert. Diese Aktivierungskaskade wird durch die Erkennung fremder Spenderantigene durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) entweder über den direkten oder den indirekten Weg eingeleitet (Abbildung 3-3).

Bei dem direkten Weg befinden sich die Alloantigene auf den APCs der Spenderleukozyten, wo sie durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen erkannt werden. Dabei erkennen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen nur HLA-Klasse-II-Moleküle und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen nur HLA-Klasse-I-Moleküle. Gewöhnlich antwortet von 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Zellen nur eine T-Zelle auf ein Antigen, auf Alloantigene, die über den direkten Weg präsentiert werden, antworten jedoch um die 1-10% der Empfänger-T-Zellen.<sup>35,36</sup> Der direkte Weg kann nach ein paar Tagen nach der Transplantation jedoch vernachlässigt werden, da die Spenderleukozyten abgebaut werden.

Bei dem indirekten Weg befinden sich die Alloantigene auf den APCs der Empfängerleukozyten, welche diese vorher über Endozytose aufgenommen haben und Proteinbruchstücke des fremden Gewebes über HLA-Klasse-II-Moleküle den eigenen Lymphozyten präsentieren. Hierbei erkennen in der ersten Phase der Abstoßungsreaktion die CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen die Peptidfragmente des Spenderorgans in den HLA-Molekülen als fremd, somit werden sie aktiviert, proliferieren und sekretieren Zytokine. Dabei können schon geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz bei der Peptidbindestelle der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) zu

einer Abstoßung führen.<sup>37</sup> Im weiteren Verlauf beschädigen Makrophagen die als fremd erkannten Zellen und B-Zellen werden zur Antikörperproduktion angeregt.



**Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Verlaufes einer T-zell-vermittelten akuten bzw. chronischen Nierenabstoßung über den direkten bzw. indirekten Weg (Abbildung modifiziert nach Joosten<sup>34</sup>).**

Der indirekte Weg spielt über einen längeren Zeitraum gesehen eine wichtige Rolle, da zunächst nur wenige T-Zellen die Alloantigene erkennen und dadurch aktiviert werden.<sup>38</sup> Bei einer akuten TCMR enthalten die Tubuli (Nierenkanälchen), das Interstitium (u.a. Bindegewebe) und die Blutgefäße des Allotransplantats eine vermehrte Konzentration Lymphozyten.<sup>39,40</sup> Weiterhin werden die Befunde morphologisch mit den Begriffen interstitiell (Grad I) und vaskulär (Grad III) unterschieden. Diese Einteilung entstammt der BANFF-Klassifikation (Tabelle 3-1).

### 3.1.3.2 Antikörper-vermittelte Abstoßung

Bei der Antikörper-vermittelten Abstoßung (AMR) werden Plasmazellen durch Alloantigene auf Endothelzellen aktiviert, wodurch unter anderem das Komplementsystem aktiviert wird. In den ersten Stunden bis Tagen nach der Transplantation kann durch Antikörper, die sich bei der Transplantation noch im Nierentransplantat befinden, eine aktive Antikörper-vermittelte Abstoßung eingeleitet werden.<sup>41</sup> Allerdings tritt die aktive Antikörper-vermittelte Abstoßung heute nur noch sehr selten auf, da diese durch die Untersuchung des Empfänger-Serums vor der Transplantation auf präformierte Antikörper gegen die Spenderniere durch Crossmatch

ausgeschlossen wird. Um das Transplantat nicht zu verlieren, muss eine schnelle Diagnose und Behandlung stattfinden.<sup>37</sup>

Im Gegensatz zur aktiven Antikörper-vermittelten Abstoßung gibt es auch die chronische Antikörper-vermittelte Abstoßung, welche häufig die Hauptursache für das späte Versagen von Nierentransplantaten ist.<sup>42,43</sup> Die Diagnose AMR setzt das gleichzeitige Vorhandensein von Spender-spezifischen Antikörpern, einen ausgeprägten histopathologischen Befund (Beurteilung krankhafter Veränderung von Gewebe) und C4d-Ablagerungen in peritubulären (Nierenkanälchen-umgebend) Kapillaren des Spenderorgans voraus.<sup>43-45</sup> Durch die Bindung von Spender-spezifischen Antikörpern an das Endothel der peritubulären und glomerulären (Nierenknäulchen-umgebend) Kapillaren des Spenderorgans, wird das Komplementsystem initiiert.<sup>39</sup> C4d ist das inaktivierte Spaltprodukt der Komplementkaskade. Trotz kontroverser Diskussionen hinsichtlich der Eignung als Marker, da in Studien sowohl C4d-positive Proben ohne AMR als auch C4d-negative Proben mit AMR nachgewiesen werden konnten, wird die C4d-Färbung zur Diagnose einer AMR verwendet.<sup>46</sup> Das Spaltprodukt wird im Gegensatz zu seinem Ausgangsmolekül, dem C4b, kovalent für mehrere Tage in das Gewebe verankert und kann dadurch nicht wie die anderen Spaltprodukte vom Blut abtransportiert werden und eignet sich folglich als guter Marker für Antikörper-assoziierte Abstoßung.<sup>47-49</sup>

Die Behandlung einer AMR wird auch durchgeführt, wenn nicht alle Kriterien für eine hinreichende Diagnose erfüllt sind. Dabei wird das Hauptaugenmerk auf die Reduzierung bzw. Entfernung der Spender-spezifischen Antikörper sowie die Spender-spezifischen Antikörper produzierenden B-Zellen gelegt.

### **3.1.3.3 Borderline-Abstoßung**

Bei einer Borderline-Abstoßung besteht der Verdacht auf eine TCMR, wobei der Schwerpunkt auf einer Tubulitis mit milder interstitieller Inflammation oder milder Tubulitis mit moderater bis schwerer interstitieller Inflammation liegt. Dabei sind die Symptome für eine Diagnose hinsichtlich einer akuten Abstoßungsreaktion unzureichend, sodass nicht vorhersagbar ist, ob sich eine akute Abstoßung entwickeln wird. Je nach klinischen Umständen wird entsprechend die Abstoßungsbehandlung therapeutisch eingeleitet (vgl. Kapitel 3.1.2).<sup>50</sup>

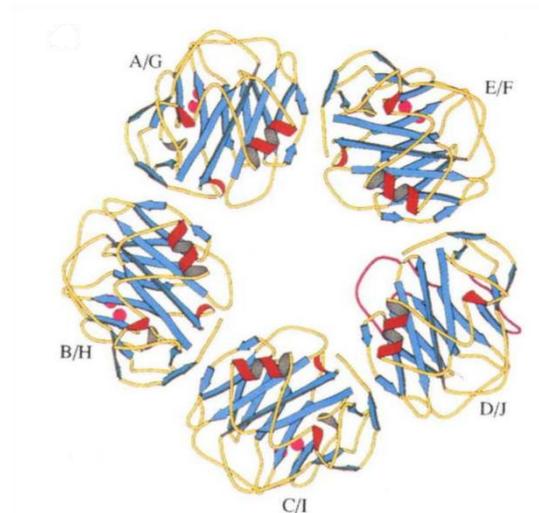
## **3.2 Biomarker bei einer Abstoßungsreaktion**

Zur Verbesserung der Abstoßungsdiagnostik werden stetig neue Biomarker erforscht.<sup>51,52</sup> In dieser Arbeit wurden der unspezifische Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) sowie die zwei Biomarker sCD25 (auch sIL-2R $\alpha$ ) und CXCL9 (auch MIG, *Monokine induced by Gamma-Interferon*) zur Nierenabstoßungsdiagnostik verwendet. Dabei wird CRP als Abgrenzungsfaktor gegenüber einer systemischen Entzündung eingesetzt. sCD25 und CXCL9 wurden gewählt, da sich

diese beiden Proteine während einer vorherigen Studie von Prof. Dr. med. Cornelia Blume am Institut für Technische Chemie als signifikante Biomarker herausgestellt haben.

### 3.2.1 CRP

Das C-reaktive Proteine (CRP) wurde 1930 an der Rockefeller Universität von den Forschern William S. Tillett und Thomas Francis entdeckt.<sup>53</sup> Die Wissenschaftler wiesen das Protein im Blut eines Patienten mit einer Lungenentzündung nach, wo es mit den C-Polysacchariden der Pneumokokken-Zellwand interagiert und darauf bezogen benannt wurde. CRP gehört zu den Pentraxinen und setzt sich aus fünf identischen, nicht glykosylierten Peptiduntereinheiten (auch Protomere genannt) zusammen, die jeweils aus 206 Aminosäuren bestehen.<sup>54</sup> Die einzelnen Protomere sind nicht kovalent aneinander gebunden und alle Protomere weisen die gleiche Orientierung auf.<sup>55</sup> Das hoch konservierte CRP besitzt eine ringförmige Struktur, ist insgesamt 118 kDa groß und gehört zu den akute Phase-Proteinen, weshalb es häufig im Patienten-Serum überprüft wird, um den Endzündungsstatus oder eine Gewebeverletzung zu verfolgen (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4: Pentamere Struktur von C-Reaktiven Protein (Abbildung aus Shrive et al.<sup>56</sup>).**

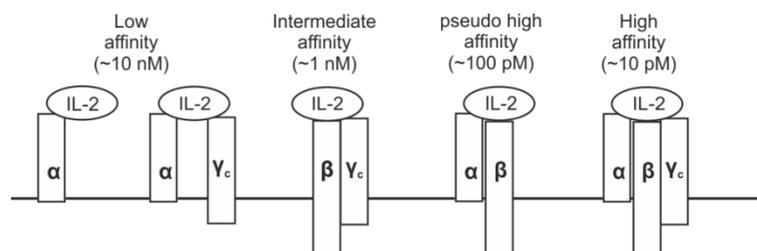
Im Gegensatz zu Antikörpern tritt CRP in einem frühen Entzündungsstadium auf, nachdem z.B. in der Leber das Zytokin IL-6 sekretiert wurde, und reagiert auf eigene sowie fremde Moleküle mit bestimmten Mustern. Dabei bindet es calciumabhängig an Phosphocholin, eine polare Kopfgruppe vom Phosphatidylcholin, die nur bei geschädigten Zellen freigelegt ist<sup>57,58</sup>, und ist dadurch in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren.<sup>59,60</sup> Außerdem ist CRP unter anderem in der Lage an Polykatione<sup>61-64</sup>, Histone<sup>65</sup>, apoptotische Zellen<sup>66</sup>, oxidiertes *Low-density* Lipoprotein<sup>67</sup> und Chromatin<sup>68,69</sup> zu binden.

CRP wird in der Leber synthetisiert und ist mit einer Konzentration von bis zu 10 mg·L<sup>-1</sup> bei einem nicht erkrankten Menschen im Serum zu finden.<sup>70</sup> Liegt bei einem Patienten allerdings eine

Entzündung vor, so kann das CRP-Level auf ein Vielfaches ansteigen.<sup>70-72</sup> In den ersten 6-8 Stunden nach Beginn der akuten Entzündungsreaktion wird die CRP-Bildung vermehrt angeregt bis sie nach 24-48 Stunden ihr Maximum erreicht hat.<sup>73</sup> Auf Grund der kurzen Halbwertszeit des Proteins kann eine Entzündungsreaktion sehr gut mitverfolgt werden.<sup>54,73</sup> Liegt ein stark erhöhter CRP-Gehalt bei Niereninsuffizienz vor, kann auch dies ein erhöhtes Risiko für die akute Abstoßung darstellen.<sup>74-76</sup>

### 3.2.2 sCD25

Rezeptoren auf T-Zellen sind in der Lage verschiedene exogene Antigene sowie Allogene erkennen und binden zu können. Wird ein entsprechendes Molekül gebunden, so ändert die Zelle ihren Status in eine aktivierte T-Zelle (Kapitel 3.1.1). Beispielsweise wird durch die Bindung des Zytokins Interleukin-2 (IL-2) an den Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) die T-Zelle aktiviert und eine komplexe Signalkaskade der Immunantwort initiiert. IL-2R ist aus drei Untereinheiten aufgebaut: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) und der  $\gamma_c$ -Kette (CD132). Dabei befinden sich die  $\beta$ - und  $\gamma_c$ -Untereinheiten kontinuierlich an der Oberfläche der Zelle. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird hingegen erst von aktivierten T-Zellen exprimiert. Durch die verschiedenen Zusammensetzungen des Rezeptors liegen unterschiedliche Affinitäten vor. Der *low affinity receptor* ( $K_d=10^{-8}$  M) besteht entweder nur aus der Untereinheit IL-2R $\alpha$  oder aus der Kombination von IL-2R $\alpha$  und der  $\gamma_c$ -Kette. Der *intermediate affinity receptor* ( $K_d=10^{-9}$  M) besteht aus IL-2R $\beta$  und der  $\gamma_c$ -Kette.<sup>77</sup> Der *pseudo high affinity receptor* ( $K_d=10^{-10}$  M) ist aus IL-2R $\alpha$  und IL-2R $\beta$  aufgebaut.<sup>78</sup> Der *high affinity receptor* ( $K_d=10^{-11}$  M) besteht aus allen drei Untereinheiten (IL-2R $\alpha$ -IL-2R $\beta$ -IL-2R $\gamma_c$ ).<sup>79</sup>



**Abbildung 3-5: Verschiedene Zusammensetzungen des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R) mit den Untereinheiten IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) und der  $\gamma_c$ -Kette (CD132) und der daraus resultierenden Affinitäten (Abbildung modifiziert nach Asao<sup>80</sup>).**

Die Typ I Transmembranproteine IL-2R $\beta$  und die  $\gamma_c$ -Kette werden von T- und B- Zellen sowie den natürlichen Killerzellen produziert und kommen auch in anderen Zytokin-Rezeptoren vor. IL-2R $\alpha$  hingegen ist einzigartig für den IL-2-Rezeptor. Besteht der Rezeptor aus allen drei Untereinheiten so kann IL-2 an den Rezeptor binden. Dabei bindet das Zytokin zunächst an IL-R $\alpha$ , was zu einer Konformationsänderung von IL-2 führt und die Affinität zu IL-2R $\beta$  und IL-2R $\gamma_c$  erhöht. Anschließend wird IL-2 von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sekretiert und hochaffine IL-2-Oberflächenrezeptoren

werden exprimiert. Außerdem wird die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten initiiert,<sup>81</sup> die Produktion weiterer Zytokine und Interferone angeregt sowie weitere zytotoxische Zellen werden aktiviert.<sup>82</sup>

Ebenfalls scheiden aktivierte T-Zellen die lösliche Form des IL-2R $\alpha$  aus, das sIL-2R $\alpha$  (sCD25). Die sezernierte sCD25-Konzentration ist proportional zu der Konzentration der membrangebundenen Form.<sup>83</sup> Hohe Konzentrationen an sCD25 werden bei verschiedenen Krankheiten wie Blutkrebs, in der aktiven Phase von verschiedenen Autoimmun- oder Infektionskrankheiten (HIV-1, Tuberkulose, Malaria)<sup>84,85</sup>, aber auch bei Organversagen ausgeschüttet.<sup>86</sup> Rasool et al. konnten zeigen, dass der sCD25-Level von Patienten, die nach der Nierentransplantation eine Abstoßungsreaktion aufwiesen, nach der Operation signifikant erhöht war im Vergleich zu vor der Transplantation und zur Kontrollgruppe (Abbildung 3-6).<sup>86</sup>

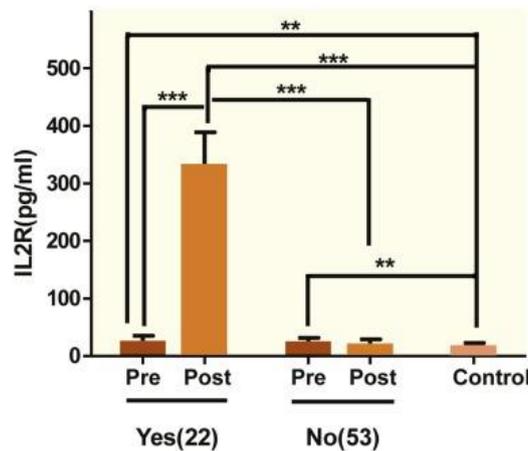


Abbildung 3-6: sCD25-Level von Patienten mit (yes, n=22) und ohne (no, n=53) Transplantatabstoßung vor (pre) und nach (post) der Nierentransplantation (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Abbildung aus Rasool et al.<sup>86</sup>).

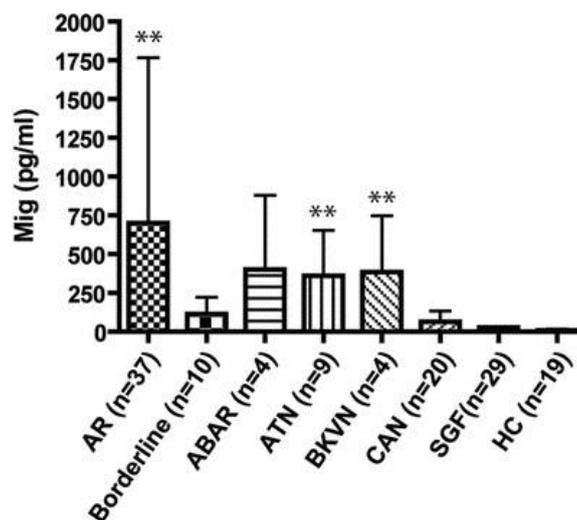
Hagras et al. und andere Forschergruppen zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen dem sCD25-Level von Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion und Patienten mit einem stabilen Transplantat.<sup>87-89</sup>

### 3.2.3 CXCL9

CXCL9, auch *Monokine induced by Gamma-Interferon* (MIG) genannt, ist ein Signalprotein aus der Gruppe der homologen Chemokine. Es besteht aus 125 Aminosäuren und ist 14 kDa groß.<sup>90</sup> Chemokine werden in Abhängigkeit ihres molekularbiologischen Aufbaus in Untergruppen eingeteilt. Dabei gibt es unter anderem zwei große Chemokin-Subklassen: die C-X-C-Familie und die CC-Familie. Die Klassen werden danach eingeteilt, an welcher Stelle sich die N-terminalen Cysteine befinden.<sup>91</sup> Bei den C-X-C-Chemokinen werden die zwei Cysteine durch eine Aminosäure ('X') getrennt. Weiterhin werden in dieser Gruppe die Chemokine danach unterschieden, ob sie das Tripeptid Glu-Leu-Arg aufweisen (ELR) oder nicht aufweisen (non-ELR). Bei den CC-Chemokinen folgen die beiden Cysteine direkt aufeinander. Zusätzlich gibt es noch die C-X3-C-

und die C-Familie, wobei diese jeweils nur aus einem Mitglied bestehen. CXCL9 gehört zu den non-ELR C-X-C-Chemokinen. Chemokine sind kleine Signalproteine, die mit Hilfe eines Konzentrationsgradienten z.B. Zellen im Organismus zu einem Ort locken (Chemotaxis), weshalb der Name auch aus den Worten Chemotaxis und Zytokin abgeleitet wurde.<sup>92</sup> Tritt im Körper z.B. eine Entzündungsreaktion auf, werden Chemokine vermehrt als chemotaktisch aktive Botenstoffe gebildet, wodurch dann Immunzellen angezogen werden.<sup>93</sup> Für die Bildung von CXCL9 ist Interferon- $\gamma$  verantwortlich, welches durch Bindung an seinen Rezeptor entsprechende Gene induziert.<sup>94</sup> CXCL9 bindet an den G-Protein-gekoppelten sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptor CXCR3, der hauptsächlich auf Typ1-Helfer-Zellen exprimiert wird<sup>95,96</sup> und auf NK-Zellen<sup>97</sup>, Monozyten<sup>98</sup>, dendritischen Zellen<sup>99</sup> und Endothelzellen<sup>97</sup> zu finden sein kann. Durch die Bindung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu bestimmten Veränderungen in der Zelle führt wie z.B. zum Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle und der Chemotaxis von Lymphozyten.

Mit dem Ziel weitere Biomarker zur non-invasiven Identifikation einer Abstoßung nach einer Nierentransplantation zu finden, wurden mehrere Chemokine, unter anderem CXCL9, genauer betrachtet (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7: Anstieg des CXCL9 (MIG)-Levels im Urin bei Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen (AR=akute Abstoßung, Borderline=Borderline-Abstoßung, ABAR=Antikörper-vermittelte Abstoßung (AMR), ATN=akute tubuläre Nekrose, BKVN=BK Virus Nephropathie, CAN= chronische Allograft Nephropathie, SGF= stabile Transplantatfunktion, HC=gesunde Kontrolle, \*\*p < 0,01) (Abbildung aus Hu et al.<sup>100</sup>).**

Hu et al. konnten bei der Untersuchung von 132 Urinproben zeigen, dass CXCL9 bei Proben mit einer akuten Abstoßung sowie bei akuter tubulärer Nekrose und BK Virus Nephropathie im Vergleich zu Proben mit einer chronischen Allograft Nephropathie, einer stabilen Transplantatfunktion oder einer gesunden Kontrolle signifikant erhöht ist.<sup>100</sup> Ciftci et al. konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Urinproben von Patienten mit einer

unauffälligen Biopsie und Urinproben von Patienten mit einer AMR oder TCMR zum Zeitpunkt der Abstoßung feststellen.<sup>101</sup>

### 3.3 Antikörper

Antikörper zählen auf Grund ihrer Fähigkeiten zu dem am häufigsten verwendeten Werkzeug im Labor und werden bei zahlreichen Nachweismethoden eingesetzt. Sie werden vom Immunsystem gebildet und bekämpfen somit Krankheitserreger, was wiederum für ihre biotechnologische Herstellung genutzt wird.

#### 3.3.1 Genereller Aufbau

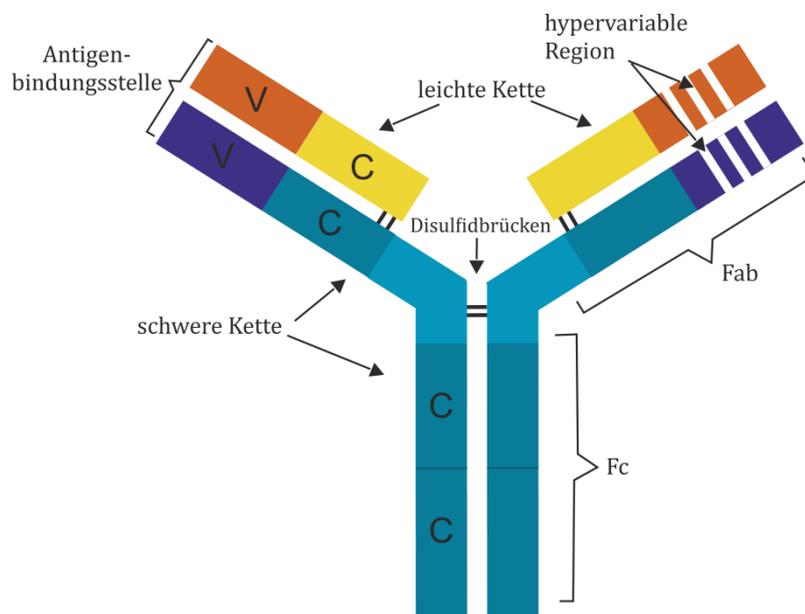
Antikörper, auch Immunglobuline genannt, werden von B-Zellen produziert und sind Teil der adaptiven Immunantwort (Kapitel 3.1.2). B-Zellen können entweder in Antikörperproduzierende Plasmazellen oder in Gedächtnis-B-Zellen differenzieren. Plasmazellen können bis zu 3000 Antikörper pro Sekunde sezernieren.<sup>102</sup> Zellen mit der höchsten Spezifität und Affinität der produzierten Antikörper werden als Gedächtniszellen etabliert, die bei erneuter Infektion aktiviert werden.<sup>103,104</sup>

Ein Antikörper bindet an sein passendes Antigen, welches z.B. als fremd erkannte Struktur auf Bakterien, Viren, Parasiten oder anderen Pathogenen vorkommen kann. Durch die Bindung des Antikörpers werden die als fremd erkannten Zellen z.B. für den Abbau markiert und anschließend von anderen Bestandteilen des Immunsystems unschädlich gemacht. Es gibt verschiedene Antikörperklassen, wobei Immunglobulin G (IgG) die am häufigsten vertretende Antikörperklasse im Menschen ist.<sup>105</sup> Ein IgG ist ein Y-förmiges Tetramer und besteht aus zwei schweren Ketten (50 kDa) und zwei leichten Ketten (25 kDa), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 3-8). Insgesamt weist ein IgG-Antikörper somit eine Molekülgröße von 150 kDa auf.<sup>106</sup>

Jeweils eine leichte Kette zusammen mit dem N-terminalen Teil einer schweren Kette formen das Fab-Fragment (*antigen-binding fragment*). Innerhalb dieses Fab-Fragmentes gibt es drei kleine, hypervariable Regionen, die CDRs (*complementarity determining region*). Die CDRs bilden die Antigenbindestelle, das sogenannte Paratop, welches an das passende Epitop des Antigens bindet. Durch die variablen CDRs kann eine große Vielfalt an Antikörpern entstehen. Der konstante C-terminale Teil der schweren Kette bildet die Fc-Region (*crystallisable fragment*) und ist spezifisch für seinen Herkunftsorganismus.<sup>104,107</sup>

Antikörper können in monoklonal und polyklonal eingeteilt werden. Monoklonale Antikörper werden im Labor in einem B-Zell-Klon hergestellt und sind gegen ein Epitop des Antigens gerichtet. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum eines Tieres gewonnen und bilden eine Vielfalt an Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope eines Antigens gerichtet sein

können.<sup>108</sup> Bei Anwendungen im Labor werden Antikörper in Primär- und Sekundärantikörpern unterschieden. Primärantikörper detektieren ein bestimmtes Antigen, wohingegen Sekundärantikörper, häufig für die Detektion mit einem Marker oder Konjugat gekoppelt, den primären Antikörper erkennen. Auf Grund dieser Eigenschaften sowie ihrer großen Vielfalt und hohen Spezifität werden Antikörper häufig in der Forschung und Diagnostik im Labor eingesetzt, wo sie meistens zur Detektion eines bestimmten Moleküls verwendet werden. So finden sie z.B. Einsatz beim Immunoblot, bei dem die zu interessierenden Proteine zunächst über eine Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophorese aufgetrennt werden, dann auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen werden und anschließend entweder direkt mit einem farbmarkierten Detektionsantikörper oder mit Hilfe eines weiteren Antikörpers indirekt über eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gefärbt werden.<sup>109</sup>



**Abbildung 3-8: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.** Dargestellt sind die Antigenbindestellen, schweren (blau-violett) und leichten (gelb-orange) Ketten sowie sind die Fc-Region (*crystallisable fragment*), Fab-Fragment (*antigen-binding fragment*) und die konstanten Regionen (,C') und die variablen Regionen (,V') (Abbildung modifiziert nach Hufnagel und Brettschneider<sup>107</sup>).

Antikörper werden ebenfalls in *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) eingesetzt. Hier gibt es verschiedene Testformate, wobei entweder das zu interessierende Antigen direkt oder zunächst ein Antikörper (auch Fängerantikörper genannt), der das Antigen im nächsten Schritt bindet, auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Nach der Zugabe des Antigens wird dieses wieder direkt oder indirekt mit einem Detektionsantikörper vergleichbar zum Immunoblot detektiert. ELISAs werden im labormedizinischen Bereich unter anderem zum Nachweis von HIV, Tuberkulose-Erreger, Allergenen<sup>110</sup>, sowie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Biomarker - CRP<sup>111</sup>, sCD25/IL-2R $\alpha$  und CXCL9 - eingesetzt, da man innerhalb weniger Stunden ein

Ergebnis vorliegen hat und der Patient entsprechend behandelt werden kann. Jede Anwendung im Labor erfordert bestimmte Kriterien an einen Antikörper, weshalb der Markt und somit die Produktion von Antikörpern umfangreich sind.

### **3.3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Seit 1975 werden monoklonale Antikörper mit Hilfe der Hybridoma-Technologie generiert und produziert. Durch diese Technik konnten erstmals aus Antikörper-sekretierenden B-Zellen Antikörper in großer Menge und konstanter Qualität im Labor erzeugt werden.<sup>112</sup> Für die Hybridoma-Technik wird zunächst ein Tier, z.B. eine Ratte oder eine Maus mit einem Antigen immunisiert. Als Antigen können Peptide, Proteine, Exosome oder ganze Zellen, die ein Oberflächentarget aufweisen, verwendet werden.<sup>113</sup> Dabei sollte das zu verwendende Antigen möglichst rein und nicht toxisch sein. Verunreinigungen des Antigens können zu Antikörpern mit geringer Affinität führen.<sup>108</sup>

Das Immunsystem des Tieres aktiviert und produziert nach Injektion spezifische B-Zellen, die Antikörper gegen das geimpfte Antigen sezernieren.<sup>108,113</sup> Eine erneute Immunisierung sorgt dafür, dass das immunologische Gedächtnis des Immunsystems aktiviert wird. Im nächsten Schritt wird dem immunisierten Tier die Milz entnommen, da hier besonders viele B-Zellen produziert werden. Die Antikörper-produzierenden Zellen werden isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Myelomzellen sind Tumorzellen, die keine zellspezifischen Funktionen aufweisen, aber mit ihren unbegrenzten Wachstumseigenschaften für die Antikörperproduktion gut geeignet sind. Durch die Fusion entstehen Hybridomazellen mit unbegrenztem Wachstum, die Antikörper produzieren können. Anschließend werden über das sogenannte HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) die Hybridoma-Zellen selektiert. Das Hypoxanthin ist ein natürlich vorkommendes Purinderivat. Zur Metabolisierung dieses Moleküls wird das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) benötigt, welches Myelomzellen nicht besitzen. Bei fusionierten Zellen liefern die Milzzellen das Enzym. Aminopterin ist ein Zellgift, das die Biosynthese von Purin- und Pyrimidinbasen hemmt. Dadurch, dass die B-Zellen Hypoxanthin und Thymidin über einen alternativen Syntheseweg umsetzen können, umgehen sie die Auswirkungen vom Zellgift Aminopterin und es können im HAT-Medium nur Hybridomazellen überleben. Milzzellen haben im Kulturmedium nur eine begrenzte Lebenszeit, weshalb sie ohne Fusionierung mit einer Myelomzelle sterben.<sup>108,113</sup>

Während der Fusion entstehen spezifische sowie unspezifische Hybridome, das heißt einige der Hybridomazellen sezernieren Antikörper gegen das gewünschte Antigen und andere Zellen produzieren unspezifische Antikörper. Außerdem entstehen Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität gegen das Antigen. Zur Differenzierung der Zellen werden die Antikörper im Hybridoma-Überstand mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht.<sup>108,113</sup>

Hierbei werden die Antikörper in den Überständen auf der einen Seite daraufhin untersucht wie hoch ihre Affinität gegen ihr Antigen ist, als Fängerantikörper im immobilisierten Zustand zu binden. Auf der anderen Seite werden die Antikörper hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an ein immobilisiertes Antigen, als Detektionsantikörper, beurteilt. Zur Erhöhung der Spezifität empfiehlt es sich hier das Antigen eines anderen Ursprungs zu verwenden.<sup>114</sup>

Die positiven Zell-Klone werden kryokonserviert und mit Hilfe des Überstandes werden die IgG Subklasse und der Titer bestimmt. Zur Erstellung von stabilen monoklonalen Hybridomas werden die Klone mit der höchsten Spezifität subkloniert. Zur Aufreinigung des Antikörper-Überstandes wird eine Affinitätschromatographie über Protein A bzw. Protein G und Gelfiltration durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass der Antikörper durch die harschen Bedingungen seine Aktivität verlieren kann.<sup>115</sup> Nach der Aufreinigung ist der Antikörper für labortechnische Anwendungen einsatzbereit.

### 3.4 Lateral Flow Assay

Lateral Flow Assays (LFAs) sind Schnelltests im Bereich der Point-of-Care (POC)-Testung, die auch ungeschultem Personal innerhalb weniger Minuten das Vorhandensein eines Analyten anzeigen können. Der Test gibt nach Anwendung entweder eine ‚Ja/Nein‘-Antwort oder in manchen Fällen die genaue Konzentration des Analyten an. Einer der bekanntesten LFAs ist der Schwangerschaftstest, bei dem die Probe auf das Hormon humanes Choriongonadotropin (hCG) untersucht wird. Heutzutage gibt es eine Vielzahl an LFAs, die unter anderem in der Medizin, Lebensmittelsicherheit, Tiergesundheit oder Landwirtschaft Anwendung finden.<sup>116-119</sup> LFAs bestehen aus einem einfachen Testsystem, das aber auf eine etablierte und ausgereifte Technologie zurückgreift (Abbildung 3-9).

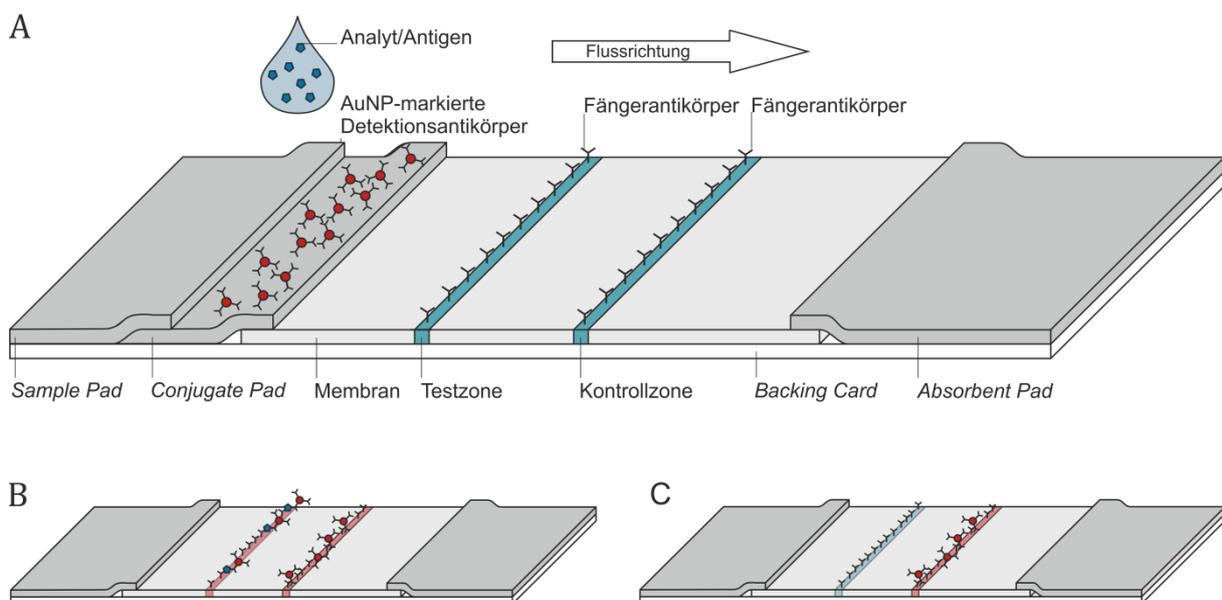


**Abbildung 3-9:** Kassette für ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay-System von der Firma Fassisi GmbH. Die Probe wird jeweils in den runden Aufgabefeldern aufgetragen. Das Ergebnis kann anschließend durch eine eventuelle Rotfärbung in den länglichen Feldern unter T (Testzone) und C (Kontrollzone) abgelesen werden.

Außerdem ist die Herstellung relativ simpel, leicht skalierbar, kostengünstig, benutzerfreundlich sowie stabil.<sup>120</sup> Meistens weist ein Test eine Haltbarkeit von 12-24 Monaten ohne Kühlung auf.<sup>121</sup>

### 3.4.1 Aufbau eines Lateral Flow Assays

Ein LFA besteht aus mindestens vier Komponenten: dem *Release Pad*, der Membran, dem *Absorbent Pad* und einer *Backing Card* (Abbildung 3-10A). Die Probe wird zunächst auf das *Release Pad* aufgegeben. Während die Probe auf Grund von Kapillarkräften den Streifen entlangwandert, trifft sie zunächst auf Detektionsantikörper, die an Marker-Partikel gebunden sind und gegen den Analyten/das Antigen gerichtet sind. Befindet sich der Analyt in der Probe, entsteht ein Komplex aus Antigen und markiertem Detektionsantikörper. Zusammen mit der restlichen Probe migriert der Komplex den Streifen entlang und trifft als nächstes auf die Testzone und anschließend auf die Kontrollzone. In der Testzone sind Fängerantikörper immobilisiert, die ebenfalls gegen das Antigen gerichtet sind und den Komplex aus Antigen und markiertem Detektionsantikörper binden. In der Kontrollzone sind Fängerantikörper immobilisiert, die gegen den Detektionsantikörper gerichtet sind. Befindet sich der Analyt in der Probe, so entsteht sowohl in der Test- als auch auf der Kontrollzone eine farbige Linie (Abbildung 3-10B). Ist der Analyt hingegen nicht in der Probe vorhanden, dann bildet sich nur in der Kontrollzone eine Linie (Abbildung 3-10C). Entsteht während der Testdurchführung nur eine farbliche Linie auf der Testlinie oder keine auf der Kontrolllinie, so ist der Test ungültig.



**Abbildung 3-10: Schematische Darstellung eines Lateral Flow Assays (LFA). A) Zusammensetzung eines LFA-Streifens, B) positives Testergebnis (zwei rote Linien), C) negatives Testergebnis (eine rote Linie in der Kontrollzone).**

Die Herstellung eines LFAs besteht aus folgenden Grundschritten: Vorbehandlung der Pads, Aufgabe der Reagenzien, Trocknung der Materialien, Zusammenkleben und Laminierung der Materialien, Schneiden der Streifen und anschließend Verpacken des fertigen Streifens in die Testkassette. Für die einzelnen Schritte werden verschiedene Materialien benötigt, auf die im Folgenden eingegangen wird.

### 3.4.2 Eigenschaften der Komponenten eines Lateral Flow Assays

Sample Pad: Die zu untersuchende Probe wird zunächst auf das *Sample Pad* gegeben. Aus diesem Grund sollte das *Sample Pad* in der Lage sein, jede Probenart (Urin, Blut, Speichel, Milch etc.) aufnehmen zu können sowie diese an das sich anschließende *Conjugate Pad* weitergeben zu können.<sup>122</sup> Das *Sample Pad* kann den pH-Wert der Probe anpassen und eventuelle Störstoffe (wie z.B. Blutzellen) zurückhalten.<sup>120</sup> Als Material dienen unter anderem Zellulose, Glasfaser oder Viskose. Damit die Probe aufgearbeitet werden kann, wird das *Sample Pad* vorbehandelt. Hierbei wird besonderes Augenmerk auf Proteine, Tenside, Blockierungsreagenzien, Pufferlösungen mit definiertem pH-Wert und andere Reagenzien zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Regulierung der Flussrate des Assays gelegt. Außerdem sollte das *Pad* in der Lage sein das komplette Probenvolumen aufzunehmen, sodass die Probenflüssigkeit nicht nur über die Oberfläche des LFAs migriert oder wieder herunterperlt und vollständig beim *Conjugate Pad* ankommt.<sup>123</sup>

Conjugate Pad: Auf dem *Conjugate Pad* befindet sich das Konjugat, das aus Markermolekülen mit konjugierten Detektionsantikörpern gegen das Antigen besteht. Dieses Konjugat muss auf dem *Conjugate Pad* im Optimalfall für bis zu zwei Jahre bei verschiedenen Temperaturen und chemischen Bedingungen stabil gehalten werden und zum Zeitpunkt des Testes zuverlässig aus dem *Konjugat Pad* in die Membran fließen. Auch dieses *Pad*, bestehend aus Glasfaser, Polyester oder Zellulose, wird für optimale Probenweitergabe mit Proteinen, Tensiden oder Polymeren vorbehandelt.<sup>120,124</sup>

Konjugate zur Signalgebung: Als Marker für die Konjugate können Gold-, Silber-, Latex-, Carbon-Nanopartikel oder Enzyme verwendet werden.<sup>125</sup> Latex hat den Vorteil, dass verschiedene Detektoren wie Farbstoffe oder Fluoreszenzsonden gekoppelt werden können, und verschiedene Farben zum Einsatz kommen können. Heutzutage wird kommerziell am häufigsten kolloidales Gold für Konjugate verwendet.<sup>126</sup> Es ist günstig und die Synthese der Goldnanopartikel (AuNP) ist simpel und gut reproduzierbar. Außerdem sorgen die AuNPs für eine intensive Farbgebung in der Test- und Kontrollzone. Goldnanopartikel sind im nassen oder trockenen Zustand bei korrekter Lagerung stabil und weisen eine hohe chemische Stabilität auf. Zusätzlich sind LFAs mit Goldnanopartikeln häufig sensitiver als z.B. mit Latex, da die Partikel kleiner sind und somit auf einer kleinen Stelle auf der Testlinie dichter gepackt werden können. Goldnanopartikel werden häufig mit einer Größe von 20-40 nm verwendet, wohingegen Latex typischerweise mit einer Größe von 100-3000 nm eingesetzt werden.<sup>121</sup> Bei der Wahl des Markers ist es wichtig, dass durch die Konjugation weder die biologische noch die chemische Aktivität des Antikörpers verloren geht oder die Bindung des Antikörpers an sein Antigen negativ beeinflusst wird.

Membran: Auf der Membran findet die eigentliche Reaktion des Schnelltests statt und das Testergebnis des Tests wird hier abgelesen. Die Antikörper der Test- und Kontrollzone werden

auf der Membran immobilisiert. Daher muss die Membran für die Stabilität der Antikörper und für die lange Haltbarkeit des Produktes sorgen. Da die Probenflüssigkeit vom *Release Pad* über die Membran zum *Absorbent Pad* fließt, muss die Membran diese Übergänge ermöglichen. Die meisten Membranen bestehen aus Nitrozellulose, die während der Herstellung in einem Lösungsmittel gelöst wird. Anschließend wird die Lösung in Gegenwart eines Nichtlösungsmittels verdampft und dabei dünn auf eine glatte Unterlage aufgetragen und getrocknet. Durch das Einstellen der verschiedenen Parameter wie Temperatur, Feuchtigkeit und Lösungsmittel wird eine bestimmte Porengröße der Membran erzielt. Das Zusammenspiel dieser Faktoren ist sehr entscheidend für die Porengröße sowie die Reproduzierbarkeit einer bestimmten Membran. Die Porengröße und Reproduzierbarkeit sind wiederum wichtige Komponenten für den LFA. Die Membran muss großporig genug sein, um die Reaktanten fließen zu lassen, aber kleinporig genug, um die Fließgeschwindigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit anzupassen.<sup>127</sup> Nitrozellulose ist hydrophob, weshalb bei der Herstellung Tenside hinzugegeben werden, sodass die Probenflüssigkeit später die Membran passieren kann. Wenn ein zu interessierendes Protein nicht mit den verwendeten Tensiden auf der Membran kompatibel ist, sollte eine andere Membran verwendet werden. Nitrozellulosemembranen werden verwendet, da sie günstig und einfach zu handhaben sind sowie hohe Proteinbindungskapazitäten ( $>100 \mu\text{g IgG pro cm}^2$ ), ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis und eine große Variabilität aufweisen.<sup>121,127</sup> Allerdings sind Nitrozellulosemembran-Chargen nicht vollständig reproduzierbar, weisen Haltbarkeitsprobleme auf und vor allem nicht beschichtete Membranen sind entflammbar. Außerdem können die Eigenschaften der Membran mit der Umgebungstemperatur wie z.B. der Luftfeuchtigkeit variieren. Am Ende des Herstellungsprozesses ist die Membran hydrophil und weist konstante Fließeigenschaften auf. Zur Charakterisierung einer Membran wird die sogenannte *wicking rate* verwendet. Diese beschreibt die Zeit, die Wasser benötigt, um 4 cm der Membran entlang zu migrieren ( $\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).<sup>124</sup> Die *wicking rate* beeinflusst die Kinetik sowie die Geschwindigkeit des Assays und wirkt sich somit auch auf die Sensitivität des Assays aus. Je kleiner die Porengröße der Nitrozellulosemembran ist, desto sensibler ist der Test. Für viskose Testlösungen sind großmaschigere Membranen geeigneter.<sup>128</sup>

Proteinimmobilisierung auf der Membran: Proteine binden auf der Membran aufgrund von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungskräften sowie Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch einige Proteine ihre Aktivität verlieren.<sup>129</sup> Um unspezifische Bindungen auf der Membran zu verhindern, werden Blockierungsreagenzien, wie z.B. Proteine, Tenside oder Polymere zur Probenflüssigkeit hinzugegeben, die die Membran an der Lauffront passieren und somit blockieren.<sup>127</sup> Alternativ kann die Membran auch vorweg mit einer Blockierungslösung behandelt werden. Beim Blockieren der Membran muss darauf geachtet werden, dass diese nicht verdichtet wird, sodass die Probe mit dem Analyten sowohl die Test- als auch die

Kontrollzone erreichen kann. In der Testzone werden hochspezifische Fängerantikörper mit großer Affinität gegen das Antigen immobilisiert. Aufgrund der geringen Bindungszeit von Fängerantikörper und Antigen in der Testzone erhöht eine ausgeprägte Affinität die Wahrscheinlichkeit, dass der immobilisierte Fängerantikörper das Antigen samt Marker in der Testzone bindet. Die Detektionsantikörper am Marker haben hingegen wesentlich mehr Zeit mit dem Antigen zu interagieren. Dies bedeutet, dass es im Gegensatz zum ELISA bei der Ausbildung des Immunkomplexes nicht zu einem Gleichgewichtsprozess kommt. Daher wird bei den meisten kommerziellen LFAs 1-3 µg Fängerantikörper pro cm mit einer 1 mm dicken Linie verwendet, dies entspricht einer Antikörperkonzentration von 10-30 µg\*cm<sup>-2</sup>, was wiederum einer 25-100 fach höheren Konzentration von der in ELISAs entspricht.<sup>121</sup> Bei der Entwicklung eines LFAs ist ebenfalls wichtig, dass der verwendete Antikörper auf lange Sicht zu gleicher Qualität erhältlich ist. Wird der Antikörper oder seine Qualität geändert, kann es zu erheblichen Sensitivitätsänderungen kommen und der LFA muss neu validiert werden. Dies kann unter anderem umgangen werden, indem ein individualisierter Antikörper gefertigt wird. Zusätzlich kann die Bindung zwischen Antikörper und Antigen unterstützt werden, indem die Laufzeit des Assay angepasst wird. Wird die Laufzeit des LFAs durch z.B. die Wahl einer engporigeren Membran verlängert, so erhalten Antikörper und Antigen mehr Zeit zum Interagieren.<sup>130</sup>

LFA-Formate: Bei LFAs wird zwischen zwei verschiedenen Formaten der Signalerstellung unterschieden: kompetitiv und nicht-kompetitiv. Das kompetitive Format wird verwendet, wenn ein kleiner Analyt (z.B. Steroid) nachgewiesen werden soll. Hierbei wird anstelle eines Fängerantikörpers der Analyt direkt auf die Membran im Bereich der Testzone aufgebracht. Ist der Analyt nicht in der Probe vorhanden, so bindet der Detektionsantikörper samt Marker an den Analyten in der Testzone und eine farbige Linie entsteht. Ist der Analyt jedoch in der Probe vorhanden, bildet sich ein Komplex aus Detektionsantikörper und Analyt im Laufpuffer. Je nach Konzentration des Analyten in der Probe bindet anschließend das restliche Konjugat an den Analyten in der Testzone und eine schwächere Testlinie entsteht. Die Farbintensität der Testzone ist dann proportional zur Analytenkonzentration in der Probe.<sup>131,132</sup> Bei dem nicht-kompetitiven Format – überwiegend verwendeter Standard für LFAs – ist der Analyt groß genug, damit zwei Antikörper gleichzeitig binden können. Das dazugehörige Funktionsprinzip wurde bereits am Anfang des Kapitels beschrieben (Abbildung 3-10).

Absorbent Pad: Nachdem die Probe die Membran passiert hat, wird sie von dem *Absorbent Pad* aufgenommen. Dabei ist wichtig, dass das *Absorbent Pad* das vollständige Volumen der Probe aufsaugen kann, ein Rückfluss verhindert wird und dadurch die Kapillarkräfte aufrechterhalten werden. Sobald das *Absorbent Pad* vollgesogen ist, stoppt die Probenflüssigkeits-Bewegung über die Membran. *Absorbent Pads* werden häufig aus Zellulosefiltern hergestellt.<sup>124,133</sup>

Backing Card: Damit die einzelnen Bestandteile des LFAs immer an der gleichen Position sind, sie sich nicht im Laufe der Zeit verschieben und der LFA auch eine gewisse Festigkeit aufweist, werden *Sample Pad*, *Conjugate Pad*, Membran sowie *Absorbent Pad* über eine *Backing Card* vereint.<sup>121</sup> Dazu werden die einzelnen *Pads* und die Membran überlappend auf die *Backing Card* geklebt. Bei der Überlappung der *Pads* mit der Membran muss der Flüssigkeitsstrom gewährleistet werden. Die *Backing Card* besteht aus Polyesterol, Polyvinylchlorid oder einen anderen Kunststoff, der mit einem Klebstoff beschichtet ist. Der verwendete Kleber sollte mit den verwendeten Komponenten des späteren LFAs kompatibel sein und keine Auswirkung auf diesen haben.<sup>121,127</sup> Die *Backing Card* ist in drei Teile aufgeteilt, sodass die Schutzfolien mit den Bereichen für Membran, *Absorbent Pad* und *Conjugate Pad* einzeln abgezogen und verarbeitet werden können.<sup>134</sup> *Backing Cards* mit einer höheren Festigkeit werden bei unverpackten Tests verwendet, wohingegen *Cards* mit einer dünneren Schichtdicke noch in ein Kunststoffgehäuse eingebaut werden (Abbildung 3-9).

Fertigstellung eines LFAs für den Verkauf: Vor dem Verkauf kann der Teststreifen noch laminiert werden,<sup>121,134</sup> damit die Membran vor Feuchtigkeit geschützt ist, nicht beschädigt wird, der Anwender nicht mit der zu untersuchenden Probe in Berührung kommen kann oder die zu untersuchende Probe evaporiert. Zusätzlich sind auf dem LFA Pfeile aufgedruckt, die die Testrichtung angeben und dem Benutzer anzeigen, bis wohin der Test in die Flüssigkeit gehalten werden muss. Der Markenname und eine Identifikation des Tests werden ebenfalls angegeben. Wird der Test anschließend in ein Gehäuse eingebaut,<sup>122</sup> werden diese Informationen meistens verdeckt und es gibt nur eine Öffnung für die Probenaufgabe und eine für das Ablesen des Ergebnisses. Die Positionen der Test- und Kontrollzonen sind ebenfalls markiert. Innerhalb des Gehäuses befindet sich auch häufig eine Tablette mit Trocknungsmitteln, da für eine lange Lagerungszeit eine trockene und kühle Umgebung einzuhalten sind.<sup>135</sup> Zusätzlich wird der fertige LFA verpackt, sodass er vor Licht geschützt ist.<sup>120</sup>

## 4 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit soll ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay (LFA)-System entwickelt werden, das eine Abstoßungsreaktion nach vorangegangener Nierentransplantation detektiert. Nierentransplantationen werden weltweit am häufigsten von allen Transplantationen durchgeführt. Aufgrund einer möglichen akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion nach der Nierentransplantation müssen sich Patienten regelmäßigen Untersuchungen unterziehen.<sup>17,18</sup> Zur Diagnose-Stellung einer Nierenabstoßung wird die Nierenbiopsie infolge des Anstiegs des Serum-Kreatinin-Werts verwendet. Aufgrund der aufwendigen, langwierigen und teils unpräzisen Diagnose sowie dadurch entstehenden Risiken für den Patienten durch diese beiden Methoden werden zunehmend Alternativen zur Früherkennung der Nierentransplantat-abstoßung erforscht.<sup>14,19,20,136,137</sup> Dabei eignet sich der Nachweis spezifischer Proteine, die bei einer Abstoßung vom Körper hergestellt und ausgeschüttet werden. Die Analyse dieser Biomarker mithilfe von LFAs könnte eine schnelle, hoch sensitive und schmerz- sowie nebenwirkungsfreie Möglichkeit bieten, eine Nierenabstoßung frühzeitig festzustellen, welche der Patient zuhause selbst anwenden kann.

Um eine möglichst präzise Beurteilung über eine potentielle Abstoßungsreaktion des Patienten zu erhalten, wurden in dieser Arbeit drei Biomarker für den LFA verwendet: das C-reaktive Protein (CRP, Kapitel 3.2.1), der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R, auch sCD25, Kapitel 3.2.2) sowie das *Monokine induced by Gamma-Interferon* (MIG, auch CXCL9, Kapitel 3.2.3). Zur Detektion dieser Proteine wurde jeweils ein LFA entwickelt, dazu wurden aufeinander aufbauende Methoden verwendet. Zuerst wurden die relevanten Biomarker-Konzentrationen bestimmt, dann wurden Bindungsstudien zwischen den jeweiligen Antikörpern und dem Antigen in Microarray-Versuchen durchgeführt. Darauf aufbauend wurde im letzten Schritt der entsprechende LFA schrittweise entwickelt. Mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) und UV-Vis-Spektroskopie wurde zunächst die Größe der signalgebenden Goldnanopartikel bestimmt. Als nächstes wurde die Konjugation von Goldnanopartikeln und Antikörpern optimiert und anschließend wurden die Bedingungen und Eigenschaften der Test- sowie Kontrollzone, des *Release Pads* und der Membran optimiert, um eine Detektion der Proteine zu ermöglichen.

Die Arbeit wurden durch den ‚Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung‘ (EFRE) mit dem Projekttitel ‚Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik‘ und der Antragsnummer 85006385 gefördert. Das Projekt wurde mit den Kooperationspartner Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, D) und Fassisi Deutschland GmbH (Göttingen, D) sowie im Verbund mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Stephan Immenschuh vom Institut für Transfusionsmedizin (ITM, MHH, Hannover, D) und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr.-Ing. Oliver Bott von der Abteilung Informatik und Kommunikation (IK, HsH, Hannover, D)

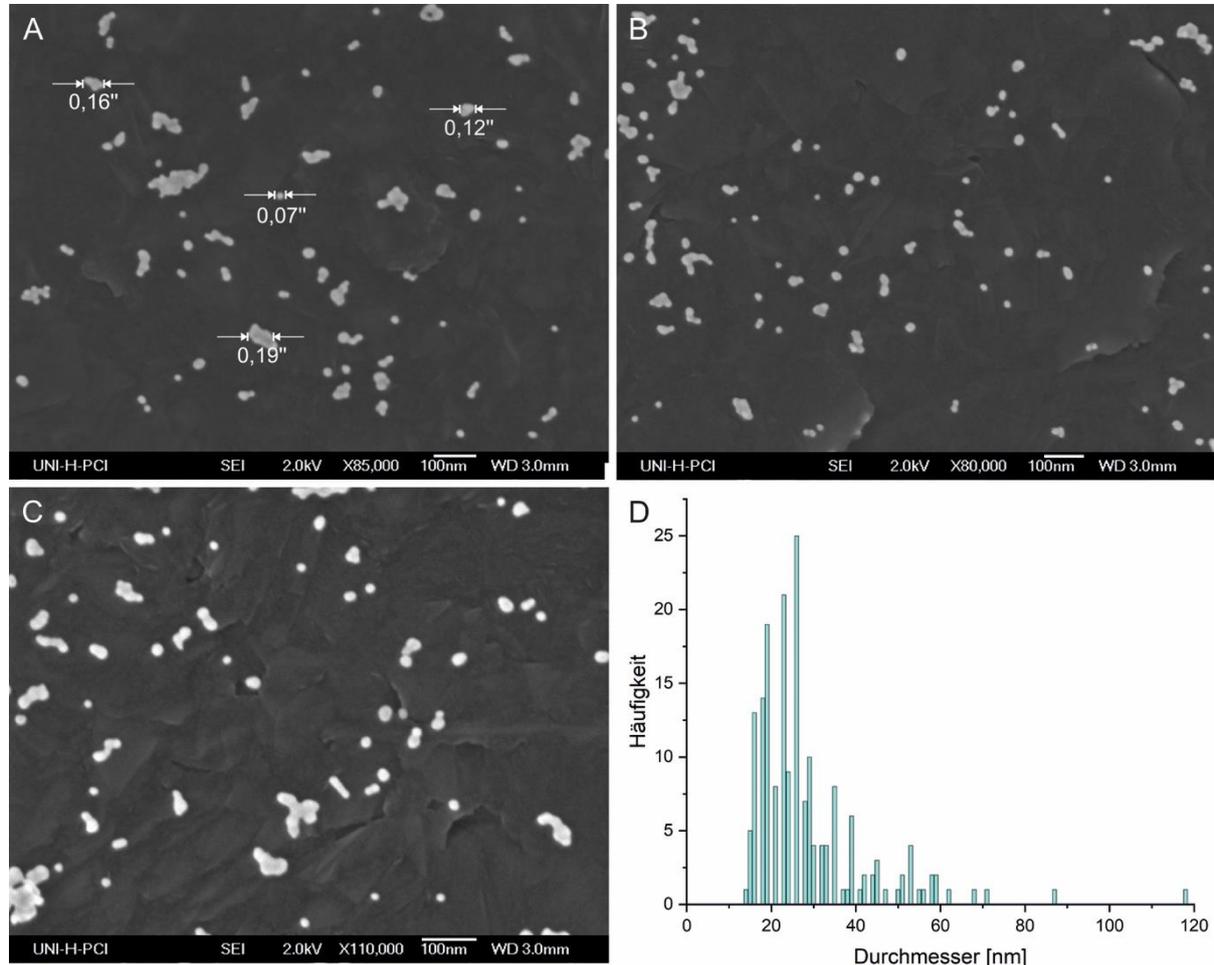
durchgeführt. Sartorius Stedim Biotech hat für Arbeit die verwendeten Membranen sowie *Release Pad*, *Absorbent Pad* und *Backing Card* zur Verfügung gestellt. Fassisi Deutschland GmbH unterstützte die Arbeit durch die Bereitstellung von Goldnanopartikeln sowie den fachlichen Austausch bei Entwicklungsarbeiten. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen CXCL9 wurde eine externe Firma (Helmholtz-Zentrum München, D) beauftragt. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Christian Erck (Helmholtz-Zentrum Braunschweig, D) und Herrn M. Sc. Christoph Nikolin (ITM) wurden die Antikörper validiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben wurden von Frau Prof. Dr. med. Blume an ihrer ehemaligen Klinik (Klinik für Nephrologie, MHH, Hannover, D, Kohorte 1) in den Jahren 2012 und 2013 gesammelt, später von einer weiteren Mitarbeiterin dieser Klinik (Dr. Jessica Kaufeld, MHH, Hannover, D, Kohorte 2, 2018-19) sowie von einem weiteren Oberarzt dieser Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Wilfried Gwinner (MHH, Hannover, D, Kohorte 3, im Rahmen des Transplantatnierenbiopsieprogramms gesammelt) und zur Verfügung gestellt.

#### **4.1 Bestimmung der Goldnanopartikelgröße**

Die in dieser Arbeit verwendeten Goldnanopartikel (AuNP) wurden freundlicherweise vom Kooperationspartner (Fassisi GmbH, Göttingen, DE) zur Verfügung gestellt und mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) und UV-Vis-Spektroskopie charakterisiert. Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden zur Veröffentlichung bei Analyst (Royal Society of Chemistry) mit dem Titel ‚A New Lateral Flow Assay to detect sIL-2R during T-Cell Mediated Rejection After Kidney Transplantation‘ eingereicht.<sup>138</sup>

#### 4.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Größenbestimmung der AuNPs wurde das REM A450e verwendet. Hierbei konnten vorrangig einzelne Moleküle sowie vereinzelt kleine Aggregate nachgewiesen werden (Abbildung 4-1A-C).



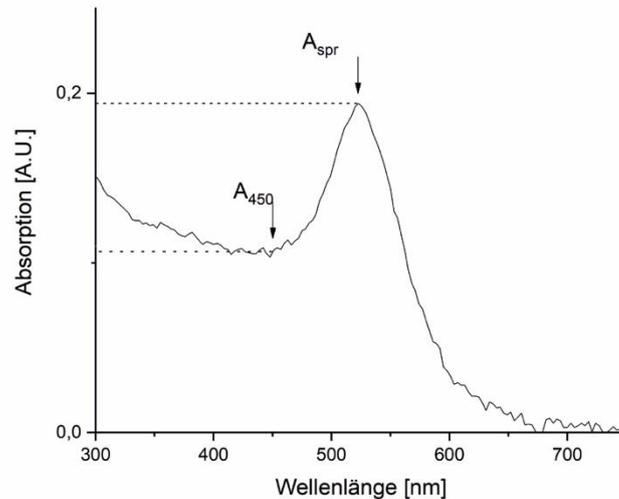
**Abbildung 4-1: Rasterelektronenmikroskop (REM) - Aufnahmen der verwendeten Goldnanopartikel (AuNP) und ihre Größenverteilung. A), B) und C) zeigen drei exemplarische REM-Aufnahmen der AuNPs. In A) wurden zusätzlich exemplarisch vier Größenmarker dargestellt. D) Verteilung der Durchmesser von 186 AuNPs [nm] dieser REM-Aufnahmen (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).**

Zur Größenbestimmung wurde der Durchmesser der abgebildeten AuNPs gemittelt, sodass ihr durchschnittlicher Durchmesser mit  $28,62 \pm 13,29$  nm bestimmt werden konnte (Abbildung 4-1D). Anschließend wurde eine Verteilung der gemessenen Durchmesser aufgetragen, wobei zu sehen ist, dass mehr als 50% der vermessenen Partikel einen Durchmesser zwischen 21 und 35 nm aufweisen (Abbildung 4-1 D).

#### 4.1.2 UV-Vis Spektroskopie und Nanoparticle Tracking Analysis

Zur Verifizierung der Größenbestimmung wurde die Größe der AuNPs zusätzlich nach der Methode von Haiss et al. bestimmt.<sup>139</sup> AuNPs weisen ein Absorptionsmaximum ( $A_{spr}$ ) von 520 nm

auf, sowie ein lokales Minimum bei 450 nm (Abbildung 4-2). Mit zunehmender Größe der AuNPs würde sich das  $A_{\text{spr}}$  zu höheren Wellenlängen verschieben.



**Abbildung 4-2: UV-Vis-Spektrum der verwendeten Goldnanopartikel (AuNP). Die Größe der AuNPs wurde anhand des Verhältnisses von Absorptionsmaximum ( $A_{\text{spr}}$ ) der AuNPs zur Absorption bei 450 nm ( $A_{450}$ ) berechnet (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).**

Anhand des Verhältnisses des Absorptionsmaximums  $A_{\text{spr}}$  und der Absorption bei 450 nm ergibt sich für die AuNPs eine rechnerische Größe von 25 nm. Diese weicht nur leicht von der mittels REM ermittelten Größe von  $28,62 \pm 13,29$  nm ab. Zusätzlich wurde mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* eine Gesamtkonzentration von  $5,09 \cdot 10^8$  Partikel gemessen.

## 4.2 CRP

Der erste zu entwickelnde LFA sollte den Biomarker CRP detektieren. CRP ist im Gegensatz zu den beiden Biomarkern sCD25 und CXCL9, auf die in den Kapiteln 4.3 und 4.4 weiter eingegangen wird, kein spezieller Biomarker für die Nierenabstoßung, sondern wird bei einer Entzündung im Körper gebildet und dient somit als unspezifischer Entzündungsparameter. Dieser Biomarker soll in dem späteren Multi-Parameter-LFA zur Abgrenzung zwischen systemischer Entzündung und tatsächlicher Abstoßung verwendet werden.

### 4.2.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration

Viele Proteine sind im Körper dauerhaft vorhanden, aber erst ab einer kritischen Konzentration lösen sie eine Signalkaskade im Körper aus und sind zur Indikation einer Erkrankung oder, wie in dieser Arbeit, Abstoßung verwendbar. Aus diesem Grund wurde zunächst die relevante Biomarker-Konzentration bestimmt, die später für die Entwicklung und Optimierung des LFAs als Richtwert verwendet wird. Der Entzündungsmarker CRP kommt in einer Konzentration von bis zu  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (ca. 90 nM) auch bei einem nicht erkrankten Menschen im Serum vor.<sup>70</sup> Liegt bei einem Patienten allerdings eine Entzündung vor, kann das CRP-Level auf ein Vielfaches ansteigen.<sup>70-72</sup> Aus diesem Grund soll ein LFAs entwickelt werden, der innerhalb weniger Minuten

den Nachweis eines pathologisch erhöhten CRP-Levels mit einer "Ja" ( $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP) oder "Nein"-Antwort ( $< 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP) anzeigt.

#### 4.2.2 Bindungsstudien mittels Microarray

In dieser Arbeit wurden Microarray-Versuche zur Bestimmung und Simulation des Bindungsverhaltens verschiedener Antikörper untereinander sowie im Zusammenspiel mit ihrem Antigen durchgeführt. Dabei sollte die Fängerantikörper (FA)- und Detektionsantikörper (DA)- Kombination ermittelt werden, die das Antigen (hier CRP, in Kapitel 4.3 sCD25 und in Kapitel 4.4 CXCL9) in geringen Konzentrationen sensitiv sowie spezifisch bindet. Der FA wird bei einem Microarray auf die Nitrozellulose aufgebracht und soll das zu untersuchende Molekül binden. Der DA wird an ein fluoreszierendes Markermolekül gebunden und sorgt durch die Bindung an das Antigen für dessen Visualisierung (Abbildung 4-3). Bei Vorhandensein des entsprechenden Antigens entsteht somit ein Sandwich, welches auch auf dem zu entwickelnden LFA aufgebaut werden soll.



**Abbildung 4-3: Schematische Darstellung eines Microarray-Aufbaus mit Fängerantikörper, Antigen (CRP, sCD25 oder CXCL9) und einem fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper.**

Als Oberfläche der Microarrays wurde Nitrozellulose gewählt, da der Bindungsbereich auf LFAs ebenfalls aus Nitrozellulose besteht. Zum Aufbringen der FAs wurde der Nano-Plotter 2.1 von GeSim verwendet und Objektträger mit jeweils 16 Nitrozellulosefeldern wurden eingesetzt (Abbildung 4-4A). Jedes dieser 16 Nitrozellulosefelder erzeugte einen eigenen Reaktionsraum, da die einzelnen Felder während der Bindungsreaktionen voneinander abgetrennt wurden. Dies ermöglichte die zeitgleiche Untersuchung diverser Parameter bei geringem Materialverbrauch.

In den folgenden Versuchen wurden verschiedene FAs spezifisch gegen CRP mit jeweils acht Replikaten pro Feld mittels Nano-Plotter auf der Nitrozellulosemembran eines Microarray-Slides aufgetragen (Abbildung 4-4B), wobei immer 6 Tropfen pro Replikat aufgegeben wurden. Die FAs wurden jeweils in einer Konzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit wurden die Felder spezifisch weiterbehandelt. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden mittels Blockierungsreagenz (z.B. BSA) abgesättigt und nicht gebundene Moleküle durch Waschen wieder entfernt.

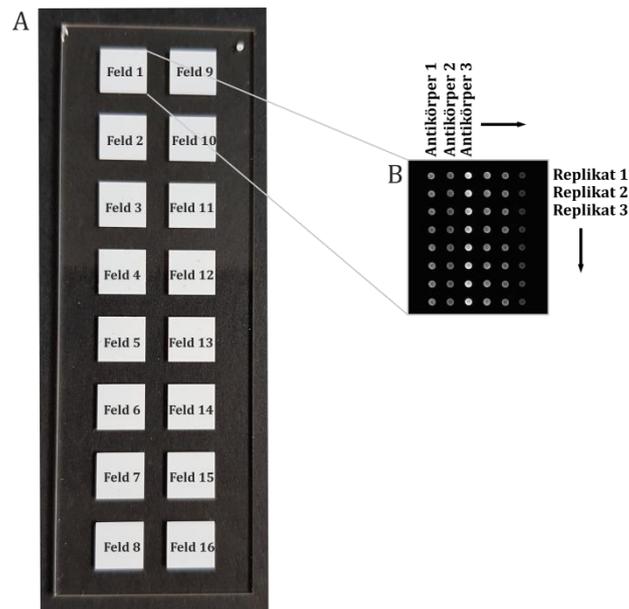


Abbildung 4-4: Auftragungsschema der Antikörper auf einen Microarray-Slide. A) Microarray-Slide mit 16 Nitrozellulosefeldern. B) Auftragungsschema der Proteine in dieser Arbeit: Von links nach rechts wurden bis zu sechs verschiedene Antikörper aufgetragen und von oben nach unten acht Replikate dieser Antikörper.

In dieser Arbeit werden für die Microarrays zwei verschiedene Formate angewendet: das Forward-Format (A) sowie das Sandwich-Format (B) (Abbildung 4-5).

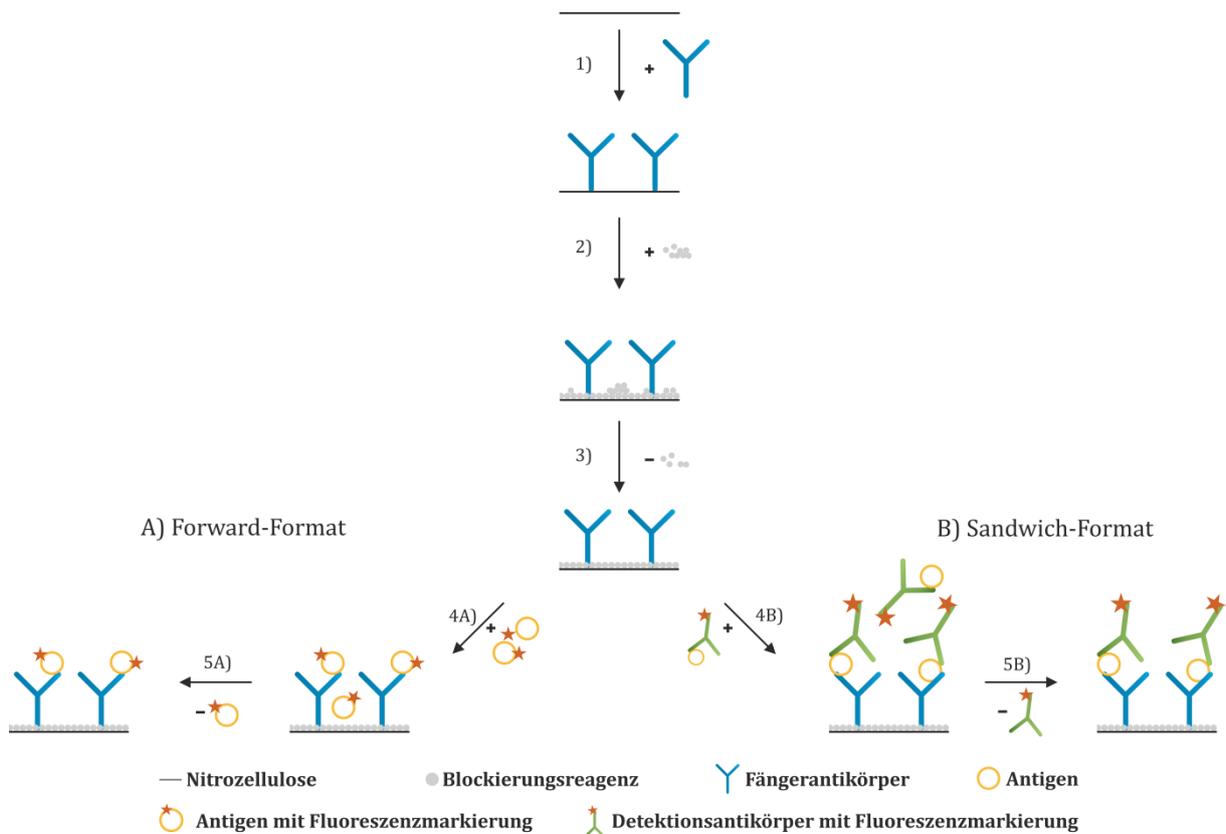


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung vom Ablauf eines Microarray-Versuchs im A) Forward-Format und B) Sandwich-Format. 1) Auftragung der Antikörper, 2) Zugabe des Blockierungsreagenzes, 3) Entfernen von ungebundenem Reagenz, 4A) Zugabe fluoreszenzmarkierter Antigene, 4B) Zugabe von Antigenen gebunden an fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper, 5A) und 5B) Entfernen von ungebundenem Reagenz.

Für das Forward-Format wurde CRP vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cyanin5 (Cy5)) markiert und nach dem Blockieren der Membran zu den FAs auf die Nitrozellulose gegeben (Schritt 4A). Bei dem Sandwich-Format werden das zu untersuchende Antigen und ein Cy5-markierter DA in einem separaten Reaktionsgefäß vorinkubiert und anschließend gemeinsam zu den FAs auf die Nitrozellulosemembran gegeben (Schritt 4B). Dieses ist ein Modell für die Inkubation auf dem LFA, bei dem das Antigen auf dem *Release Pad* auf den markierten DA trifft und dann gebunden an diesen als DA-Antigen-Komplex die Membran entlang zum FA in der Testzone wandert (Kapitel 3.4). Im Folgenden werden Proteine und Antikörper, die fluoreszenzmarkiert sind, mit einem Stern (\*) versehen. Überschüssiges Protein, das von den FAs nicht gebunden wurde, wurde sowohl beim Forward- also auch beim Sandwich-Format entfernt (Schritt 5A & 5B). Schließlich wurde der Microarray-Slide getrocknet und die gebundenen fluoreszenzmarkierten Molekül-Bindungen im Microarray-Laser-Scanner visualisiert. Je mehr markierte Moleküle (Antigene oder DAs) gebunden wurden, desto höher war das Fluoreszenzsignal. Anhand der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals konnte somit die Affinität der (immobilisierten) Antikörper gegenüber dem Antigen bestimmt werden. Anhand der Microarray-Versuche kann abgeschätzt werden, wie sich Antikörper und Zielproteine bezüglich verschiedener Konzentrationen, Reaktanten, Puffer sowie Inkubationszeiten auf einem späteren LFA verhalten.

### 4.2.2.1 Forward Microarray

Zunächst wurde die Affinität der Antikörper zu ihrem Antigen untersucht. Es galt herauszufinden, bis zu welcher Antigen-Konzentration eine Bindung mit einem auswertbaren Fluoreszenzsignal erreicht werden konnte. Zusätzlich wurden die dazugehörigen Inkubationszeiten eruiert. Dazu wurde das Forward-Format verwendet, bei dem zunächst der Fängerantikörper auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen wurde. Nachdem freie Bindungsstellen blockiert sowie überschüssiges Material entfernt wurde, wurde anschließend das markierte Antigen hinzugegeben (Abbildung 4-6 und Kapitel 4.2.2 Abbildung 4-5).



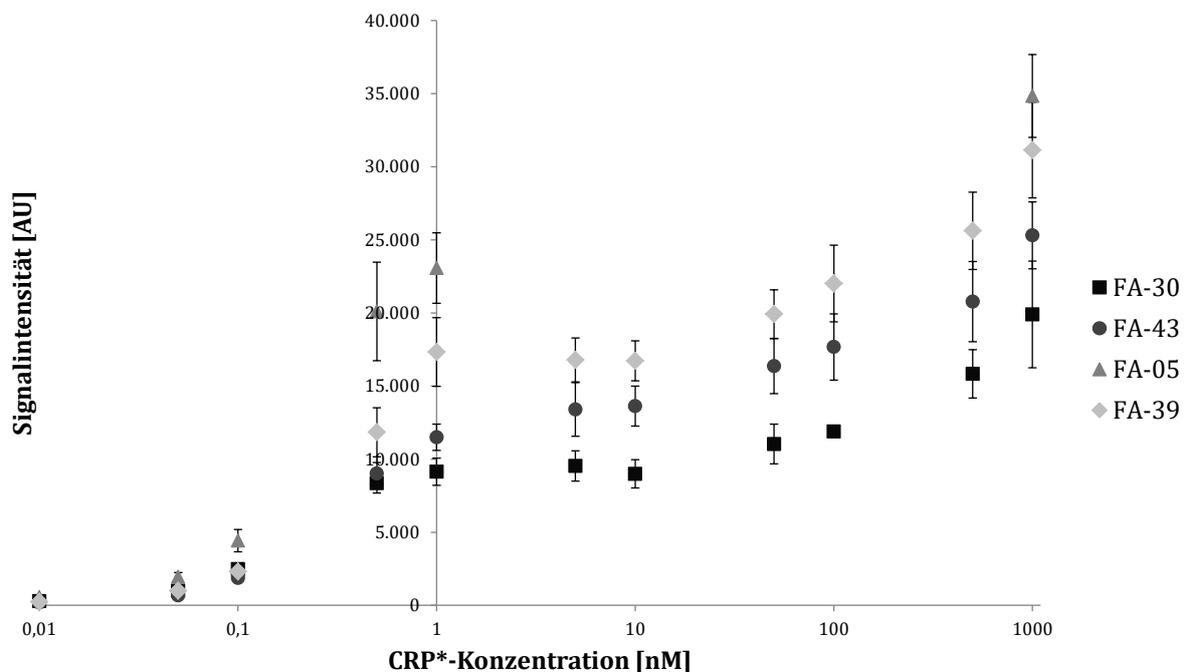
**Abbildung 4-6: Schematische Darstellung eines Microarrays im Forward-Format.**

Als membrangebundene FAs und teilweise auch als DAs dienten die vier verschiedenen monoklonalen Antikörper M01330M (genannt 30, FA-30, DA-30\*), M01243M (genannt 43, FA-43, DA-43\*), M01239M (genannt 39, FA-39, DA-39\*) und M86005M (genannt 05, FA-05, DA-05\*) (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Verwendete CRP-spezifische, monoklonale Antikörper mit ihrer Artikelnummer sowie den in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen.**

| Artikelnummer | Name in der Arbeit | Spezifität          |
|---------------|--------------------|---------------------|
| M01330M       | 30                 | Anti-CRP-Antikörper |
| M01243M       | 43                 | Anti-CRP-Antikörper |
| M01239M       | 39                 | Anti-CRP-Antikörper |
| M86005M       | 05                 | Anti-CRP-Antikörper |

Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen: Die CRP\*-Konzentration (Bereich 0,01 – 1000 nM) wurde bei gleichbleibender Konzentration des FAs ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) variiert und über Nacht auf dem Slide inkubiert. In Abbildung 4-7 sind die gemittelten Signalintensitäten der acht Replikate bei steigender CRP\*-Konzentration zu sehen, diese Auswertung wurde bei allen folgenden Microarray-Versuchen durchgeführt.



**Abbildung 4-7: Einfluss verschiedener CRP\*-Konzentrationen (0,01 - 1000 nM) bei gleichbleibender Konzentration ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der vier monoklonalen Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39) im Forward-Format. N=8.**

Anhand der Fluoreszenzintensitäten ist zu erkennen, dass die immobilisierten Antikörper alle ein sehr ähnliches Bindungsverhalten gegenüber dem markierten Antigen CRP zeigen. Bei allen FAs steigen die Signalintensitäten mit steigender CRP\*-Konzentration an. Ab einer Konzentration von 1 nM weisen die Signale verschiedene Intensitäten auf, wobei bei FA-05 ( $\blacktriangle$ ) und FA-39 ( $\blacklozenge$ ) die stärksten Signalintensitäten verzeichnet werden können. FA-30 ( $\blacksquare$ ) bindet über den gesamten Konzentrationsgradienten am wenigsten CRP\*. Dies kann zum einen daran liegen, dass die

Affinität des FA-30 geringer ist als die der anderen FAs. Zum anderen ist es möglich, dass die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffs Cy5 an CRP zu einer Konformationsänderung des Proteins geführt hat oder das Epitop des Antikörpers verdeckt wird.<sup>140,141</sup> FA-05 ist der am stärksten CRP\*-bindende Antikörper und zeigt im Vergleich zum am schwächsten CRP\*-bindenden Antikörper, FA-30, bei einer CRP\*-Konzentration von 1 nM eine 2,5-fach so starke Signalintensität. Bei einer CRP\*-Konzentration von 1000 nM liegt das Signal von FA-05 bei ca. 35000 AU und von FA-30 bei 20000 AU. Obwohl ein Unterschied in der Stärke der Bindung von CRP\* zu den verschiedenen Antikörpern vorlag, besaßen alle vier verwendeten Antikörper eine eindeutige Affinität gegenüber CRP\* und banden dieses auch in größerer Menge, bis 1000 nM CRP\* tritt noch keine Sättigung ein. 10 nM CRP\* war eine niedrige CRP\*-Konzentration, die in gut sichtbaren Signalintensitäten resultierte und somit anschließend verwendet wurde, um den Einfluss der Inkubationszeit zu untersuchen.

Einfluss verschiedener Inkubationszeiten: Der Einfluss der Inkubationszeit ist für den späteren LFA ein wichtiger Faktor. Bei einem LFA migriert das Antigen aufgrund von Kapillarkräften über den Teststreifen, wobei es die Fängerantikörper passiert. Dort verweilt es jedoch nicht für längere Zeit, wie bei einem Microarray oder ELISA, sondern wird im Fluss weitergetragen, sofern es nicht an den FA gebunden wurde. Dementsprechend müssen bei einem LFA für eine präzise Detektion FAs mit einer hohen Affinität und schnellen Bindungsfähigkeit zum Antigen verwendet werden. Um den Einfluss der Inkubationszeit, die das Antigen und der Fängerantikörper zur Bindung benötigen, zu untersuchen, wurden die verschiedenen Antikörper ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) für fünf bis 90 Minuten mit CRP\* (10 nM) inkubiert. In Abbildung 4-8 ist zu erkennen, dass je länger CRP\* und FA inkubieren, desto mehr CRP\*-Moleküle an den FA binden und die Signalintensität steigt. Die dadurch entstehenden Signalintensitäten verlaufen bei allen vier FAs sehr ähnlich.

Bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten steigen bei FA-30 (■), FA-43 (●), die FA-05 (▲) und FA-39 (◆) die Signalintensitäten langsam an bis sie einen Wert von ca. 3500 AU erreicht haben. Danach ist zu erkennen, dass die Antikörper unterschiedlich viel CRP\* binden und somit verschieden starke Signalintensitäten aufweisen. Nach 90-minütiger Inkubationszeit zeigen FA-30 und FA-39 eine Signalintensität um 6250 AU, wohingegen FA-43 nur bei ca. 4700 AU und FA-05 sogar bei ca. 8500 AU liegen. Generell zeigt FA-05 erneut die stärksten Signalintensitäten über den gesamten Inkubationszeitraum. In den Verläufen ist auffällig, dass sie zum Teil kleinen Schwankungen unterliegen. Diese Schwankungen könnten z.B. materialbedingt sein. Im Laufe der Experimente wurden Schwankungen von Nitrozellulosefeld zu Nitrozellulosefeld festgestellt, die zu unterschiedlichen Signalintensitäten geführt haben und nur zu einem Teil korrigiert werden konnten.

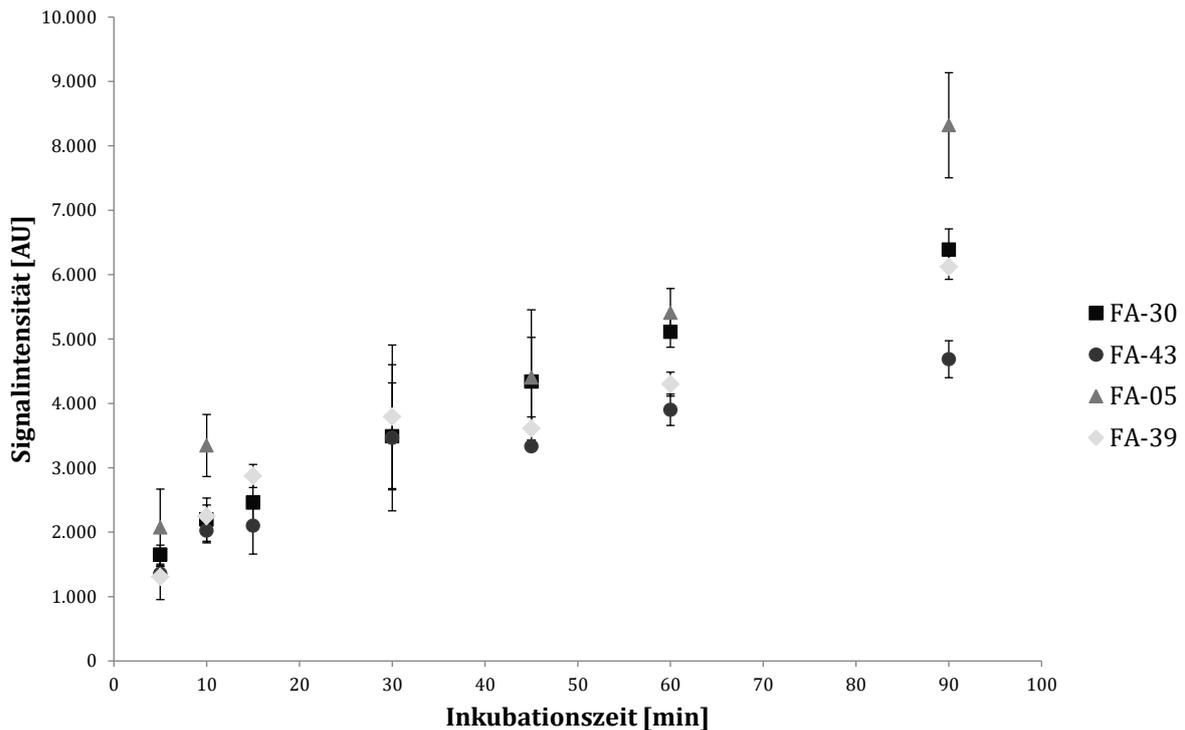


Abbildung 4-8: Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (5 - 90 Minuten) der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39; 1 mg·L<sup>-1</sup>) gegenüber CRP\* (10 nM) im Forward-Format. N=8.

Der Versuch hat insgesamt gezeigt, dass eine längere Inkubationszeit zur vermehrten Bindung von CRP\* an die FAs führt. Bereits nach fünf Minuten bindet ausreichend CRP\*, sodass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, das Signal nimmt aber mit längerer Inkubationszeit um ein Vielfaches zu. Alle vier FAs binden innerhalb der ersten Minuten mit der gleichen Intensität CRP\*, sodass sie alle als Fängerantikörper in einem LFA funktionieren könnten.

#### 4.2.2.2 Sandwich-Microarray

Im späteren LFA sollen die Antikörper im Sandwich-Format das entsprechende Antigen detektieren. Dies bedeutet, dass das Antigen sowohl von dem membrangebundenen FA als auch dem fluoreszenzmarkierten DA gebunden wird (Abbildung 4-9).

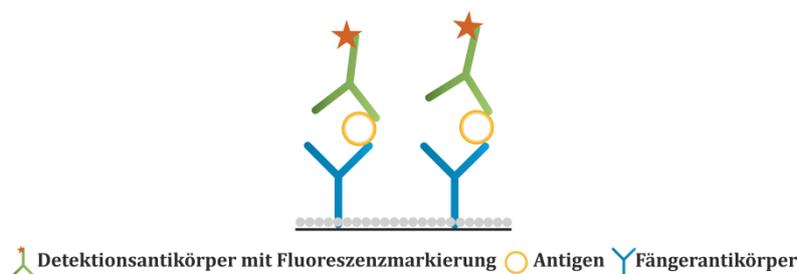
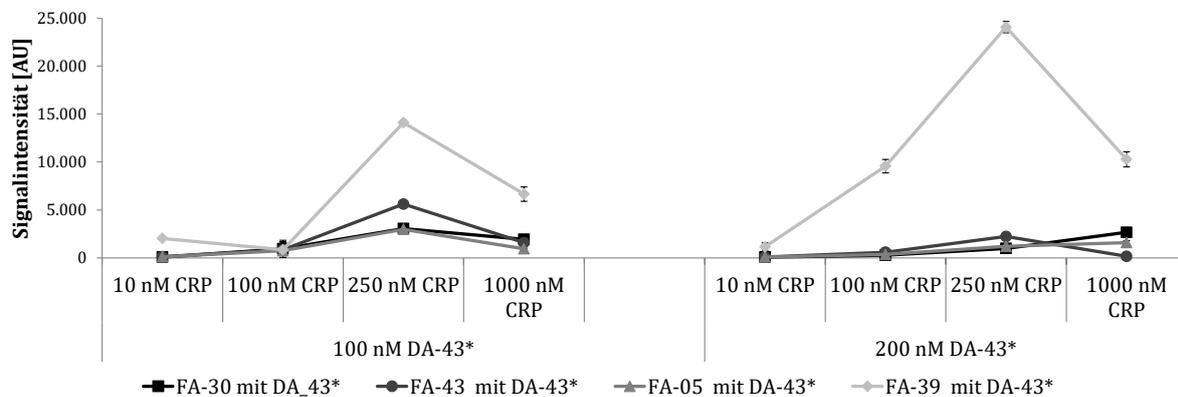


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung des Sandwich-Formats, das sowohl im Microarray als auch im LFA in der Testzone verwendet wird.

Der Sandwich-Microarray dient dementsprechend als Modellsystem zur Entwicklung des LFAs. Hier wurde zunächst der markierte DA mit dem Antigen in verschiedenen Konzentrationen

separat inkubiert (Modell für Inkubation auf LFA) und anschließend zusammen auf die Membran zu den bereits immobilisierten FAs gegeben (siehe Abbildung 4-5).

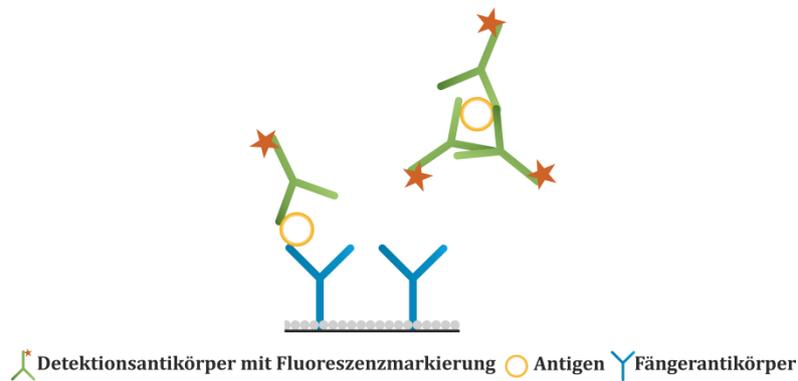
Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen: Um herauszufinden, welcher Antikörper in Kombination mit welchem FA als guter DA fungiert, wurden DA-43 und DA-39 fluoreszenzmarkiert. Für diesen Versuchsteil wurden, wie in den vorangegangenen Versuchen, alle Antikörper ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Membran immobilisiert. CRP wurde in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 nM eingesetzt und vorweg mit den DA-43\* und DA-39\* (100 bzw. 200 nM) für 15 Minuten inkubiert. In Abbildung 4-10 ist auf der linken Seite die Änderung der Signalintensität bei 100 nM DA-43\* und variierender CRP-Konzentration zu sehen. Auf der rechten Seite beträgt die Konzentration von DA-43\* 200 nM. Dabei ist zu beobachten, dass die Signalintensitäten, egal welche CRP- oder DA-Konzentration dazugegeben wurde, ähnlich sind. Nur wenn FA-39 (◆) verwendet wird, entstehen deutlich höhere Signalintensitäten.



**Abbildung 4-10: Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 250 nM, 1000 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39;  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers 43\* (100 nM, links bzw. 200 nM, rechts) im Sandwich-Format. N=8.**

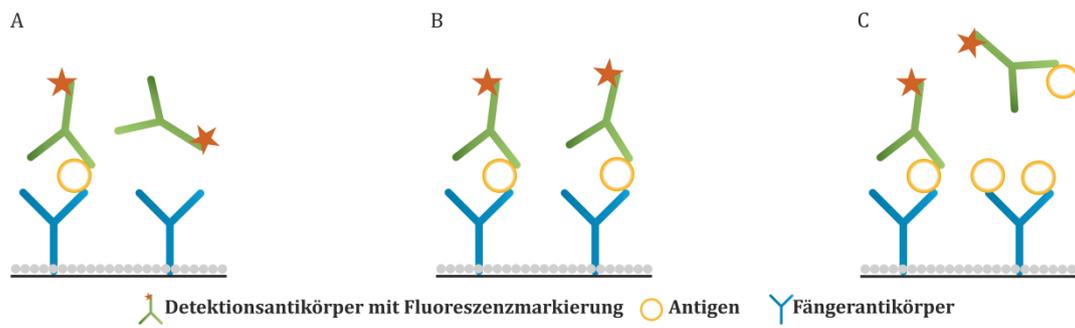
Näher betrachtet bedeutet das, dass FA-30 (■), FA-43 (●) und FA-05 (▲) eine Signalintensität von durchschnittlich ca. 800 AU bei 100 nM DA-43\* mit einem Höhepunkt bei 250 nM CRP zwischen ca. 3000 und 5600 AU aufweisen und eine Signalintensität von durchschnittlich ca. 860 AU bei 200 nM DA-43\* aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Bindung an den jeweiligen FA nicht oder nur im geringen Maße möglich ist, wenn bereits DA-43\* an CRP gebunden hat. Dies kann daran liegen, dass der jeweilige FA eine der fünf Bindungsstellen am CRP besetzen möchte, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft von der Bindungsstelle von DA-43\* befindet; daran aber sterisch gehindert wird, da DA-43\* bereits gebunden hat. Die Bindung von DA-43\* könnte zu einer Konformationsänderung von CRP führen, wodurch die Bindungsstelle für den FA nicht mehr vorkommt.<sup>142,143</sup> Es besteht die Möglichkeit, dass DA-43\* mehrere Epitope am CRP binden kann, zumal CRP ein Pentamer ist<sup>56,144</sup> und somit potentiell fünf Mal gebunden werden kann. Binden mehrere DA\* an ein CRP-Molekül, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass der FA aufgrund von sterischen Hinderungen oder bereits besetzten Epitopen nicht mehr an CRP binden

kann (Abbildung 4-11).<sup>145</sup> Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass die Signalintensitäten bei FA-30, FA-43 und FA-05 bei 200 nM DA-43\* niedriger sind als bei 100 nM DA-43\*.



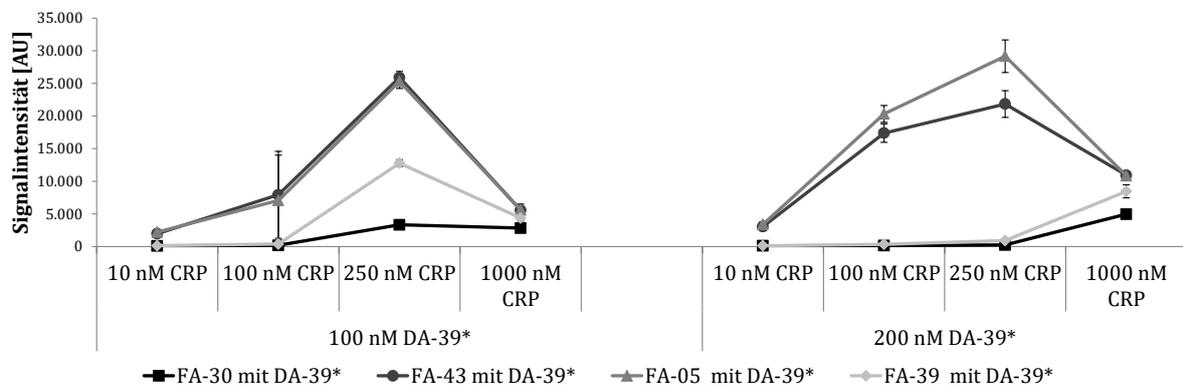
**Abbildung 4-11: Schematische Darstellung eines Microarrays im Sandwich-Format bei hoher Konzentration an Detektionsantikörpern.**

Nur in Kombination mit FA-39 wird ein Sandwich-Komplex ausgebildet. Die Signalintensität nimmt bei steigenden Konzentrationen an CRP zunächst zu, bei 250 nM CRP wird dann der höchste Wert mit 14123 AU bzw. 24090 AU erreicht und bei 1000 nM CRP sinkt die Signalintensität wieder auf 6656 AU bzw. 10278 AU. Dass die Signalintensitäten in dem Graph zunächst ansteigen und anschließend wieder sinken ist auf die steigende CRP-Konzentration, aber konstante Konzentration an markierten DAs zurückzuführen. Bei niedrigen CRP-Konzentrationen liegt der DA im Überschuss vor. Dieser bindet CRP und es resultiert lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal (Abbildung 4-12A). Zusätzlich kann es dazu kommen, dass auch hier mehrere DAs an ein CRP-Molekül binden und es somit nicht mehr von FAs gebunden werden kann. Dies führt zu einem noch geringeren Fluoreszenzsignal (Abbildung 4-11 bei 100 nM CRP). Nimmt die CRP-Konzentration zu, liegen CRP und DAs im Gleichgewicht vor, sodass in einem dynamischen Wechsel ein Großteil der DAs an einem CRP-Molekül gebunden hat und eine maximale Fluoreszenzintensität erreicht wird (Abbildung 4-12B, und Abbildung 4-10 bei 250 nM CRP). Bei einer weiteren Zunahme des Antigens liegt dieses im Überschuss vor. Nachdem alle DAs an ein Epitop gebunden haben, befindet sich weiterhin ungebundenes Antigen in Lösung, welches um die Paratope der auf dem Microarray immobilisierten FAs konkurriert. Die freien CRP-Moleküle sind nicht an ein Fluoreszenzmolekül gebunden, verhindern jedoch durch ihre Bindung an den FA die Bindung der DA\*-CRP-Komplexe, wodurch das Fluoreszenzsignal abnimmt (Abbildung 4-12C und Abbildung 4-10 bei 1000 nM CRP).



**Abbildung 4-12: Microarray im Sandwich-Format mit verschiedenen Antigen-Konzentrationen und gleichbleibender Konzentration an markiertem Detektionsantikörper. A) niedrige Antigen-Konzentration, B) mittlere Antigen-Konzentration, C) hohe Antigen-Konzentration.**

Bei Verwendung von DA-39\* ist in Abbildung 4-13 zu sehen, dass der Verlauf der Signalintensität bei FA-43 (●) und FA-05 (▲) sowie bei FA-30 (■) und FA-39 (◆) einen ähnlichen Verlauf aufweisen.



**Abbildung 4-13: Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 250 nM, 1000 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) sowie des Detektionsantikörpers 39\* (100 nM, links bzw. 200 nM, rechts) im Sandwich-Format. N=8.**

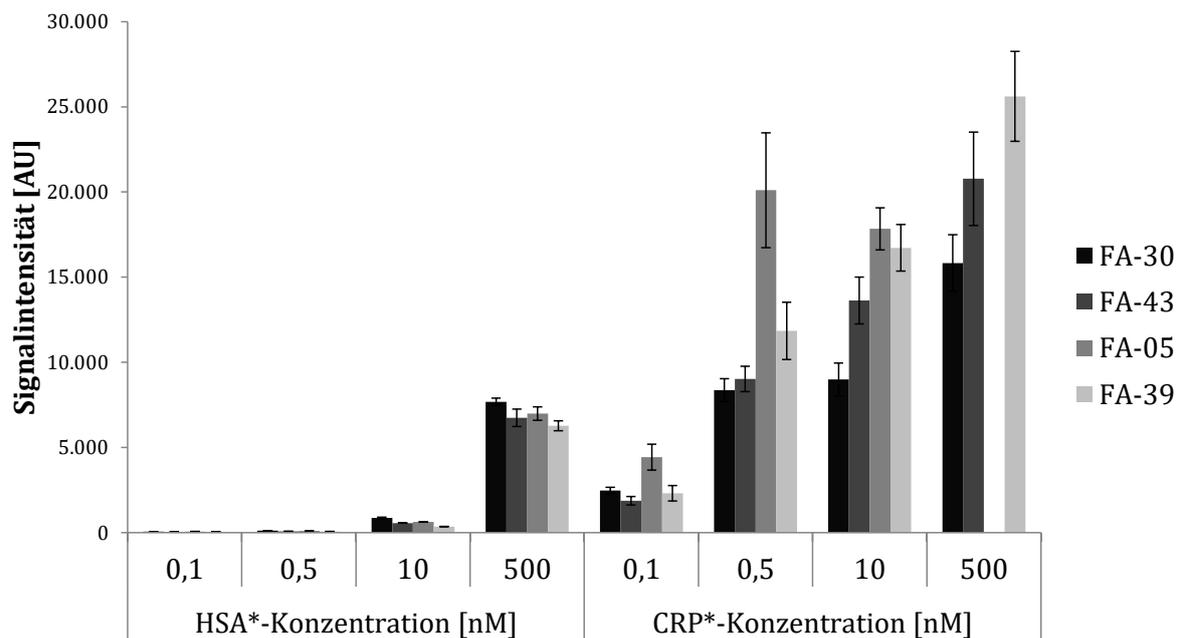
So nimmt bei FA-43 (●) und FA-05 (▲) die Signalintensität mit steigender CRP-Konzentration deutlich zu. Bei 250 nM CRP liegt für beide DA-39\*-Konzentrationen eine maximale Signalintensität von 21832 AU bzw. 29155 AU vor, die den Gleichgewichtszustand von CRP und DA anzeigt. Danach sinkt aufgrund des CRP-Überschusses die Signalintensität auf 1000 AU bzw. 5000 AU. FA-39 weist bei 100 nM DA-39\* einen ähnlichen Verlauf auf, wobei seine Signalintensität im Maximum ungefähr halb so groß ist (14000 AU). Bei einer Konzentration von 200 nM DA-39\* zeigt FA-39 (◆), ebenso wie FA-30 (■) für beide DA-39\*-Konzentrationen, nur sehr geringe Signalintensitäten, weshalb davon auszugehen ist, dass das Verhältnis von CRP und DA\* nicht ausgeglichen ist und bis zu einer Konzentration von 250 nM CRP ein Überschuss an DA\* vorliegt (Abbildung 4-12A). Erst ab einer Konzentration von 1000 nM CRP befinden sich in Relation zum DA\* ausreichend CRP-Moleküle in Lösung, sodass die Signalintensitäten anfangen zu steigen. Allerdings sind die Signalintensitäten so gering, dass eher davon ausgegangen werden kann, dass hier ein Sandwich-Komplex nur unzureichend ausgebildet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass DA-43\* und DA-39\* in Kombination mit bestimmten FA (FA-39/DA-43\*, FA-43/DA-39\*, FA-05/DA-39\*) mit CRP einen Sandwich-Komplex ausbilden können. Die Signalintensitäten sind bei einem Sandwich mit DA-39\* jedoch deutlich höher. Am besten erweisen sich die Kombinationen FA-43/DA-39\* und FA-05/DA-39\*.

#### 4.2.2.3 Beurteilung der Antikörperspezifität

Zur Beurteilung der Spezifität der CRP-spezifischen Antikörper wurden diese mit humanem Serum Albumin\* (HSA\*) in zwei verschiedenen Forward-Microarrays inkubiert. HSA ist das im Serum am häufigsten vorkommende Protein und wird während einer Proteinurie über den Urin ausgeschieden.<sup>146</sup> Aus diesem Grund muss die eventuelle spätere Konkurrenz zwischen dem hoch konzentrierten HSA und dem eventuell geringer konzentrierten CRP in einem LFA ausgeschlossen werden.

Standard Forward-Microarray: Für den Forward-Microarray wurden die vier CRP-spezifischen Antikörper auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen (1 mg·mL<sup>-1</sup>). Anschließend wurden HSA\* und CRP\* in Konzentrationen zwischen 0,1 und 500 nM zugegeben. Die ausgewerteten Signale sind in (Abbildung 4-14) dargestellt.

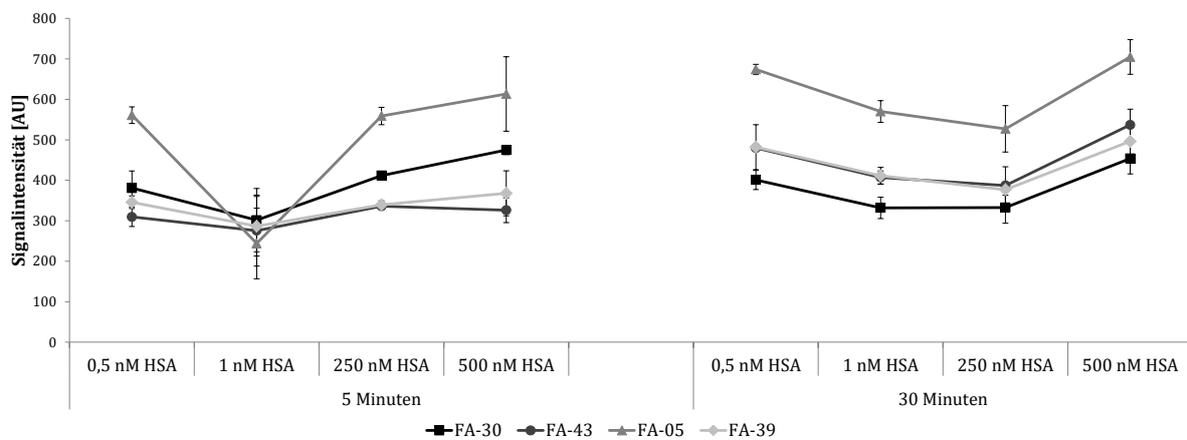


**Abbildung 4-14: Bindungsstudien im Forward-Format von verschiedenen CRP\*- und HSA\*-Konzentrationen (0,1, 0,5, 10 und 500 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität (FA-30, FA-43, FA-05, FA-39). N=8**

Dabei ist gut zu erkennen, dass die Signalintensitäten bei der Bindung von 500 HSA\* im Vergleich zu CRP\* um das 2-4-fache geringer sind. Bei HSA\*-Konzentrationen von 0,1-10 nM sind die Signalintensitäten sehr gering bis nicht existent. Aufgrund von unspezifischen Bindungen bei höheren HSA-Konzentrationen, wurde zunächst ein kompetitiver Forward-Microarray

durchgeführt. Zusätzlich muss eine Kreuzreaktion mit HSA im LFA getestet und ausgeschlossen werden.

**Kompetitiver Forward-Microarray:** Um sicher zu gehen, dass in dem späteren LFA auch hohe HSA-Konzentrationen zu keinem falsch positiven Ergebnis führen, wurde ein kompetitiver Versuchsaufbau mit HSA und CRP\* durchgeführt. Bei einem kompetitiven Test wird untersucht, ob der FA das zu interessierende Antigen oder ein anderes Protein (hier HSA) bevorzugt bindet. Dazu wurden 500 nM CRP\* zusammen mit nicht markiertem HSA in verschiedenen Konzentrationen (0,5-500 nM) für 5 oder 30 Minuten mit den verschiedenen FAs (1 mg·mL<sup>-1</sup>) inkubiert (Abbildung 4-15).

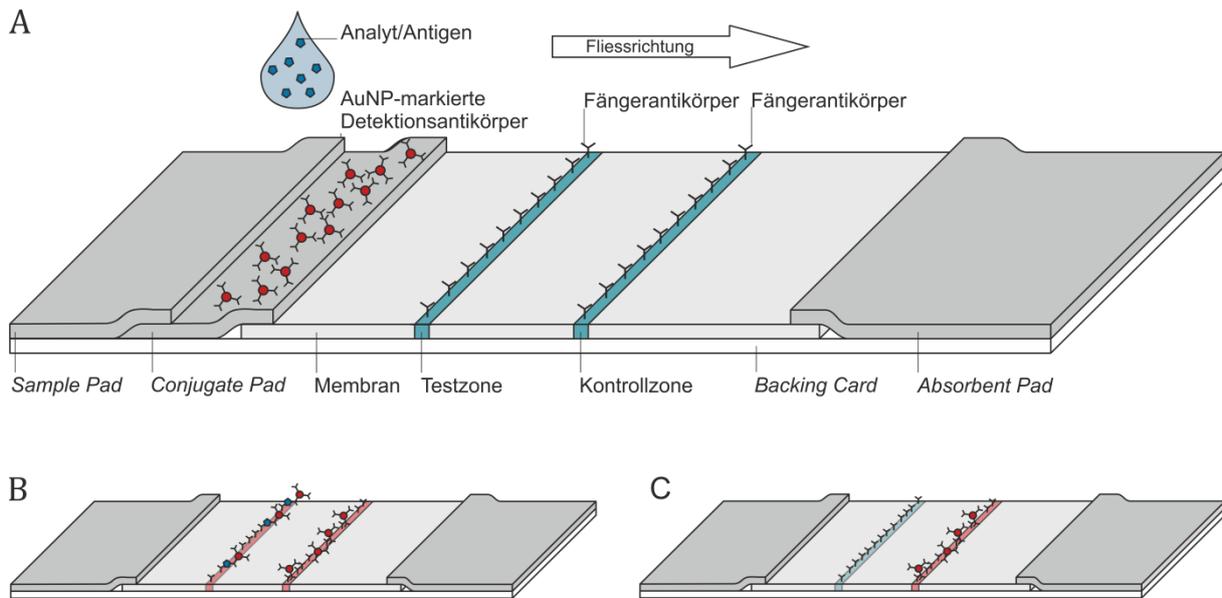


**Abbildung 4-15: Kompetitive Bindungsstudien im Forward-Format mit fluoreszenzmarkiertem CRP\* (500 nM), verschiedenen Konzentrationen nicht-markiertem HSA (0,5; 1; 10 und 500 nM) und den Fängerantikörpern FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39. N=8.**

Dabei ist zu erkennen, dass es bei Erhöhung der HSA-Konzentration zu keiner signifikanten Verminderung der Signalintensität kommt und somit die Bindung von CRP\* an die jeweiligen Antikörper nicht unterbunden wird. Aus diesem Grund wurde im LFA mit der Kombination FA-43/DA-39\* zunächst weitergearbeitet.

#### 4.2.3 Lateral Flow Assay zur Detektion von CRP

Die in dieser Arbeit entwickelten LFAs bestehen aus sechs Hauptkomponenten: *Backing Card*, *Release Pad*, *Membran*, *Absorbent Pad*, *Konjugat*, *Testzone* mit FAs und *Kontrollzone* mit FAs. Die *Membran*, auf der sich *Test-* und *Kontrollzone* befinden, wird zunächst auf die *Backing Card* aufgeklebt, anschließend werden *Release Pad* und *Absorbent Pad* mit der *Membran* überlappend ebenfalls aufgeklebt (Abbildung 4-16A). Die in dieser Arbeit verwendeten festen Komponenten des LFAs (*Backing Card*, *Release Pad*, *Membran* und *Absorbent Pad*) wurden freundlicherweise vom Kooperationspartner Sartorius Stedim Biotech zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 4-16: Schematische Darstellung eines Lateral Flow Assays. A) Darstellung der einzelnen Komponenten eines Lateral Flow Assays mit seiner Flussrichtung. B) Ausbildung einer Rotfärbung durch Bindung des Antigen-Konjugat-Komplexes in der Testzone sowie Bindung des Detektionsantikörpers in der Kontrollzone zeigt ein positives Test-Ergebnis an. C) Alleinige Ausbildung einer Rotfärbung in der Kontrollzone durch Bindung des Konjugats zeigt ein negatives Test-Ergebnis an (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).**

Das *Release Pad* (Polyesterfasern) wurde vor Verwendung mit einer Pufferlösung (Tris), einem Blockierungsreagenz (BSA) sowie Tween 20 vorbehandelt. Die FAs für die Test- und Kontrolllinien werden vor der Testdurchführung des LFAs in die entsprechenden Zonen auf der Membran (Nitrozellulose) aufgetragen. Ebenso wird das Konjugat - an Goldnanopartikel (AuNPs) konjugierte Detektionsantikörper (DA) - vor Testdurchführung auf dem *Release Pad* vorgelegt. Für diese Arbeit wurden die AuNPs freundlicherweise vom Kooperationspartner Fassisi GmbH bereitgestellt. Die in Kapitel 3.4 vorgestellten *Sample Pad* und *Conjugate Pad* werden in dieser Arbeit als *Release Pad* zusammengefasst, da in dieser Arbeit nur ein *Pad* verwendet wurde (vgl. Abbildung 4-16 und Abbildung 3-10, Kapitel 3.4).

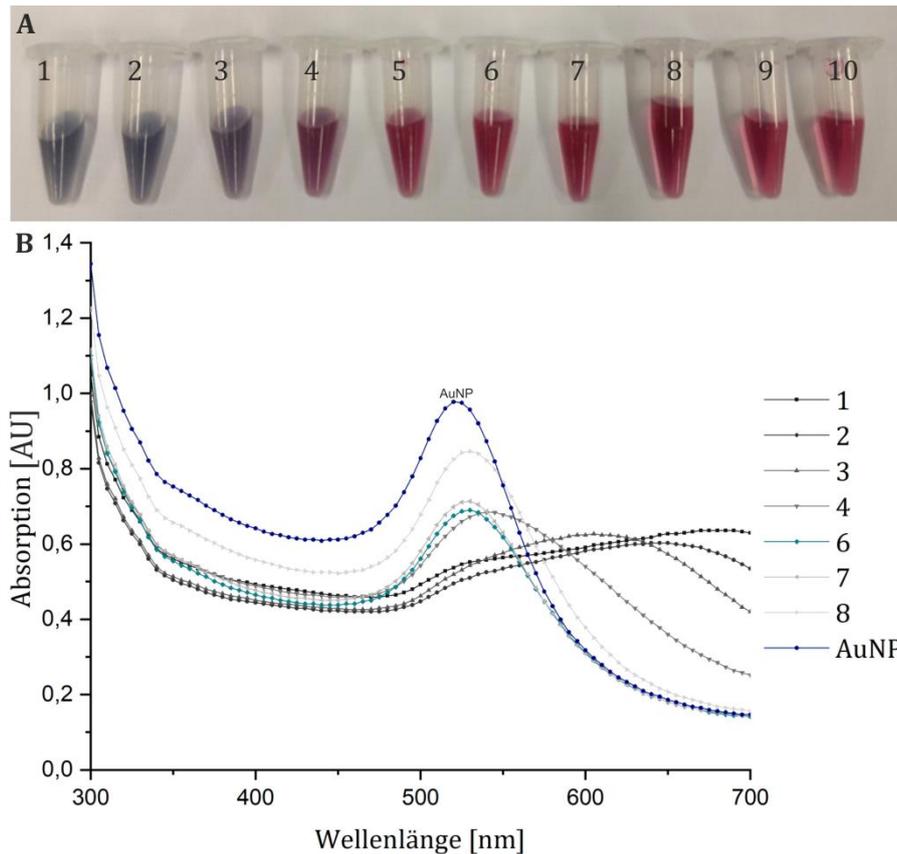
Aufgrund von Kapillarkräften migriert bei der Testdurchführung die Probenflüssigkeit mit dem Antigen den Teststreifen entlang. Beim Passieren des Konjugats bindet dieses an das Antigen, als Komplex aus Antigen, DA und AuNP migriert es weiter bis zur Testzone. Dort bindet der Komplex an den membrangebundenen FA. Durch die Bindung der AuNPs entsteht das Detektionssignal des Assays, eine Rotfärbung der Testzone. Die Probenflüssigkeit mit nicht-gebundenen Komponenten passieren als nächstes die Kontrollzone. Der AuNP-gebundene DA bindet hier an die FAs, sodass hier ebenfalls eine Rotfärbung ausgebildet wird. Die verbleibende Probenflüssigkeit wird vom *Absorbent Pad* (hochreine Baumwollfasern) aufgenommen. Entsteht sowohl in der Test- als auch in der Kontrollzone eine Rotfärbung, so wird der Test als positiv und funktional gewertet (Abbildung 4-16B). Befindet sich kein Zielprotein in der Probenflüssigkeit, kann auf der Testzone kein Sandwich-Komplex ausgebildet werden und die Rotfärbung in der Testzone bleibt aus. Das

AuNP-DA-Konjugat wird jedoch unabhängig davon an die Kontrollzone gebunden, sodass hier die rote Kontrolllinie entsteht und die Funktionalität und Gültigkeit des Teststreifens veranschaulicht wird (Abbildung 4-16C). Bleibt die Rotfärbung der Kontrolllinie aus, so ist der Test ungültig.

Zur Auswertung werden die LFAs mit einem Scanner abgebildet und anschließend mit ImageJ quantitativ ausgewertet. Eine visuelle, rein optische Auswertung durch den Anwender kann ebenfalls erfolgen und auch diese wird in dieser Arbeit verwendet. Als erster Schritt zum Aufbau des vorgestellten LFAs müssen die signalgebenden roten AuNPs mit dem DA konjugiert werden. Die AuNPs wurden in Kapitel 4.1 bereits charakterisiert. In den folgenden Kapiteln erfolgt die Konjugation der DAs an die AuNPs sowie die schrittweise Entwicklung des LFAs.

### **4.2.3.1 Herstellung von Goldnanopartikel- Antikörper-Konjugaten**

Im LFA dienen AuNPs dem visuellen Nachweis des Antigens in einer Probe. Befinden sich viele AuNPs konzentriert auf einem Punkt, sind sie für das menschliche Auge sichtbar und auswertbar. Somit ist ein entscheidender Faktor bei der LFA-Entwicklung die Herstellung der AuNP-Antikörper-Konjugate. Die Konjugation zwischen Proteinen und AuNPs findet aufgrund von elektrostatischer, hydrophober sowie Van-der-Waals Interaktionen statt.<sup>147-149</sup> Aufgrund der negativ geladenen Oberfläche der AuNPs binden hieran positiv geladene Proteine, wie z.B. Antikörper und BSA, besonders leicht. Zur Konjugation wurde ein abgeändertes Protokoll von Hermanson verwendet.<sup>147</sup> Eine definierte Konzentration des DAs wurde ungerichtet an eine definierte Menge AuNPs gekoppelt. Die Konzentration des DAs wurde so gewählt, dass sie hinreichend ist, um die AuNPs ausreichend zu bedecken. Allerdings sollten die DA nicht im Überschuss vorliegen, um Material einzusparen. Sind die AuNPs mit Protein ausreichend bedeckt, sind sie stabil und vor Aggregation (bspw. bei hohen Salzkonzentrationen) geschützt. Um diese kritische Antikörperkonzentration zu ermitteln, wird ein sogenannter Flokkulationstest durchgeführt. Dabei werden verschiedene Konzentrationen des DAs zu einer definierten Menge AuNPs gegeben. Nach der Inkubation wird Natriumchlorid zur ‚Aussalzung‘ dazugegeben. Bei zu geringer Antikörperkonzentration entstehen große Aggregate der AuNPs, welche zu einem Farbumschlag von Rot zu Grau führen.<sup>150</sup> Dieser Farbumschlag kann mit dem Auge wahrgenommen oder mittels Photometer analysiert werden. Entstehen keine Aggregate und die Farbe sowie das UV-Vis-Spektrum der Konjugate ähneln denen der reinen AuNPs, wurden stabile Konjugate aus DAs und AuNPs gebildet. Aufgrund der Microarray-Ergebnisse aus Kapitel 4.2.2.2 wurden zunächst Flokkulationstests mit den Antikörpern DA-39 (Abbildung 4-17) und DA-43 (Anhang, Abbildung 7-2) durchgeführt.



**Abbildung 4-17: Visuelle Auswertung (A) und Absorptionsspektren (B) des Flokkulationstests mit DA-39 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2=1,74  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 3=2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4=3,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 5=4,35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6=5,22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 7=6,09  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 8=6,96  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 9=7,83  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10=8,7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , AuNP=0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Zur besseren Übersicht sind in B) nicht alle Konjugationsansätze dargestellt. Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert.**

In Abbildung 4-17A ist zu erkennen, dass zwischen den 10 Proben ein farblicher Übergang von Grau (Probe 1) zu Rot (Probe 10) erfolgt. Abbildung 4-17B veranschaulicht diesen Farbumschlag noch einmal grafisch. Zur besseren Veranschaulichung sind nicht alle Proben dargestellt. Bei den ersten drei Proben (0,87-2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ist zu erkennen, dass ein deutlicher Farbumschlag von Rot zu Grau stattgefunden hat und in den dazugehörigen Graphen kein für Goldnanopartikel typischer Verlauf dargestellt ist; die Kurven sind flach und zeigen erst bei Wellenlängen >600 nm ein sehr breites Maximum. Das UV-Vis-Spektrum reiner AuNPs (hier  $28,62 \pm 13,29$  nm, Kapitel 4.1) weist ein lokales Minimum bei ungefähr 450 nm auf, zeigt einen symmetrischen Peak mit einem Maximum bei ca. 520 nm und endet nach einem Absorptionsabfall bei einer asymptotischen Annäherung von 0 AU (blaue Kurve). Probe vier (3,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) weist bereits einen deutlicheren Rotstich auf, was auch im Graph dieser Probe durch den Shift des Maximums Richtung 520 nm zu erkennen ist. Ab der fünften Probe nähern sich die Graphen dem Kurvenverlauf der reinen AuNPs immer weiter an. Die sechste Probe (5,22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , türkise Kurve) wurde daher als das stabilste Konjugat mit der niedrigsten Konzentration an DAs ausgewählt. Für die tatsächliche Konjugatherstellung wird anstelle des Salzes im Flokkulationstest ein Blockierungsreagenz (hier

BSA) verwendet, um eventuelle freiliegende Stellen der AuNPs abzuschirmen und dadurch eine Stabilisierung des Konjugats zu erreichen.

Für eine stabile Konjugation von Antikörper DA-43 mit AuNPs wird eine Antikörperkonzentration von  $4,35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  benötigt (Anhang, Abbildung 7-2). In den folgenden Versuchen wurde der Antikörper 39 mit einer Konzentration von  $5,22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und der Antikörper 43 mit  $4,35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  als DA im Konjugat eingesetzt.

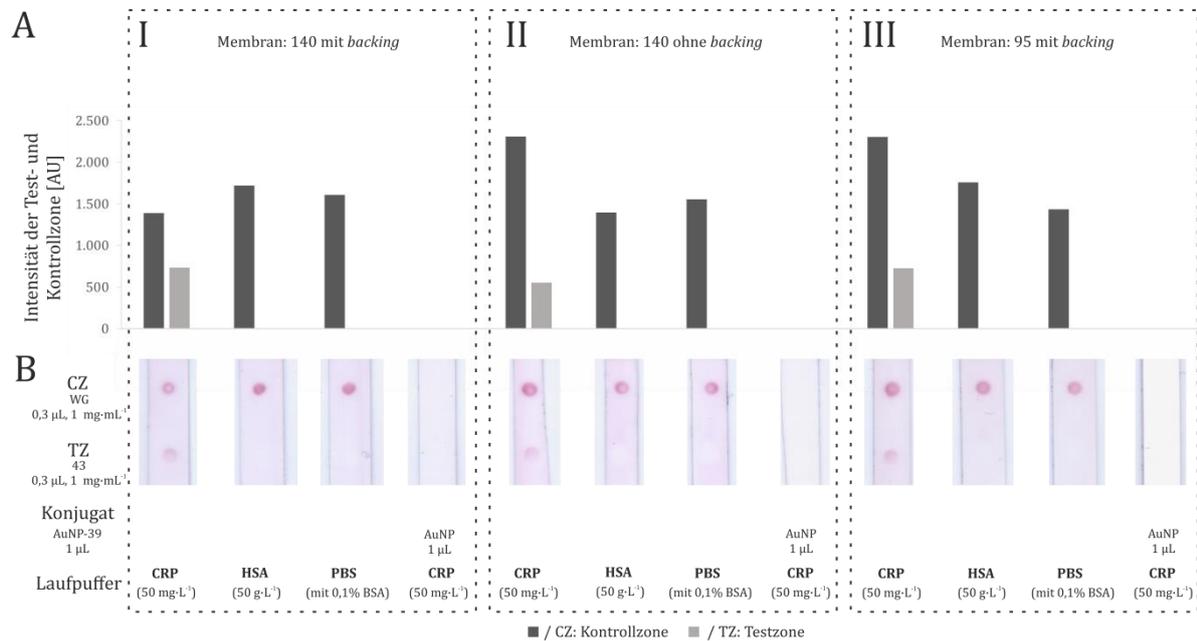
### 4.2.3.2 Etablierung des Lateral Flow Assays

Basierend auf den Microarray-Experimenten wurde für den Nachweis einer erhöhten CRP-Konzentration ein LFA entwickelt. Bei einem gesunden Patienten liegt die CRP-Konzentration im Serum bei weniger als  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  <sup>70,151</sup>, wohingegen die CRP-Konzentration bei einer Entzündung oder Gewebeschädigung deutlich zunimmt. <sup>144,151,152</sup> Aus diesem Grund soll der hier entwickelte LFA den Nachweis eines erhöhten CRP-Levels mit einer "Ja" ( $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP) oder "Nein"-Antwort ( $< 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP) anzeigen.

Antikörper 39 wurde als DA mit AuNPs (AuNP-39) konjugiert (Kapitel 4.2.3.1) und Antikörper 43 wurde als FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der LFA-Membran eingesetzt. In der Kontrollzone wurde der Antikörper W41502G (WG,  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) eingesetzt, welcher gegen den Fc-Abschnitt eines Antikörpers aus der Maus gerichtet ist und somit den monoklonalen, murinen DA 39 binden kann. Des Weiteren wurden drei verschiedene Nitrozellulosemembranen von Sartorius (Unisart® CN140 mit *backing*, CN140 ohne *backing* und 95 ohne *backing*) getestet, um das bestmögliche Resultat zu erzielen. Die Zusammensetzung des LFA-Streifens erfolgte wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

Zur Materialeinsparung wurden die FAs ( $0,3 \mu\text{L}$ ) zunächst händisch in Punktform auf die Test- und Kontrollzone der LFA-Membran aufgetragen (Anhang, Abbildung 7-1A) und über Nacht getrocknet. Auf das *Release Pad* wurde das Konjugat AuNP-39 ( $1 \mu\text{L}$ ) aufgegeben. Als Probenflüssigkeit wurden  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP gewählt. Zusätzlich wurden als Kontrollen  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HSA und reiner Puffer (PBS/ 0,1% BSA) sowie AuNPs ohne konjugierte DAs eingesetzt. HSA zeigte in Kapitel 4.2.2.3 auf Microarrays bei sehr hohen Konzentrationen eine geringe Bindung an die CRP-spezifischen Antikörper 39 und 43. Da es das im Serum am meisten vorkommende Protein ist und die Microarray-Experimente nur als schnelles Screening-Modell verwendet werden können, musste eine Kreuzreaktion auch auf den LFAs ausgeschlossen werden. Um auszuschließen, dass der Puffer bzw. Bestandteile aus dem Puffer zu einer Bindung von AuNP-39 an den FA führt wurde ein LFA nur mit Pufferlösung ohne CRP-Zusatz getestet. Durch Verwendung von reinen AuNPs, an denen sich keine DAs befanden, wurde sichergestellt, dass nicht die AuNPs selber an CRP oder die FAs in der Test- oder Kontrollzone binden. Die Teststreifen wurden vertikal in  $100 \mu\text{L}$

Probenflüssigkeit platziert und nach Durchführung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-18 dargestellt.



**Abbildung 4-18:** LFAs (B) unter Verwendung von drei unterschiedlichen Membranen (I, II, III), die mit jeweils vier verschiedenen Laufpuffern durchgeführt wurden sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100 µL CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>), HSA (50 g·L<sup>-1</sup>), PBS mit 0,1% BSA oder CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) mit reinen AuNPs durchgeführt wurden. Es wurde 1 µL AuNP-39 auf dem *Release Pad*, Antikörper 43 als CRP-FA (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone und Antikörper WG als FA für DA-39 (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. I: Membran 140 mit *backing*; II: 140 ohne *backing*; III: 95 mit *backing*.

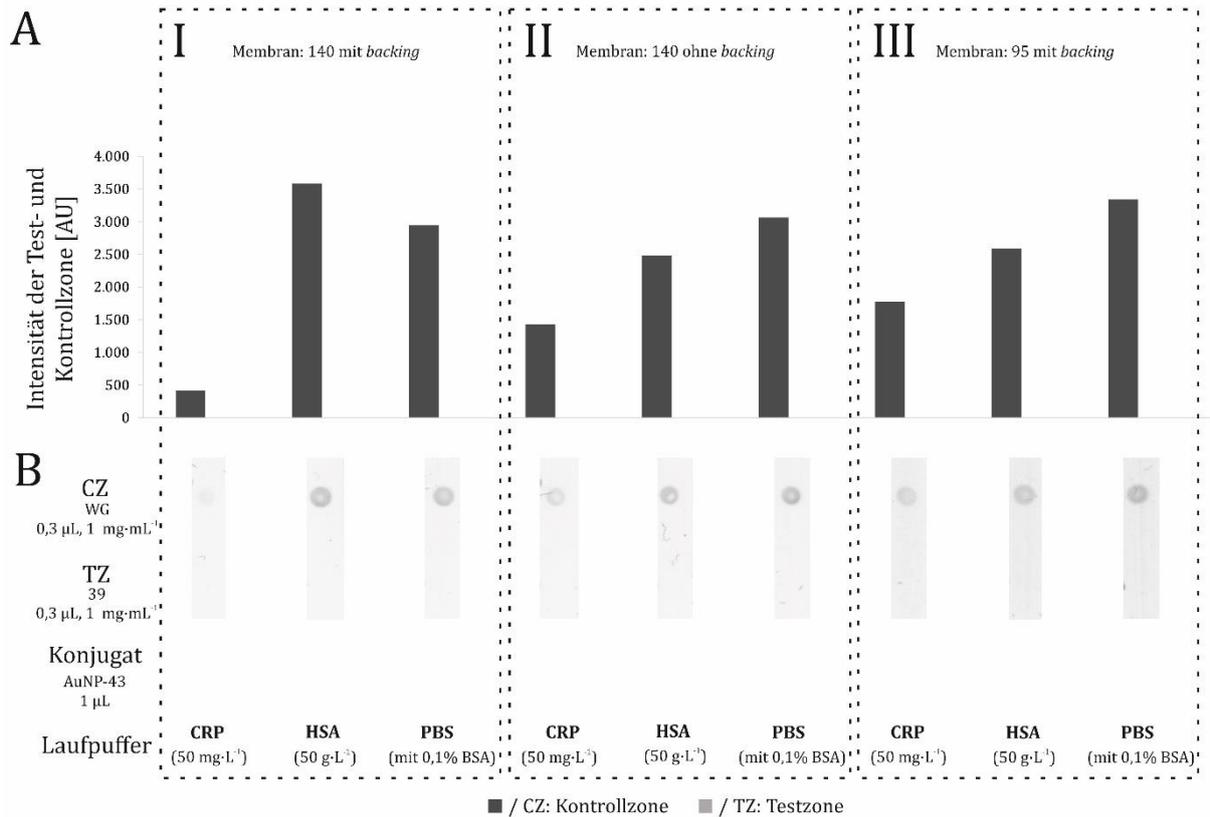
Die LFA-Streifen in Abbildung 4-18I, II und II mit 50 mg·L<sup>-1</sup> CRP zeigen sowohl in der Test- als auch in der Kontrollzone einen roten Punkt. Daraus kann geschlossen werden, dass in der Testzone jeweils die vielfache Ausbildung des Sandwich-Komplexes aus 43-CRP-AuNP-39 stattfand. Außerdem wird durch den roten Punkt in der Kontrollzone gezeigt, dass der Test funktional ist. Hier wurde der DA-39 vom FA, der gegen den DA gerichtet ist, gebunden, wodurch in der Kontrollzone beim Erreichen des Laufpuffers (ca. 1 min nach Probenaufgabe) ein roter Punkt entstanden ist. In dieser Arbeit wurden nur LFAs ausgewertet, die durch die Ausbildung eines Punktes in der Kontrollzone die volle Funktionalität des Testes anzeigten. Aus diesem Grund wird im Folgenden nur noch auf eine Färbung in der Kontrollzone eingegangen, wenn dort eine Besonderheit vorliegt. Die drei Membranen wiesen durch unterschiedlich starke Vernetzung der Nitrozellulose sowie das Vorhandensein einer rückseitigen Unterstüzung (*backing*) verschiedene Fließeigenschaften der Probenflüssigkeit auf. Dabei ist die Beschaffenheit der Porengröße und somit auch der *wicking rate*, der Zeit, die Wasser benötigt, um 4 cm der Membran entlang zu migrieren (s·cm<sup>-1</sup>), bei den Membranen 140 mit *backing* und 140 ohne *backing* nur minimal unterschiedlich. Die Membran 95 mit *backing* weist hingegen größere Poren in der Nitrozellulose auf und besitzt somit eine geringere *wicking rate* (Anhang, Tabelle 7-1). Je länger die *wicking rate*

ist, desto mehr Zeit haben DA und Biomarker einen Komplex auszubilden, um anschließend auf der Testzone zu binden. Die verschiedenen Membranen scheinen in dem hier entwickelten LFA aber keinen relevanten Einfluss zu haben. Allerdings war bei der Kontrolle mit  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP und reinen AuNPs ersichtlich, dass die Membran 95 mit *backing* deutlich weißer blieb als die anderen beiden Membranen. Die Poren der Membran 95 sind größer als die der Membran 140<sup>128</sup>, wodurch die AuNPs die Membran 95 schneller passieren konnten und sich somit nach gleicher Laufzeit hier bereits im *Absorbent Pad* befanden.

Bei den zwei Kontrollen mit HSA bzw. reiner Pufferlösung ist jeweils nur ein roter Punkt in der Kontrollzone zu erkennen, jedoch kein roter Punkt in der Testzone. Dies bedeutet, dass die beiden Antikörper mit HSA keinen Komplex ausbilden und ebenso nicht mit einer anderen Komponente der Probenflüssigkeit. Auch eine Bindung des CRP-FAs an den CRP-DA wurde so ausgeschlossen. Werden reine AuNPs statt Konjugat auf das *Release Pad* gegeben, werden keine roten Punkte in der Test- und Kontrollzone geformt. Dies bestätigt, dass ein Sandwich-Komplex nur bei vollständigem Aufbau des LFAs ausgebildet wird. Die AuNPs ohne konjugierte DAs gehen keine Bindung zu Bestandteilen des LFAs ein und können ebenfalls nicht ohne DA an die Antikörper in der Test- oder Kontrollzone binden. Alle durchgeführten Kontrollen zeigten somit erfolgreich ein negatives Testergebnis.

Zusätzlich wurde ein LFA aufgebaut, in dem die beiden Antikörper in ihrer Funktion getauscht wurden, da diese Kombination im Microarray ebenfalls gute Ergebnisse erzielt hatte (Kapitel 4.2.2.2, Abbildung 4-10). Wird FA-39 in der Testzone und DA-43 mit AuNPs konjugiert (AuNP-43) verwendet, entsteht bei Verwendung von CRP-Probenflüssigkeit in der Testzone bei allen drei verwendeten Membranen entgegen der Erwartung kein roter Punkt. Dies ist auch in den dazugehörigen Diagrammen erkennbar (Abbildung 4-19). Zu diesem Zeitpunkt wurden die LFAs in schwarz-weiß gescannt.

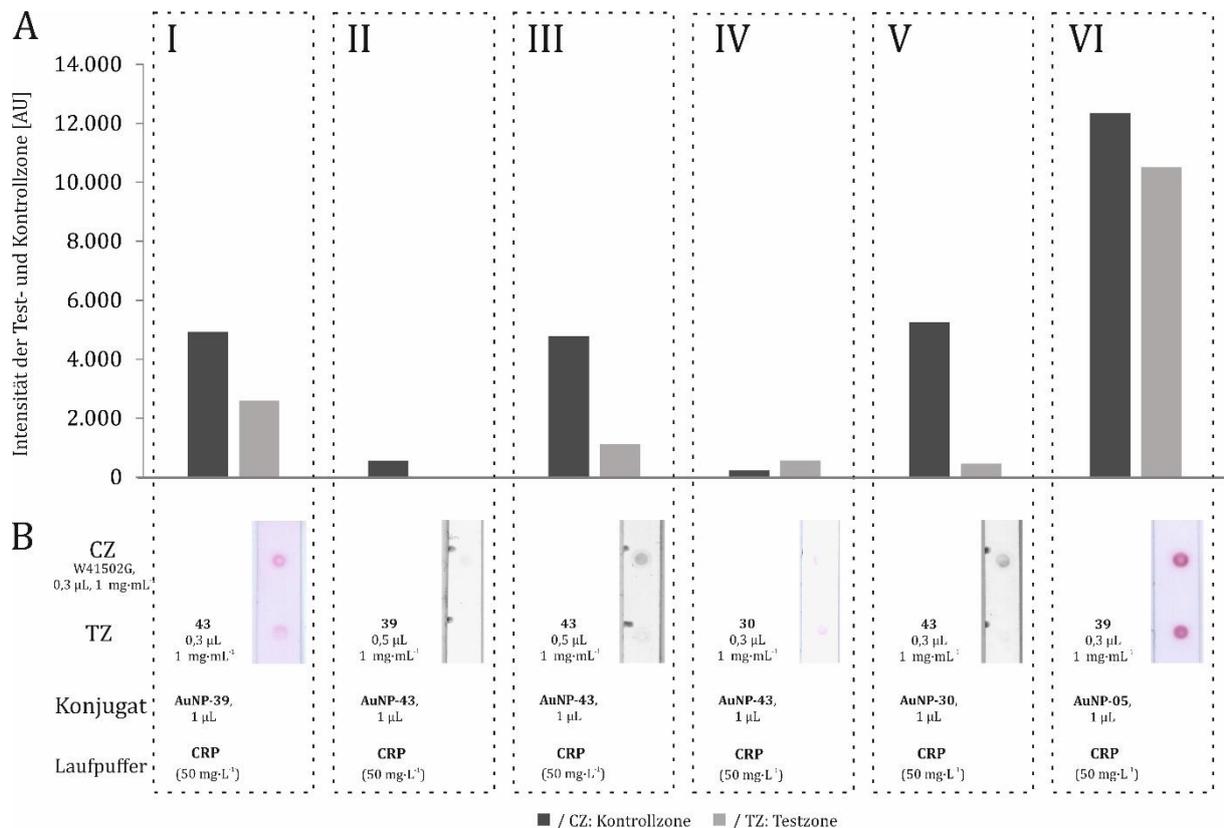
Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass 39 als FA und 43 als DA im Microarray-Format zwar einen Sandwich-Komplex ausbilden konnten, in einem LFA-Format jedoch nicht. Dies kann daran liegen, dass der Fluoreszenzfarbstoff (beim Microarray) und die AuNPs an unterschiedliche Bereiche des DAs gebunden sind und somit der Antikörper im Microarray noch über freie Bindestellen verfügt, im LFA diese jedoch nicht mehr aufweist, da die AuNPs zudem wesentlich größer und sterisch hindernd sind. Außerdem unterscheiden sich die Inkubationszeiten von einem Microarray zu denen eines LFAs. Im Microarray kann diese frei gewählt werden und liegt im Bereich von Minuten bis Stunden, wohingegen im LFA die Inkubationszeit von der Fließeigenschaft der Membran sowie der Pufferzusammensetzung abhängig ist und die tatsächliche Reaktion im Bereich der Testzone nur im Bereich von Sekunden bis Minuten liegt.



**Abbildung 4-19: LFAs (B) unter Verwendung von drei unterschiedlichen Membranen (I, II und III), die mit jeweils drei verschiedenen Laufpuffern durchgeführt wurden sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100 µL CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>), HSA (50 g·L<sup>-1</sup>) oder PBS mit 0,1% BSA durchgeführt wurden. Es wurde 1 µL AuNP-43 auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone und Antikörper WG als FA für DA-43 (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. I: Membran 140 mit *backing*; II: 140 ohne *backing*; III: 95 mit *backing*.**

Aufgrund der Divergenz der LFA- und Microarray-Ergebnisse wurden auch die in Kapitel 4.2.2 als schlechter bewerteten CRP-spezifischen Antikörper in verschiedenen Kombinationen miteinander ebenfalls im LFA-Format getestet. Da bei der Verwendung der verschiedenen Membranen keine signifikanten Unterschieden gezeigt werden konnte, wurde für eine lange Laufzeit die Membran 140 *backed* verwendet und 50 mg·L<sup>-1</sup> CRP als Laufpuffer gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-20 zusammengestellt. Die in Abbildung 4-18 und Abbildung 4-19 für FA43/DA39 und FA39/DA43 gezeigten LFA-Ergebnisse wurden in Abbildung 4-20I & II übertragen. Unter Verwendung der neuen Kombinationen aus DA und FA wurde in jeder Testzone ein roter Punkt gebildet, der sowohl mit bloßem Auge sichtbar war als auch grafisch ausgewertet werden konnte (Abbildung 4-20III-VI). Diese Punkte waren jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Werden FA-43 oder FA-39 mit AuNP-43 kombiniert, ergeben sich andere Ergebnisse als im Microarray. Im Gegensatz zum Microarray-Experiment ist FA-43 auf dem LFA im Vergleich zu FA-39 der bessere FA (Abbildung 4-20 III vs. II). Bei der Verwendung von FA-39 konnte bei der grafischen Auswertung in der Kontrollzone kein Punkt nachgewiesen werden, bei FA-43 betrug

die Intensität des Punktes 1120 AU. Wie auch schon im Microarray ist bei der Verwendung von DA-43 die Kombination mit FA-30 eine schwach bindende Kombination (Abbildung 4-20IV).



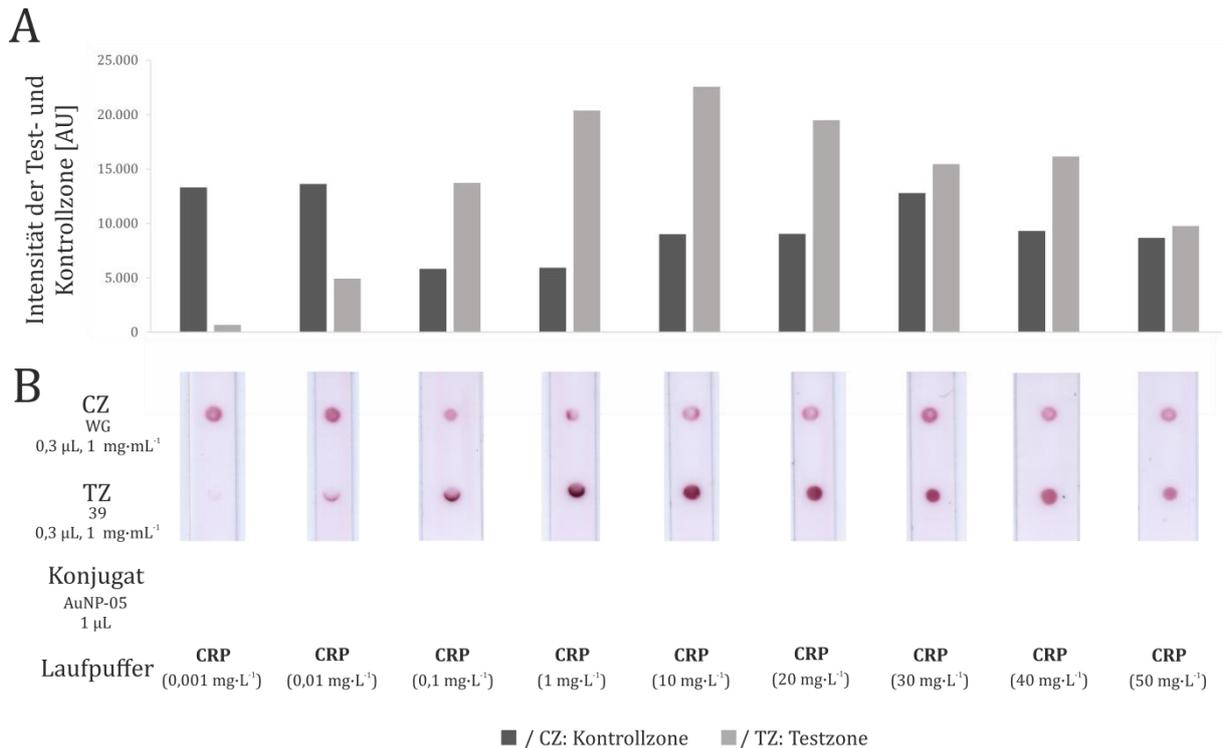
**Abbildung 4-20: LFAs (B) mit unterschiedlichen Fänger- und Detektionsantikörpern zur Identifizierung der geeignetsten Kombination sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die jeweils mit 100  $\mu$ L CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) durchgeführt wurden. Es wurde jeweils 1  $\mu$ L Konjugat auf dem *Release Pad* und WG (0,3  $\mu$ L, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. Als Fängerantikörper (1 mg·mL<sup>-1</sup>) wurden verschiedene Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.**

Zusätzlich wurden die Antikörper 30 und 05 als DA eingesetzt (AuNP-30 und AuNP-05), auch wenn diese im Microarray-Format nicht getestet wurden. Bei der Verwendung von FA-43 und AuNP-30 wurde nur ein sehr schwacher Punkt in der Testzone ausgebildet (Abbildung 4-20V). Der Antikörper 05 hingegen hat sich im LFA mit FA-39 als guter DA erwiesen. Im Vergleich der in Abbildung 4-20 dargestellten LFAs entsteht durch die Verwendung von AuNP-05 und FA-39 in der Testzone das stärkste Signal. Dabei ist allerdings zu beachten, dass bei den LFAs in II und III ein größeres Volumen (0,5  $\mu$ L) FA aufgetragen wurden als bei den restlichen. Dies kann auf der einen Seite dazu führen, dass mehr CRP-Moleküle gebunden werden können. Auf der anderen Seite kann dadurch auch eine größere sterische Hinderung zustande kommen, die mit der Verdeckung der Paratope der FAs einhergeht. Aus diesem Grund und da die LFAs nicht zeitgleich durchgeführt worden sind, sind die LFAs nur bedingt miteinander zu vergleichen. Da jedoch bei FA-39 mit AuNP-05 die Signalintensität auf der Testzone mit 1015 AU viermal so stark ist als das

nächsthöchste Signal, wurde diese Antikörperkombination für die weitere Assay-Entwicklung verwendet.

#### 4.2.3.3 Optimierung der Assaysensitivität

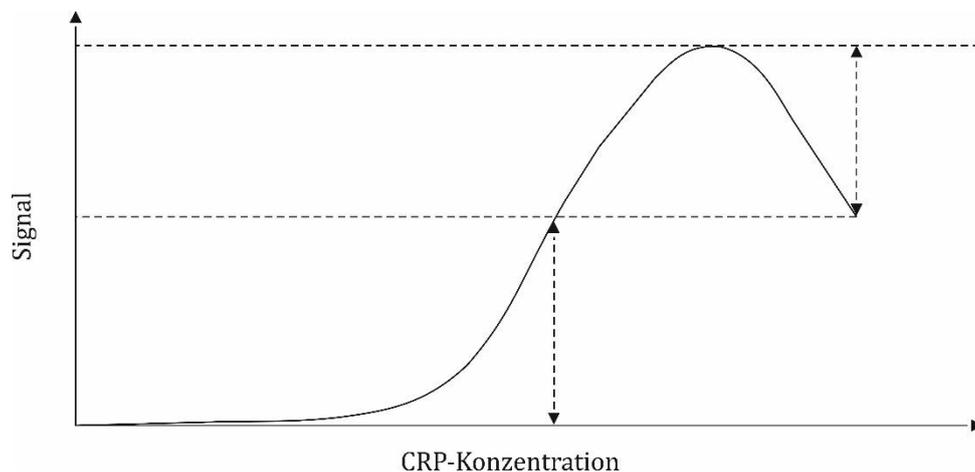
Zur Beurteilung der Assaysensitivität wurde zunächst eine CRP-Konzentrationsreihe (0,001-50 mg·L<sup>-1</sup>) mit FA-39 und AuNP-05 angefertigt (Abbildung 4-21). Mit dem LFA konnte bereits eine Konzentration von 0,001 mg·L<sup>-1</sup> detektiert werden, auch wenn der dazugehörige rote Punkt in der Testzone nur sehr schwach ausgebildet war. Schon ab einer Konzentration von 0,01 mg·L<sup>-1</sup> ist ein ausreichend rotes Signal in der Testzone erkennbar, das auch durch den Endverbraucher visuell ausgewertet werden kann. Bei weiter steigender CRP-Konzentration, wird die Rotfärbung in der Testzone immer intensiver, bis sie ab einer Konzentration von 10 mg·L<sup>-1</sup> wieder schwächer wird (Abbildung 4-21B). Dieser Verlauf ist ebenso im Säulendiagramm in Abbildung 4-21A ersichtlich. Hier ist auch sichtbar, dass die Intensität der Kontrollzone von der Testzone abhängig ist. Bei intensiven Testzonen werden weniger intensivere Kontrollzonen erhalten, als bei schwächeren Testzonen. Bei letzteren ist eine geringere Menge Konjugat in der Testzone gebunden, wodurch eine größere Menge freies Konjugat in der Kontrollzone binden konnte.



**Abbildung 4-21: LFAs (B) unter Verwendung von variierenden CRP-Konzentrationen (0,001 – 50 mg·L<sup>-1</sup>) im Laufpuffer sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Säulendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem Release Pad, Antikörper 39 als CRP-FA (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone und Antikörper WG als FA für AuNP-05 (0,3 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet.**

Die Intensivierung der Rotfärbung mit zunehmender CRP-Konzentration entsteht durch die vermehrte Ausbildung des Komplexes (FA-39 – CRP – AuNP-05). CRP ist ein Pentamer und

dementsprechend aus fünf gleichen strukturellen Untereinheiten aufgebaut.<sup>56,144</sup> Ein Molekül CRP besitzt somit mindestens fünf identische Epitope, an das ein monoklonaler Antikörper binden kann. Allerdings kann es durch sterische Hinderungen dazu kommen, dass nicht fünf oder mehr Antikörper gleichzeitig binden können. Jedoch wurden bei dem LFA in Abbildung 4-21 bei steigender CRP-Konzentration die DAs mit CRP abgesättigt und haben anschließend in der Testzone an den FA gebunden. Ab einer CRP-Konzentration höher  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  schwächte die Rotfärbung ab. Hier wurden zunächst alle Bindestellen der DAs durch CRP abgesättigt, sobald beide Komponenten aufeinander trafen. Die übrigen ungebundenen CRP-Moleküle haben dann, ohne an einen DA gebunden zu sein, an die FAs in der Testzone gebunden. Da die freien CRP-Moleküle auf Grund ihrer Größe schneller über die Membran wandern als die CRP-Moleküle, die bereits an AuNP-05 gebunden sind, besetzten diese freien CRP-Moleküle die freien FAs ohne ein rotes Markierungssignal zu erzeugen. Die FAs in der Testzone besaßen somit nur noch teilweise freie Bindungsstellen, mit welchen CRP-AuNP-05 gebunden werden konnte, weshalb mehr CRP-AuNP-05 weiter bis zum *Absorbent Pad* migrierte. Je höher die CRP-Konzentration ist, desto mehr freie CRP-Moleküle konnten vorweg an die FAs binden, wodurch die Intensität des Testpunktes weiter abgenommen hat. Dies bedeutet, dass durch die Intensität der Testzone nicht auf die Analytkonzentration geschlossen werden kann, da eine niedrige CRP-Konzentration zu einem gleich starken Signal in der Testzone wie eine sehr hohe CRP-Konzentration führen kann (Abbildung 4-13). Somit kann ein falsch negatives Ergebnis entstehen. Dieses Phänomen wird *high-dose hook-effect* genannt (Abbildung 4-22).<sup>153-155</sup>

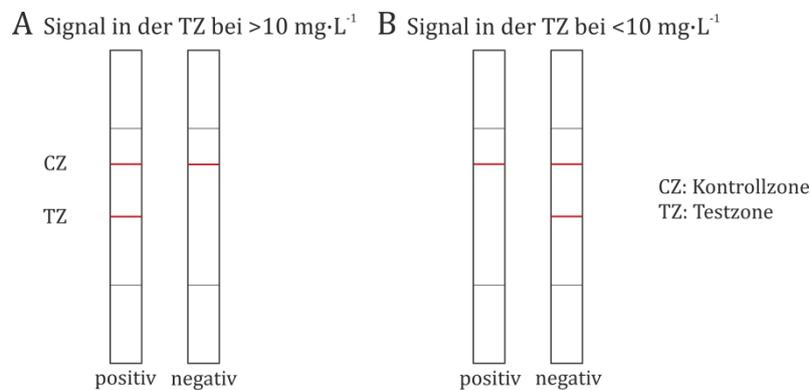


**Abbildung 4-22:** Schematische Darstellung der Auswirkung des *high-dose hook-effects*. Eine deutlich erhöhte Konzentration an CRP führt durch Übersättigung der Antikörper zu dem gleichen Signal wie eine niedrigere CRP-Konzentration (Abbildung modifiziert nach Schiettecatte et al.<sup>156</sup>).

Demnach schwächt das Signal bei hohen Antigenkonzentrationen wieder ab, da alle DAs bereits an Antigene gebunden haben und Antigene ohne gebundenen DA ebenfalls an die FAs binden können. Die zuletzt genannte Bindung erzeugt jedoch kein farbliches Signal, wodurch die Intensität in der Testzone abnimmt. Der *high-dose hook-effect* ist in dem Bereich der

Immunoassays sowie bei LFAs weit verbreitet und sollte bei der weiteren Assay-Entwicklung bedacht werden.

Der hier entwickelte LFA sollte jedoch nicht das generelle Vorhandensein von CRP in der Patientenprobe anzeigen, sondern ein Testergebnis ab einem bestimmten *cut-off*. Diese Nachweisgrenze liegt wie in 4.2.3.2 beschrieben bei  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Da der in Abbildung 4-21 dargestellte LFA jedoch sehr sensitiv ist (auswertbare Rotfärbung bereits deutlich unterhalb von  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP), wurde eine zusätzliche Strategie entwickelt, bei der die hohe Sensitivität des entwickelten LFAs ausgenutzt wird. Bei dieser Strategie soll das Testergebnis genau andersherum angezeigt werden. Liegt eine CRP-Konzentration unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  vor, soll in der Testzone eine auswertbare Rotfärbung vorliegen. Weist die Probe eine CRP-Konzentration über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf, wird kein rotes Signal in der Testzone gebildet (Abbildung 4-23).



**Abbildung 4-23: Schematische Darstellung eines LFAs mit positivem und negativem Signal. A) Bei einer CRP-Konzentration über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bedeutet ein positives Ergebnis eine Rotfärbung der Test- und Kontrollzone. Bei einem negativen Ergebnis erscheint lediglich die Kontrollzone. B) Bei einer CRP-Konzentration unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bedeutet ein negatives Ergebnis eine Rotfärbung der Test- und Kontrollzone. Bei einem positiven Ergebnis erscheint lediglich die Kontrollzone.**

#### Rotfärbung in der TZ bei CRP-Konzentration $< 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Zum Erhalt einer Rotfärbung in der TZ bei einer CRP-Konzentration unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sollte unter anderem das Verhältnis aus den Konzentrationen von FAs und DAs sowie CRP so abgestimmt sein, dass die Antikörper ab einer CRP-Konzentration von über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mit freien CRP-Molekülen abgesättigt sind und somit kein Sandwich-Komplex aufgebaut werden kann. Dies bedeutet, dass in der Testzone für ein positives Ergebnis kein oder nur ein schwacher roter Punkt entsteht (Abbildung 4-24). Die Kurve aus Abbildung 4-22 sollte dementsprechend auf der X-Achse nach links verschoben werden.

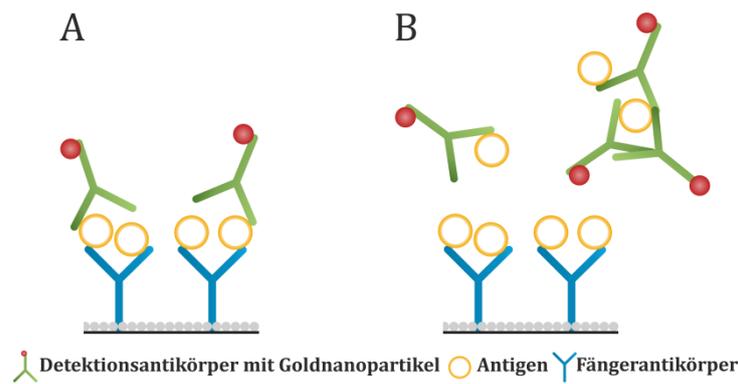


Abbildung 4-24: Schematische Darstellung eines Sandwich-Formats in der Testzone (TZ) bei Konzentration unter (A) und über (B)  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP. A) Bei CRP-Konzentrationen unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  binden sowohl Fänger- und Detektionsantikörper an das Antigen und erzeugen somit ein Signal auf der TZ. B) Bei CRP-Konzentrationen über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  binden führt die hohe Antigen-Konzentration dazu, dass sowohl die Fänger- als auch die Detektionsantikörper mit Antigenmolekülen abgesättigt sind und somit keinen Sandwich sowie Signal ausbilden können.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde neben FA-39 FA-30 eingesetzt, die Konzentration der FAs auf der Membran reduziert und die Konzentration der Antikörper auf dem Konjugat heruntersetzt. In Tabelle 4-2 sind die Änderungen der FA und des Konjugats zum vorherigen LFA-Aufbau in fett markiert sowie das Ergebnis und die daraus resultierende Problematik zusammengefasst. Die dazugehörigen LFA-Streifen sind im Anhang in Abbildung 7-4 und Abbildung 7-5 dargestellt.

Tabelle 4-2: Optimierung der Konzentration der Fängerantikörper sowie Konjugate. In der ersten Zeile sind Ausgangsbedingungen aufgelistet, Änderungen zum vorigen LFA sind in fett markiert.

| Fängerantikörper<br>(Menge & Konzentration)  | Konjugat<br>(Konzentration & Menge)  | Maximale Rotfärbung in TZ               | Verbleibende Problematik  |
|--|--|---|---|
| 39<br>(0,3 $\mu\text{L}$ , 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )                            | AuNP-05<br>(5,22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 1 $\mu\text{L}$ )                            | • 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP  | • <i>Hook-effect</i><br>• Rotfärbung in TZ $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP |
| <b>30</b><br>(0,3 $\mu\text{L}$ , 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )                     | AuNP-05<br><b>(1:10, 1 <math>\mu\text{L}</math>)</b>   | • 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP   | • Rotfärbung in TZ $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP                         |
| <b>30</b><br>(0,3 $\mu\text{L}$ , <b>0,1 <math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b> ) | AuNP-05<br><b>(1:10, 1 <math>\mu\text{L}</math>)</b>   | • 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP | • 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nur schwer erkennbar                            |
| <b>30</b><br>(0,3 $\mu\text{L}$ , <b>0,1 <math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b> ) | AuNP-05<br><b>(0,87 <math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>, 1 <math>\mu\text{L}</math>)</b> | • 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP   | • Rotfärbung in TZ $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP                         |
| 39<br>(0,3 $\mu\text{L}$ , <b>0,2 <math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b> )        | AuNP-05<br>(1 $\mu\text{L}$ )  | • 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP  | • Rotfärbung in TZ $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP                         |
| 39<br>(0,3 $\mu\text{L}$ , <b>0,5 <math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b> )        | AuNP-05<br><b>(1,74 <math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>, 1 <math>\mu\text{L}</math>)</b> | • 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP  | • Rotfärbung in TZ $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP                         |
| 39<br>(0,3 $\mu\text{L}$ , <b>0,2 <math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b> )        | AuNP-05<br><b>(0,87 <math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>, 1 <math>\mu\text{L}</math>)</b> | • 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRP   | • <i>Cut-off</i> liegt zwischen 1 und 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$            |

Der Einsatz von FA-30 sowie das Herabsetzen der Antikörperkonzentration im Konjugat führten dazu, dass sich die maximale Rotfärbung in der TZ zu den LFAs mit niedriger CRP-Konzentration im Laufpuffer verschoben hat. Trotzdem konnte die Rotfärbung bei CRP-Konzentrationen über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  im Laufpuffer nicht eliminiert werden. Dass weniger Antikörper auf der Oberfläche der Goldnanopartikel zu einem sensitiveren Ergebnis führen können, stellten auch Byzova et al. fest.<sup>157</sup> Dies könnte unter Umständen dadurch bedingt sein, dass bei Präsenz nur weniger Antikörpermoleküle auf einem AuNP die gegenseitige sterische Behinderung geringer ausgeprägt ist und dadurch mehr Bindungskapazität gegenüber dem Zielmolekül dargeboten wird. Bei den Optimierungsschritten konnte die maximale Rotfärbung in der TZ verschoben werden, sodass LFAs mit niedrigeren CRP-Konzentrationen im Laufpuffer besser sichtbar waren, allerdings konnte die exakte Nachweisgrenze von  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nicht erreicht werden. Daher wurde im Folgenden das Standardverfahren für LFAs optimiert, um nur bei CRP-Konzentrationen über  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  eine Rotfärbung zu erzeugen.

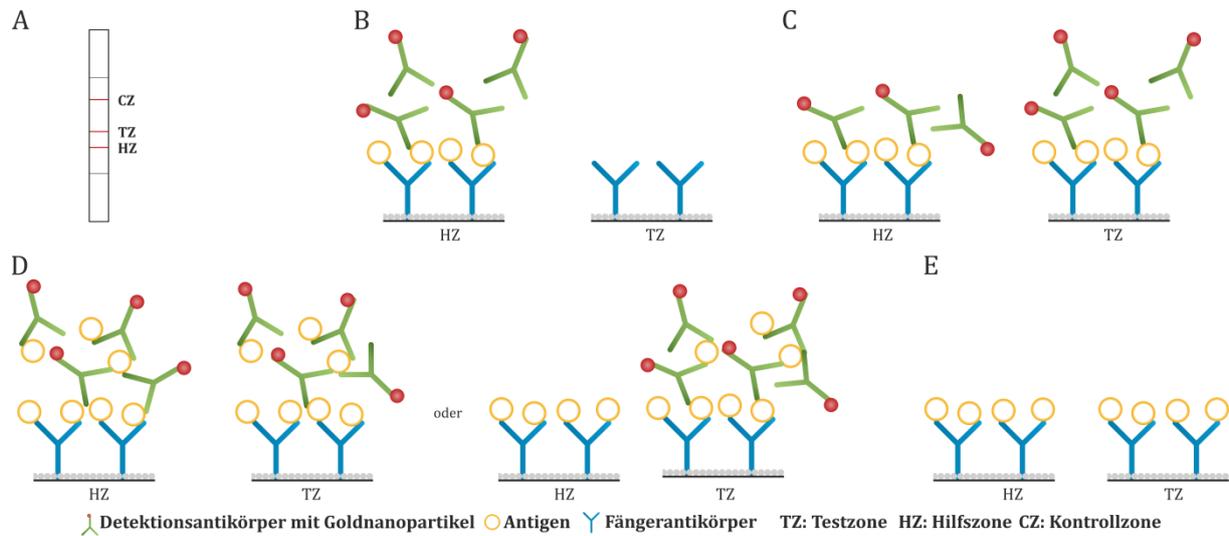
#### Rotfärbung in der TZ bei CRP-Konzentration über $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

In einem zweiten Ansatz wurde versucht einen LFA zu generieren, der, wie bei gängigen LFAs üblich, einen roten Punkt in der Testzone anzeigt, sobald der Patient eine erhöhte Biomarker-Konzentration aufweist, was bedeutet, dass in diesem Fall eine CRP-Konzentration über  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  vorlag.

Um einen roten Punkt bei einer niedrigen CRP-Konzentration zu verhindern, wurde eine ‚versteckte‘ Hilfslinie in der Hilfszone (HZ) eingeführt und der Punkt der Testzone auf mehrere Punkte nebeneinander ausgeweitet, um eine Art Linie zu erzeugen (Abbildung 4-25A). Die versteckte Hilfslinie soll vor der eigentlichen, für den Anwender sichtbaren Testlinie (TZ) schon eine gewisse Menge CRP abfangen (Abbildung 4-25B), sodass in der TZ bei niedrigen CRP-Konzentrationen kein Signal entsteht.

Wird die Konzentration des Antigens erhöht, so kommt es zusätzlich zu einer Rotfärbung in der Testzone (Abbildung 4-25C). Bei weiterer Erhöhung der CRP-Konzentration liegen mehr Antigenmoleküle vor, als es Bindestellen an DAs gibt. Deshalb können freie Antigene ebenfalls direkt an die FAs der Hilfs- und Testzone binden. Dies führt entweder dazu, dass beide Zonen etwas weniger intensiv rot erscheinen oder, dass die Antigene aufgrund ihrer geringeren Größe schneller die Membran entlangwandern und vermehrt an der ersten, versteckten Hilfslinie binden, sodass diese gar nicht bis schwach ausgebildet wird (Abbildung 4-25D). Erst bei einer sehr hohen Antigen-Konzentration binden nur noch freie Antigene an beide HZ und TZ (Abbildung

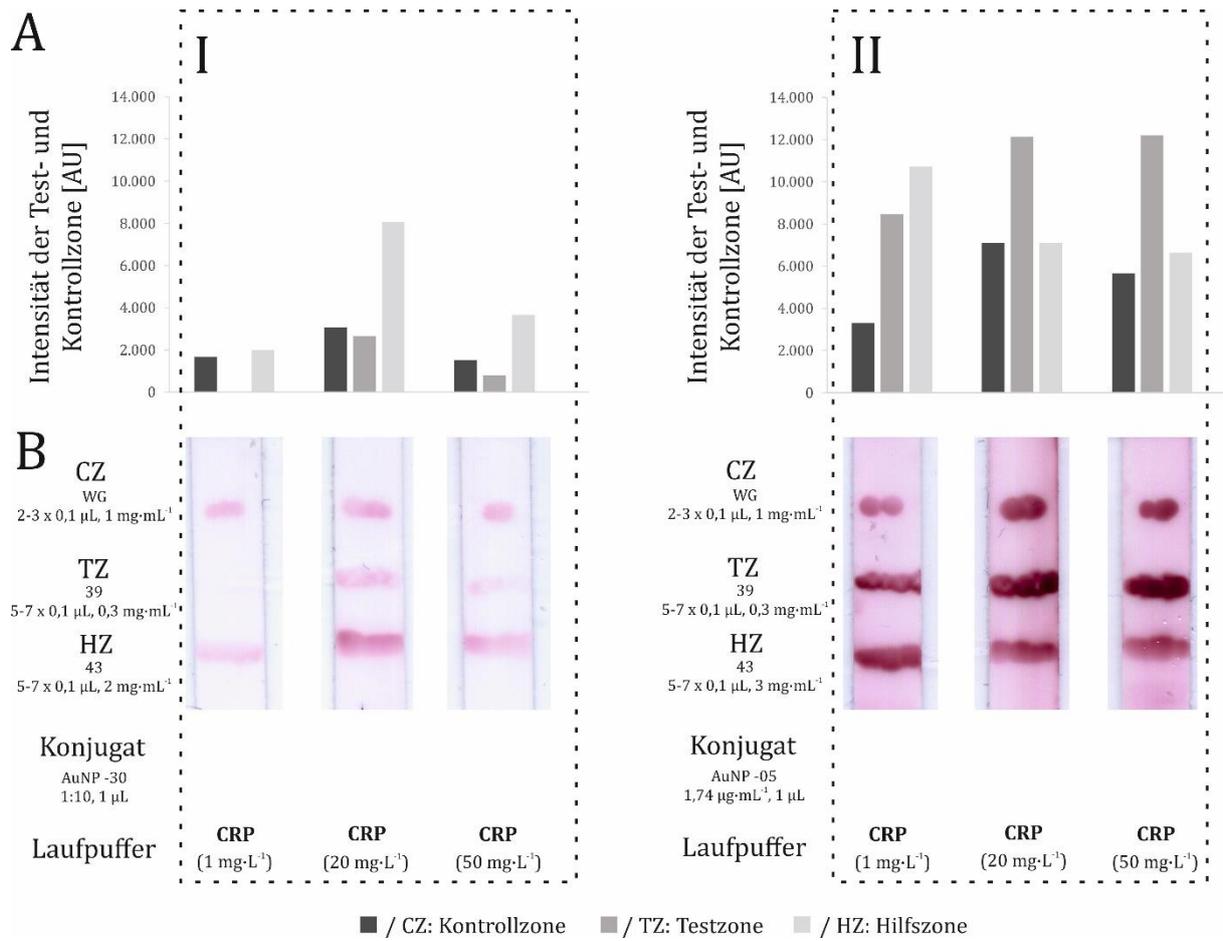
4-25E). Jedoch beeinflussen diesen Vorgang viele verschiedene Faktoren wie z.B. die jeweiligen Konzentrationen der Antikörper und der AuNP sowie deren Konzentration zueinander.



**Abbildung 4-25: Schematische Darstellung einer zusätzlichen Hilfszone (HZ) und ihres Einflusses. A) Aufbau des LFAs mit Hilfszone, Testzone (TZ) und Kontrollzone (CZ), B) niedrige Antigen-Konzentration, C) mittlere Antigen-Konzentration, D) hohe Antigen-Konzentration, E) sehr hohe Antigen Konzentrationen.**

Dafür wurden auf der HZ zwei verschiedene Konzentrationen FA-43 aufgetragen ( $2$  bzw.  $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und AuNP-30 ( $10$ -fach verdünnt, Abbildung 4-26I) bzw. AuNP-05 ( $1,74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Abbildung 4-26II) verwendet. Die Bedingungen der TZ sind gleich geblieben (FA-39,  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Abbildung 4-26B). In allen Zonen wurden mehrere Einzelpunkte direkt nebeneinander aufgetragen.

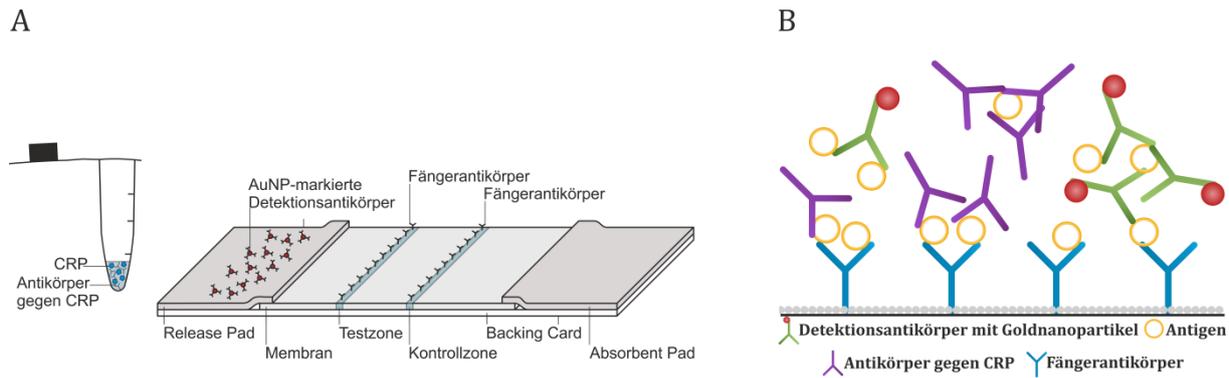
Aufgrund der verschiedenen Bedingungen sind die LFAs nur bedingt miteinander vergleichbar. In I ist gut erkennbar, dass bei  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP dieses durch die HZ abgefangen wurde und somit für den Anwender keine Rotfärbung sichtbar ist. Bei  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sind sowohl die TZ als auch die HZ sichtbar, wobei die Linie in der Testzone bei  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  deutlich schwächer ist. Hier hat wahrscheinlich ebenfalls ungebundenes CRP an die FAs gebunden. Bei den verwendeten Bedingungen in II hingegen stellt bereits  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  eine zu hohe Konzentration dar, sodass sowohl auf der HZ als auch auf der TZ ein Signal sichtbar wurde. Beim Anstieg der CRP-Konzentration ändert sich die Verteilung der Intensitäten der Linie in der Testzone. Hier ist die HZ etwas weniger rot als die TZ, wie in Abbildung 4-25D beschrieben.



**Abbildung 4-26:** LFAs (B) mit einer Test- (TZ) und einer Hilfs- (HZ)zone (B) sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100 µL CRP (1 mg·L<sup>-1</sup>), 100 µL CRP (20 mg·L<sup>-1</sup>), 100 µL CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) inkubiert wurden. I: Es wurde 1 µL AuNP-30 (1:10 verdünnt) auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 2 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-30 (2-3 x 0,1 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. II: Es wurde 1 µL AuNP-05 (1,74 µg·mL<sup>-1</sup>) auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (2-3 x 0,1 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet.

Mit diesem Verfahren lässt sich zwar die Testlinie bis zu einer bestimmten Konzentration eliminieren, jedoch tritt auch hier der *high dose hook-effect* auf (Abbildung 4-26I, 50 mg·mL<sup>-1</sup>). Dadurch ist nicht mehr zu unterscheiden, ob eine niedrige oder eine hohe CRP-Konzentration in der Patientenprobe vorliegt. Da der CRP-Wert bei Erkrankten um das Vielfache von 10 mg·mL<sup>-1</sup> steigen kann, ist dies aber ein elementarer Faktor. Zusätzlich bedarf es großem Fingerspitzengefühl die genauen Konzentrationen an Antikörpern zu verwenden, um mit diesem Verfahren den *cut-off* von 10 mg·mL<sup>-1</sup> zu erreichen.

Eine weitere Versuchsänderung, um eine Testlinie erst ab 10 mg·mL<sup>-1</sup> zu erzielen, bestand in einer 15-minütigen Vorinkubation des Antigens mit einem CRP-spezifischen Antikörper ohne AuNP-Markierung, bevor die Probe auf das *Release Pad* aufgetragen wurde (Abbildung 4-27A).



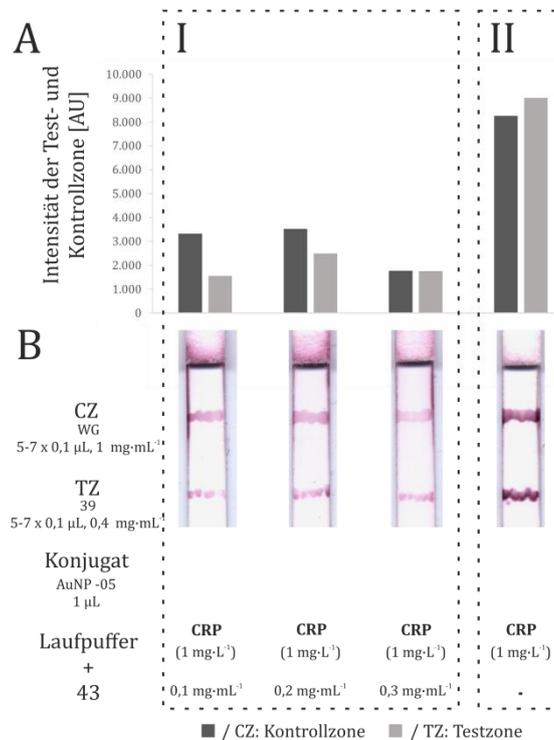
**Abbildung 4-27: Strategie zur Herabsetzung der Intensität der Testzone durch Verwendung eines weiteren nicht-markierten Detektionsantikörpers. A) Schematische Darstellung eines LFAs, bei dem die Probenflüssigkeit vorweg mit CRP-spezifischen Antikörpern inkubiert wird. B) Schematische Darstellung der Bindung des markierten sowie des nicht-markierten Detektionsantikörpers an CRP und Fängerantikörper.**

Dabei haben CRP und der CRP-spezifische, unmarkierte Antikörper in einem separaten Reaktionsgefäß Zeit eine Bindung einzugehen. Wird die vorinkubierte Probe auf den LFA gegeben, trifft sie zunächst auf das Konjugat. Hier kann der DA nur noch an CRP-Epitope binden, die nicht bereits während der Vorinkubation von einem anderen Antikörper besetzt wurden. Passiert die Probenflüssigkeit anschließend die Testzone, gibt es mehrere Komplex-Kombinationen, die an den FA binden können. Wie zuvor kann der Komplex aus CRP und AuNP-DA binden. Als Pentamer weist CRP mindestens fünf Mal das gleiche Epitop auf, wodurch wahrscheinlich mehr als ein Antikörper der gleichen Art an CRP binden kann. So kann es sein, dass ein CRP-Molekül durch mehrere AuNP-DAs sichtbar gemacht wird. Allerdings kann ein CRP-Molekül vorweg auch schon ein oder mehrere nicht-markierte Antikörper gebunden haben, wodurch weniger bis keine AuNP-DAs an dieses CRP mehr binden können. Dies führt zu einer weniger intensiven Rotfärbung oder gar dem Ausbleiben eines Punktes in der Testzone (Abbildung 4-27B).

In Abbildung 4-28 wurden die Laufproben mit CRP und verschiedenen Konzentrationen an Antikörper 43 ( $0,1-0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) für 15 Minuten vor der LFA-Durchführung in einem separaten Reaktionsgefäß inkubiert. Zum Vergleich wurde ein LFA durchgeführt, bei dem die Probe nicht vorinkubiert wurde (Abbildung 4-28II). Als Laufpuffer wurde zunächst eine CRP-Konzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  verwendet. Diese sollte ermöglichen eine niedrige Antikörperzugabe bei der Vorinkubation zu verwenden und dennoch bereits Unterschiede durch die neue Probenvorbereitung sehen zu können.

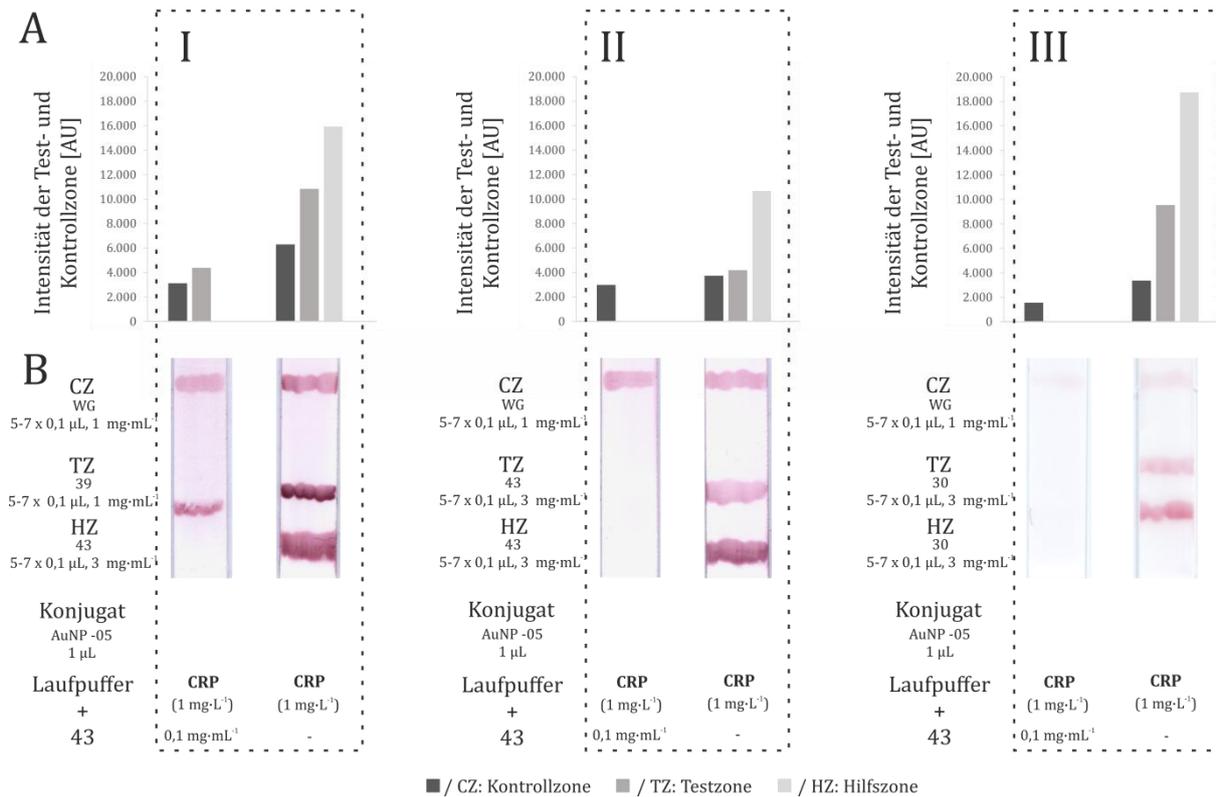
Dabei ist sowohl in der Testzone, als auch im dazugehörigen Diagramm zu sehen, dass die Vorinkubation im Vergleich zu einem normal durchgeführten LFA (Abbildung 4-28II) in der Testzone zu einer gewünschten Verminderung der Rotfärbung führt. Dabei scheint die Konzentration des CRP-spezifischen Antikörpers während der Vorinkubation keine große Auswirkung zu haben, da hier bei den Testlinien mit dem bloßen Auge kein Unterschied sichtbar war und die Signalunterschiede bei der grafischen Auswertung auch nur gering waren. Ergänzend

zu der schwächeren Testzone war eine vermehrte Anhäufung der Konjugate im *Absorbent Pad* zu erkennen, da weniger Konjugate in der Testzone gebunden haben.



**Abbildung 4-28:** LFAs (B) unter Verwendung einer Vorinkubation mit einem zusätzlichen CRP-spezifischen Antikörper. Laufpuffer (CRP, 1 mg·L<sup>-1</sup>) wurde vorweg 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen (0,1-0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) des CRP-spezifischen Antikörpers 43 inkubiert. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (hellgrau) und Kontrollzone (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,4 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. I: Proben wurden mit CRP-spezifischem Antikörper vorinkubiert. II: Probe wurde nicht vorinkubiert.

Da beide Verfahren zu einer abgeschwächten Testlinie geführt haben, jedoch noch nicht den *cut-off* von 10 mg·L<sup>-1</sup> erreicht haben, wurden anschließend die beiden Methoden, ‚versteckte‘ Hilfslinie und Vorinkubation mit einem CRP-spezifischen Antikörper, kombiniert. Für die Vorinkubation wurde Antikörper 43 mit 0,1 mg·mL<sup>-1</sup> gewählt, da der Versuch in Abbildung 4-26 gezeigt hat, dass eine höhere Konzentration an Antikörper 43 die Rotfärbung in der Testzone nicht weiter abschwächt. Zum Vergleich wurde jeweils ein LFA mit den gleichen Bedingungen erstellt, aber ohne Vorinkubation durchgeführt (Kontroll-LFA). Für die TZ und HZ wurden unterschiedliche Antikörper in verschiedenen Konzentrationen verwendet (Abbildung 4-29).

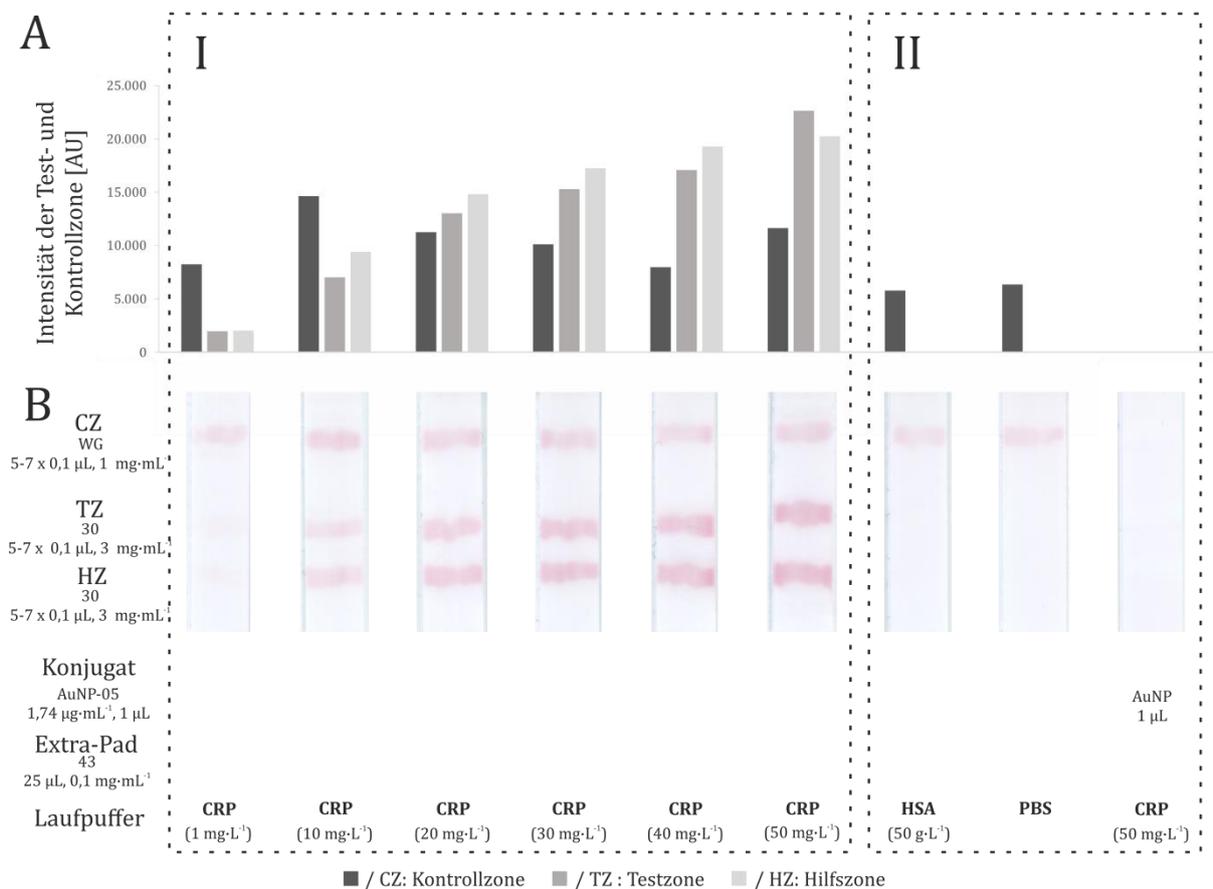


**Abbildung 4-29:** LFAs (B) mit einer zusätzlichen versteckten Hilfszone (HZ) und nach Vorinkubation der CRP-Probenflüssigkeit mit einem CRP-spezifischen Antikörper für 15 Minuten. Es wurden unterschiedliche Antikörpern in variierenden Konzentrationen in der Testzone (TZ) sowie der Hilfszone (HZ) verwendet. Menge und Zusammensetzung des Konjugates auf dem *Release Pad* blieben gleich (1 µL AuNP-05). Jeweils der rechte Streifen dient als Kontroll-LFA ohne Vorinkubation. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. I: Es wurde Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. II: Es wurde Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. III: Es wurde Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet.

Bei allen drei LFA-Paaren ist ein Unterschied durch die Anwendung der Vorinkubation mit bloßem Auge (B) sowie durch die grafische Auswertung mittels ImageJ (A) deutlich sichtbar. In Abbildung 4-29I ist eine rote Linie in TZ klar erkennbar, wenn auch deutlich schwächer als bei dem zugehörigen Kontroll-LFA. Eine Linie in der HZ ist, im Gegensatz zur Kontrolle, jedoch nicht vorhanden. Bei einer Erhöhung der FA-Konzentration und einem Wechsel des FAs findet weder eine Ausbildung von TZ noch von HZ statt (II & III). Dass bei I eine Linie in TZ vorhanden ist, in II und III aber nicht, kann auf der einen Seite damit zusammenhängen, dass bei II und III eine dreifach so hohe Konzentration an FAs für TZ verwendet wurde. Außerdem binden die in den unterschiedlichen Testaufbauten I, II und III verwendeten Antikörper FA-30, FA-39 und FA-43 wahrscheinlich auch an verschiedene Epitope des CRPs. Die Epitope des FA-43 sind jedoch bereits besetzt, da dieser Antikörper zur Vorinkubation verwendet wurde. Eine weitere Bindung von FA-30 und FA-43 in den hier verwendeten Konzentrationen wird dadurch sterisch behindert. Die

Bindung von FA-43 während der Vorinkubation scheint keine weitere Auswirkung auf die Bindung von FA-39 auf dem LFA zu haben. Um zu überprüfen, ob sich bei steigender CRP-Konzentration eine Linie in TZ und/oder HZ ausbildet, wurde mit den Bedingungen aus III (TZ und HZ: FA-30, 3 mg·L<sup>-1</sup>) weitergearbeitet.

Dabei wurde zunächst getestet, ob die Vorinkubation mit dem CRP-spezifischen Antikörper auch direkt auf dem LFA funktioniert. Dazu wurde ein zusätzliches Extra-Pad vor dem Versuchslauf mit den Antikörpern beschichtet und direkt verwendet oder zunächst über Nacht getrocknet. Das Ergebnis war dem der Vorinkubation in einem separaten Reaktionsgefäß übereinstimmend. Das Volumen für das Extra-Pad wurde angepasst und zusätzlich das Konjugat optimiert, indem bei der Herstellung eine geringere Menge DA verwendet wurde. Um der späteren Praxis näher zu kommen, wurden die Extra-Pads mit den CRP-spezifischen Antikörpern über Nacht getrocknet und auf das *Release Pad* des LFAs gelegt. Mit den nun geänderten Parametern wurde eine CRP-Konzentrationsreihe auf den LFAs untersucht (Abbildung 4-30).



**Abbildung 4-30:** LFAs (B) mit einer Testzone (TZ) und einer Hilfszone (HZ), verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer und einem Extra-Pad mit dem CRP-spezifischen Antikörper 43. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Säulendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 (1,74 µg·mL<sup>-1</sup>) auf dem *Release Pad*, Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und HZ und Antikörper WG als FA-für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: CRP-Proben (1 – 50 mg·L<sup>-1</sup>). II: Kontrollen: HSA (50 g·L<sup>-1</sup>), PBS und CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) mit reinen AuNPs.

Es ist zu erkennen, dass bei einer CRP-Konzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  weder eine eindeutige TZ noch HZ zu sehen ist. Ab einer CRP-Konzentration von  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  werden die Rotfärbungen in der TZ und HZ intensiver. Dies ist sowohl mit dem bloßen Auge (B) als auch bei der grafischen Auswertung mit ImageJ (A) ersichtlich. In Abbildung 4-30A ist zu erkennen, dass die Intensität der HZ ab  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  jeweils ca. 2000 AU stärker ist als die TZ. Dies bedeutet, dass die HZ schon einen Großteil des CRPs abfängt, bevor die Probe die TZ erreicht. Zur Kontrolle wurde, wie bereits in Kapitel 4.2.3.2, HSA verwendet. Auch hier erscheint nur eine Linie in der Kontrollzone. Dies bedeutet, dass der Test funktional ist, HSA jedoch nicht bindet und detektiert wird. Zusätzlich wurde reiner Probenpuffer auf einen LFA aufgetragen, um auch hier eine mögliche Kreuzreaktion ausschließen zu können. Auch hier entsteht keine Rotfärbung in der TZ. Um sicher zu stellen, dass die nackten AuNPs keine Bindung zur Membran oder den FAs eingehen, wurde zusätzlich ein LFA mit  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP durchgeführt, bei dem jedoch anstelle des Konjugats reine AuNP verwendet wurden. Da keine Linie erschien, wurde dieses bewiesen. Somit wurde erfolgreich ein LFA zur Detektion von erhöhten CRP-Konzentrationen (positiver LFA für CRP-Konzentrationen  $>10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , negativer LFA für CRP-Konzentrationen  $<10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) etabliert.

#### 4.2.3.4 Fazit

Ziel dieser Arbeit ist es ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay (LFA)-System zu entwickeln, das eine Abstoßungsreaktion nach vorangegangener Nierentransplantation detektiert. Dazu wurde in diesem Teil der Arbeit ein LFA zur Detektion von CRP, das infolge einer im Körper stattfindenden Entzündungsreaktion eine erhöhte Konzentration aufweist, entwickelt.

Bei der Ermittlung CRP-spezifischer Antikörper im Microarray hat sich in den getesteten Kombinationen die Variante FA-43/DA-39\* als bestes Pärchen erwiesen. Im LFA zeigte sich jedoch, dass andere Pärchen bessere Testergebnisse erzielten. Daher ist das Microarray-Screening nur als grobes Modell zu betrachten. Zusätzlich kann es bei der LFA-Entwicklung zum sogenannten *hook effect* kommen. Durch den *hook-effect* könnte erklärt werden, warum es bei einer niedrigen wie auch bei einer hohen Konzentration zu einem gleich intensiven Signal (= roter Punkt) auf der Testzone kommt, die beim Ablesen des Ergebnisses zu Fehlinterpretationen führen kann. Daher wurden in Folge nun zwei verschiedene Testsysteme aufgebaut und verfolgt. Beim ersten Testaufbau sollte eine Rotfärbung sowohl in der Test- als auch der Kontrollzone angezeigt werden, wenn die CRP-Konzentration der Probe unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  lag. Dieser Ansatz war jedoch nicht erfolgreich, da nicht die nötige Nachweisgrenze realisiert werden konnte. Bei dem zweiten Testaufbau hingegen sollte eine Rotfärbung in der Testzone angezeigt werden, wenn die CRP-Konzentration des Laufpuffers über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  lag. Durch eine zusätzlich eingeführte Hilfszone und Vorinkubation der Probenflüssigkeit mit einem weiteren CRP-spezifischen Antikörper konnte die Ausbildung der Rotfärbung in der Testzone positiv beeinflusst werden. Ein LFA zum Nachweis

eines pathologisch erhöhten CRP-Levels mit einer "Ja" ( $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), "Nein"-Antwort ( $< 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) konnte hierdurch erfolgreich entwickelt werden. Zur finalen Testcharakterisierung müssen noch einige weitere Untersuchungen durchgeführt werden (verschiedene CRP-Konzentrationen zwischen 1 und  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sowie eine Validierung anhand von Patientenproben) um den genauen Detektionsbereich eingrenzen und den LFA reproduzierbar herstellen zu können.

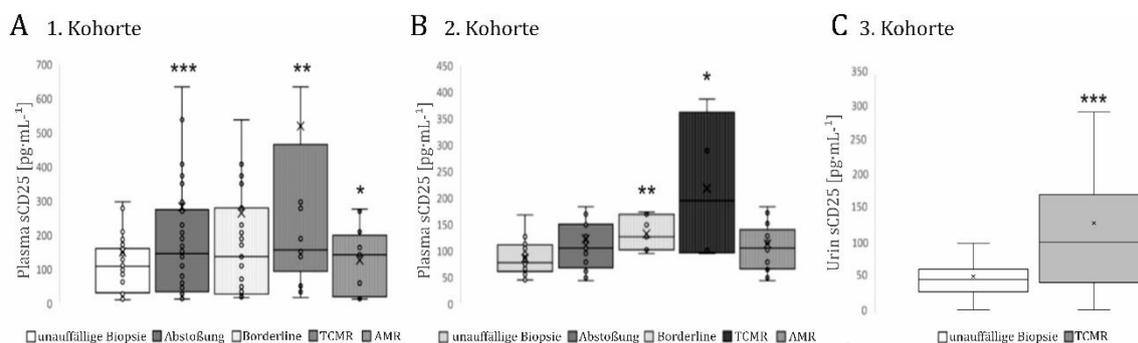
### **4.3 sCD25**

Als ein weiteres Protein zur Früherkennung einer Nierenabstoßung wurde sCD25 gewählt. CD25 (IL-2R $\alpha$ ) ist eine Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R), welcher auf T-Zellen ausgebildet werden kann. Die lösliche Form von CD25 (sCD25) ist proportional zur Expression von CD25 auf der Zelloberfläche. Der überwiegende Teil dieses Kapitels wurde zur Veröffentlichung mit dem Titel "A New Lateral Flow Assay to Detect sIL-2R During T-cell Mediated Rejection after Kidney Transplantation" eingereicht.<sup>138</sup> Zunächst wurde die Eignung von sCD25 als Biomarker einer Nierenabstoßung sowie die für den Nachweis einer Abstoßung relevante sCD25-Konzentration bestimmt (Kapitel 4.3.1). Anschließend erfolgte ein Antikörper-Screening mittels Microarrays, um ein geeignetes Antikörper-Pärchen auszuwählen (Kapitel 4.3.2) und darauf aufbauend wurde der LFA entwickelt und optimiert (Kapitel 4.3.3).

#### **4.3.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration**

Zur Überprüfung, ob sCD25 auch als Biomarker für eine Nierenabstoßung geeignet ist, wurden in der Transplantationsambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover in drei unabhängigen Kohorten Urin- und Plasmaproben von Nierentransplantatempfängern, die eine Biopsie-Diagnose nach der BANFF-Klassifikation erhalten haben, gesammelt. Somit wurden die Proben nach BANFF in T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR), Borderline-Abstoßung (Borderline), Antikörper-vermittelten Abstoßung (AMR) und Normal (Patienten mit einer unauffälligen Biopsie, erfüllen keine der BANFF-Kriterien für eine Abstoßung) klassifiziert. Die erste Patientenkohorte wurde in einem IFB-TX-Projekt (Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum für Transplantation, BMBF-Exzellenzcluster unter Führung von Prof. Dr. med. Hermann Haller, bis 2012) von Prof. Dr. med. Blume zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christine Falk des Institutes für Transplantationsimmunologie der Medizinischen Hochschule Hannover analysiert. Die Patientenproben der zweiten Kohorte wurden als Teil des EFRE-Projektes "Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik" mittels Protein-Multiplex-Analyse (Biorad) im Institut für Technische Chemie analysiert, während auch die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Die dritte Kohorte wurde mittels ELISA als Teil der vorliegenden Arbeit analysiert. Dabei wurde die sCD25-Konzentration in den Proben ermittelt. Eine signifikante Assoziation zwischen Proben von Patienten mit einer diagnostizierten T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR) und dem

Biomarker sCD25 konnte mittels Mann-Whitney-U-Test in Urin- und Plasmaproben gezeigt werden.



**Abbildung 4-31: Boxplots der sCD25-Konzentrationen in Urin- und Plasmaproben.** A: 1. Kohorte, Plasmaproben; B: 2. Kohorte, Plasmaproben; C: 3. Kohorte, Urinproben von 112 (A), 71 (B) und 61 (C) Nierentransplantatempfängern. Analysiert mit *Protein-Multiplex-Assay (Biorad, A und B)* und ELISA (C, als Teil der vorliegenden Arbeit). Sterne zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Patienten mit einer unauffälligen Biopsie an (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , gemäß Mann-Whitney-U-Test). TCMR=T-zellvermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).

In Abbildung 4-31 sind die Signifikanz der verschiedenen Abstoßungsarten und Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie mit einem Stern dargestellt. In allen 3 Kohorten konnte zwischen Patienten mit einer TCMR und Patienten ohne Transplantatabstoßung ein signifikanter Unterschied bei den sCD25-Konzentrationen festgestellt werden. In Tabelle 4-3 sind die zu den Boxplots gehörenden Mittelwerte der sCD25-Konzentrationen sowie die Anzahl der jeweils verwendeten Urin- und Plasmaproben der Patienten mit einer TCMR und der Patienten mit einer unauffälligen Biopsie zusammengestellt. Zusätzlich wurde der Mittelwert der TCMRs und der Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (jeweils Urin und Plasma) berechnet und wird in dieser Arbeit als Richtwert bei der LFA-Entwicklung verwendet.

**Tabelle 4-3: Verteilung der Abstoßungsarten der Urin- und Plasmaproben aus Abbildung 4-31 für die Bestimmung der sCD25-Konzentration. N: Anzahl analysierter Proben.**

|   | 1. Kohorte            | 2. Kohorte           | 3. Kohorte            | Richtwert für die LFA-Entwicklung |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| <b>Mittelwert TCMR, Urin [pg·mL<sup>-1</sup>]</b>                   | -                     | 158,9 ± 218,7<br>N=7 | 124,3 ± 103,3<br>N=35 | 141                               |
| <b>Mittelwert unauffällige Biopsie, Urin [pg·mL<sup>-1</sup>]</b>   | -                     | 92,1 ± 24,7<br>N=35  | 48,9 ± 35,5<br>N=26   | 71                                |
| <b>Mittelwert TCMR, Plasma [pg·mL<sup>-1</sup>]</b>                 | 595,6 ± 817,4<br>N=13 | 217 ± 124,9<br>N=7   | -                     | 406                               |
| <b>Mittelwert unauffällige Biopsie, Plasma [pg·mL<sup>-1</sup>]</b> | 149,7 ± 324,6<br>N=52 | 76,5 ± 35,4<br>N=37  | -                     | 113                               |

Die hohe Signifikanz der sCD25-Konzentration zwischen Proben von Patienten mit einer TCMR und Patienten mit einer unauffälligen Biopsie macht sCD25 zu einem wichtigen Biomarker zur nicht-invasiven Früherkennung einer Nierenabstoßung. Aus diesem Grund soll ein LFA entwickelt werden, der innerhalb weniger Minuten den Nachweis eines erhöhten sCD25-Levels mit einer "Ja" (Nierenabstoßung liegt vor) oder "Nein"-Antwort (Nierenabstoßung liegt nicht vor) anzeigt. Um einen LFA zur sCD25-Detektion und somit Differenzierung zwischen Proben von Patienten mit einer TCMR und Patienten mit einer unauffälligen Biopsie zu entwickeln, wurden die Antikörper zunächst mittels Microarray untersucht.

#### **4.3.2 Bindungsstudien mittels Microarray**

Für die Herstellung eines LFAs, der sCD25 in Serum oder Urinproben anzeigen soll, wurden im Microarray-Format zunächst drei sCD25-spezifische Antikörper (MAB, AF und ABX) im Forward-Format untersucht (Kapitel 4.2.2.1). Bei dem Sandwich-Format wurde dann ein weiterer sCD25-spezifischer Antikörper (BAF) mit untersucht (Kapitel 4.3.2.2). Proteine, die für die Versuche mit einem Fluoreszenzmolekül markiert wurden, sind im Folgenden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

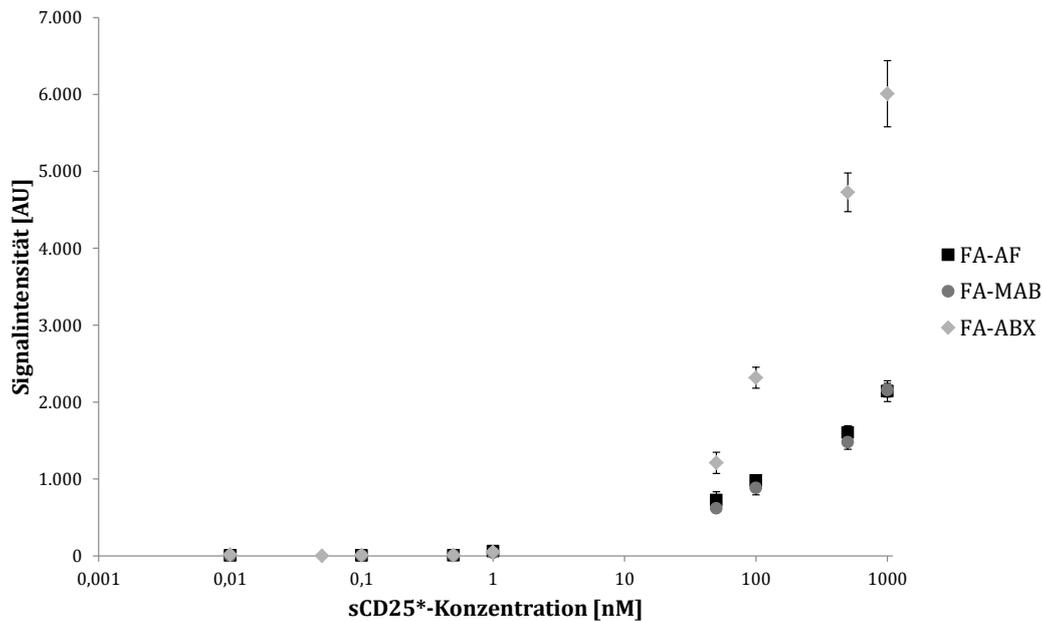
Die hier gezeigten Microarray-Versuche wurden zum größten Teil im Rahmen der Bachelorarbeit mit dem Titel ‚Entwicklung antikörperbasierter Systeme zur Detektion von sCD25‘ von Yvonne Mergel<sup>158</sup> durchgeführt.

##### **4.3.2.1 Forward-Microarray**

Beim Forward-Microarray wird der Fängerantikörper (FA) auf die Nitrozellulose des Microarray-Slides aufgebracht und anschließend das markierte zu interessierende Antigen (hier sCD25) dazugegeben. Bei diesem Verfahren können verschiedene Eigenschaften der Antikörper wie z.B. optimale Inkubationszeiten, Konzentrationsverhalten oder Pufferzusammensetzungen getestet werden. Für detailliertere Informationen siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.2.1 sowie Abbildung 4-5.

Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen: Bei einem LFA müssen die verwendeten Antikörper eine hohe Affinität zu ihrem Antigen aufweisen, da die meisten Antigene während einer Krankheit nur in geringen Konzentrationen gebildet werden (LOD:  $3 \cdot 10^{-11}$  M).<sup>159-162</sup>

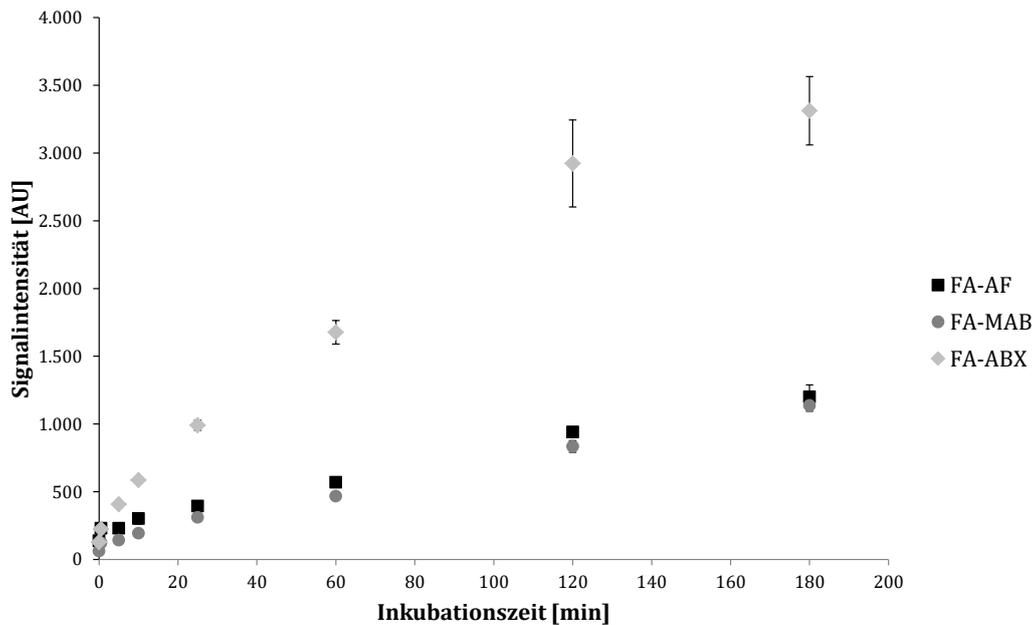
Es wurde eine sCD25-Konzentrationsreihe mittels Microarray untersucht, um das Bindungsverhalten der Antikörper zu analysieren. Dazu wurden die drei Antikörper (AF, MAB und ABX;  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) auf die Nitrozellulose des Microarrays gedruckt. Anschließend wurden verschiedene sCD25\*-Konzentrationen zwischen 0 und 1000 nM zur Inkubation auf den Microarray gegeben. Anhand der Ergebnisse in Abbildung 4-32 ist zu erkennen, dass alle drei Antikörper als Fängerantikörper agieren.



**Abbildung 4-32: Einfluss verschiedener sCD25\*-Konzentrationen (0,01 - 1000 nM) bei gleichbleibender Konzentration (1 mg·mL<sup>-1</sup>) der drei Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB, FA-ABX) im Forward-Format (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>). N=8**

Bis zu einer Konzentration von ca. 1 nM war kaum Fluoreszenzsignal detektierbar. Ab einer sCD25\*-Konzentration von 1 nM ist die Signalintensität bei allen drei Antikörpern sichtbar angestiegen. FA-ABX (◆) zeigt die stärkste Affinität zu sCD25\* und weist bei 50 nM im Vergleich zu FA-MAB (●) und FA-AF (■) eine 1,7 bzw. 1,9-fache Signalintensität auf. Bei einer sCD25\*-Konzentration von 1 μM liegt die Differenz der Signalintensität von ABX zu den beiden anderen Antikörpern bei dem 2,8-fachen.

Einfluss verschiedener Inkubationszeiten: In einem weiteren Microarray im Forward-Format wurden die drei sCD25-spezifischen Antikörper mit sCD25\* unterschiedlich lange inkubiert. Bei einem LFA steht nur eine begrenzte kurze Zeit für die Bindung von FA und Antigen zur Verfügung, da die Probenflüssigkeit stetig über die Membran migriert. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die FAs ihr Antigen schnell und spezifisch binden. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden die drei Antikörper (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf Nitrozellulose aufgetragen und anschließend für wenige Sekunden bis 180 Minuten mit 100 nM sCD25\* inkubiert. Die Ergebnisse in Abbildung 4-32 haben gezeigt, dass bei 100 nM sCD25\* alle drei FAs eine auswertbare Signalintensität aufweisen, sodass 100 nM sCD25\* hier gewählt wurden. Die resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 4-33 dargestellt.



**Abbildung 4-33: Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (wenige Sekunden bis 180 Minuten) der drei sCD25-spezifischen Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB, FA-ABX; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) gegenüber sCD25\* (100 nM) im Forward-Format (abgeändert nach Mergel<sup>158</sup>). N=8**

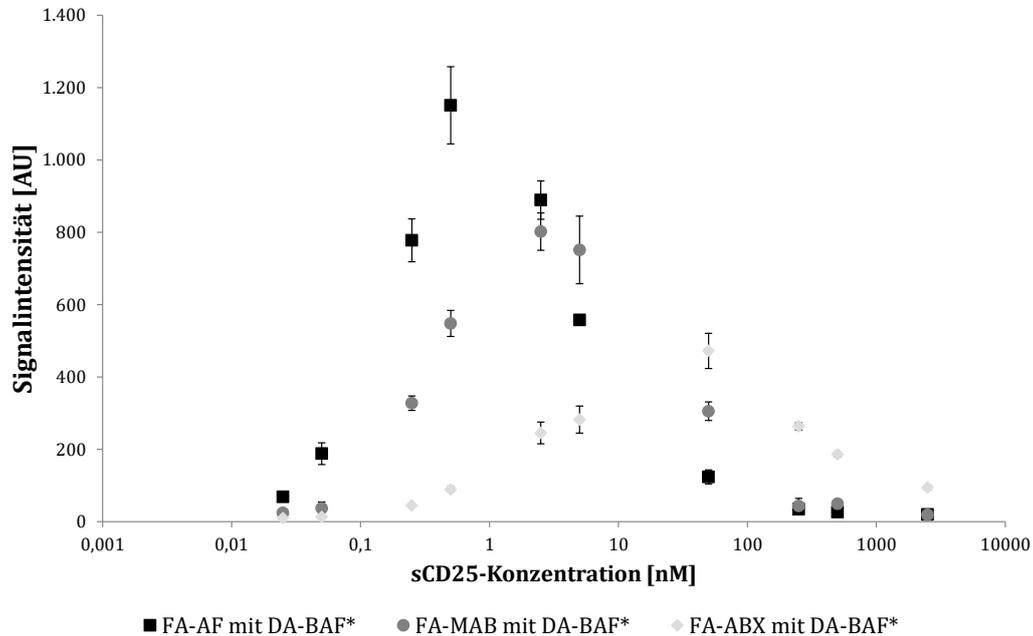
Alle immobilisierten Antikörper weisen eine zunehmende Signalintensität mit steigender Inkubationszeit auf. FA-MAB (●) und FA-AF (■) zeigen dabei einen sehr ähnlichen Verlauf, bei dem mit steigender Inkubationszeit die Signalintensität langsam aber konstant zunimmt. FA-ABX (◆) hat im Gegensatz dazu bereits nach fünf Minuten mehr sCD25\* gebunden als FA-MAB und FA-AF nach 180 min. Bei fünf Minuten ist die Signalintensität von FA-ABX schon 1,8-mal so hoch wie die von FA-AF und 2,9-mal so hoch wie die von MAB. Nach 180 Minuten unterscheidet sich die Signalintensität von FA-ABX um einen Faktor von 2,8 im Vergleich zu den Signalintensitäten von FA-MAB und FA-AF. Aufgrund der besseren Ergebnisse nach langen Inkubationszeiten wurde die Inkubationszeit für die immobilisierten Antikörper und das Antigen in den folgenden Versuchen zum Sandwich-Microarray mit sCD5 auf 180 min (3 h) gesetzt.

#### 4.3.2.2 Sandwich-Microarray

Wie in Kapitel 4.2.2.2 bereits näher erklärt, lässt sich mit dem Sandwich-Format überprüfen, welche der Antikörper in Kombination mit- und untereinander als Fänger- und Detektionsantikörper (FA und DA) fungieren können. Für die Etablierung des LFAs ist die Beurteilung der Antikörper im Sandwich-Format ein wichtiger Bestandteil, da diese im selben Format später auf dem LFA fungieren.

Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen: Zur Überprüfung der Antikörper auf ihre Funktion als DA wurden alle drei Antikörper (MAB, AF und ABX; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) wie zuvor als FA auf die Nitrozellulose aufgetragen. Die Ergebnisse mit DA-AF\* und DA-MAB\* sind im Anhang zu finden (Anhang, Abbildung 7-6 & Abbildung 7-7). Zusätzlich wurde für den Sandwich-Microarray

ein weiterer Antikörper (BAF) als DA verwendet. DA-BAF\* wurde in einer Konzentration von 50 nM mit unterschiedlichen Konzentrationen sCD25 (0 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) in separaten Reaktionsgefäßen für 120 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde diese Probenlösung für 3 h auf dem Microarray inkubiert. In Abbildung 4-34 sind die Signalintensitäten aufgetragen.



**Abbildung 4-34:** Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB und FA-ABX; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (BAF\*, 50 nM). BAF\* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel<sup>158</sup>). N=8

Die Signalintensitäten aller Antikörper steigen zunächst bis zu einem Maximum an und fallen anschließend wieder ab. Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, können bei einer niedrigen Antigenkonzentration das Antigen und der DA\* während der Vorinkubation einen fluoreszenzmarkierten Antigen-DA\*-Komplex bilden, der anschließend auf dem Microarray vom FA gebunden wird. Steigt die Konzentration des Antigens, werden mehr Antigen-DA\*-Komplexe gebildet und von den FAs gefangen, was zu einem Signalanstieg führt (Vergleich Kapitel 4.2.2.2, Abbildung 4-12A). Sind alle DAs an ein Antigen gebunden oder alle FAs mit einem Antigen abgesättigt, ist das Maximum erreicht (Vergleich Kapitel 4.2.2.2, Abbildung 4-12 B). Bei einem weiteren Anstieg der Antigenkonzentration, hat sich das Verhältnis von Antigenen mit gebundenem DA und ohne geändert. Während der Inkubation auf dem Microarray können immer mehr Antigenmoleküle ohne gebundenen DA\* an den FA binden, sodass das Signal wieder abnimmt (Vergleich Kapitel 4.2.2.2, Abbildung 4-12C). Steigt die Konzentration des Antigens weiter an, so sinkt das Fluoreszenzsignal immer stärker.

Dieses Verhalten ist bei allen drei Antikörpern zu beobachten, wenn DA-BAF\* verwendet wurde. Dabei zeigte FA-AF (■) die maximale Signalintensität mit 1150 AU bei einer Konzentration von

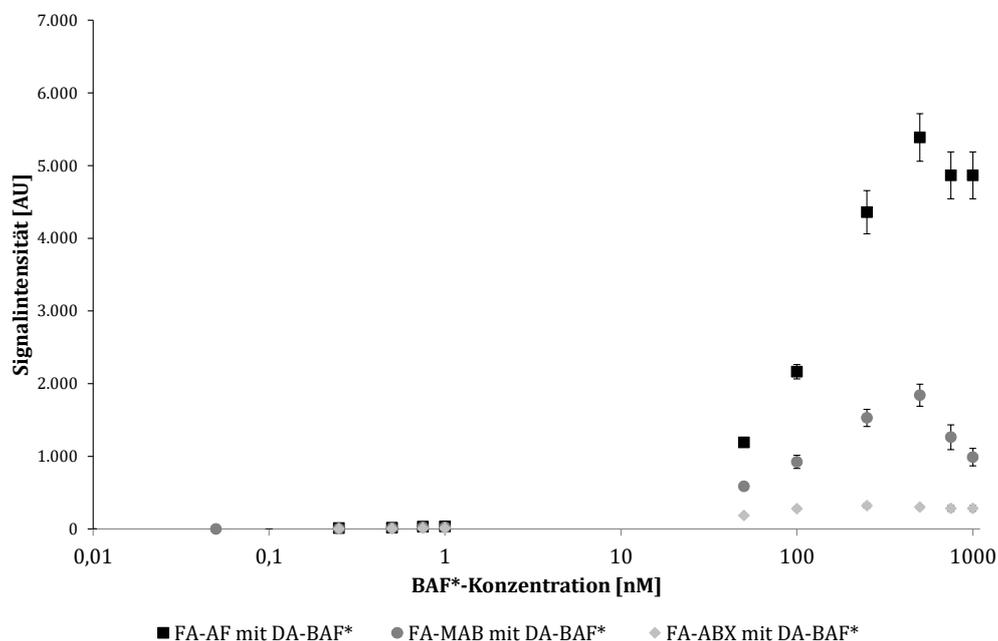
0,5 nM sCD25, gefolgt von FA-MAB (●) bei einer Konzentration von 2,5 nM mit 800 AU und schließlich FA-ABX (◆) bei einer Konzentration von 50 pM mit 470 AU. Die Verschiebung des Peaks spricht dafür, dass der BAF\* mehrere Epitope des Antigens sCD25 binden kann. Der hier eingesetzte DA-BAF ist im Gegensatz zu MAB und ABX ein polyklonaler Antikörper. Polyklonale Antikörper bestehen aus einem Gemisch aus verschiedenen Antikörpern und können aufgrund dessen meistens an verschiedene Epitope des Antigens binden. Dadurch können mehrere verschiedene DAs an ein sCD25-Molekül gebunden sein. Kommt es nun zur Ausbildung des Sandwich-Komplexes, kann es sein, dass das Epitop für den Membran-gebundenen FA bereits besetzt ist oder durch einen DA sterisch abgeschirmt wird. AF ist ebenfalls ein polyklonaler Antikörper und kann daher, genauso wie BAF, an mehrere Epitope des Antigens binden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei Aufeinandertreffen von AF und sCD25 ein passendes Epitop frei ist, während bereits mehrere DAs gebunden haben, ist größer als bei einem monoklonalen Antikörper, wie z.B. MAB oder ABX. Dadurch sind polyklonale Antikörper auch weiter zur Detektion geeignet, selbst wenn das Antigen strukturell verändert ist.<sup>104</sup> Dies führt zu einer hohen Signalintensität. Andererseits können bei polyklonalen Antikörpern vermehrt batch-to-batch-Variationen auftreten, wodurch ein anderes Bindungsverhalten entstehen kann und die Spezifität der Antikörper in einer Charge stark variieren kann.<sup>163</sup> Liegen erhöhte sCD25-Konzentrationen im menschlichen Organismus vor, dann befinden sie sich im geringen picomolaren Bereich (Vergleich Kapitel 4.3.1). Die in diesem Microarray getesteten hohen sCD25-Konzentrationen kommen somit im Menschen nicht vor.

Mit Hilfe des Sandwich-Assay konnte der Detektionsbereich abgesenkt werden, sodass sich physiologischen sCD25-Konzentrationen angenähert wurde. Konnte mit dem Forward-Format eine sCD25\*-Konzentration erst ab 1 nM detektiert werden (Abbildung 4-32), so können mit dem Sandwich-Format bereits sCD25-Konzentrationen ab 50 (FA-AF) bzw. 250 pM (FA-MAB) nachgewiesen werden. Dies liegt daran, dass im Sandwich-Format gegenüber dem Forward-Format bei gleicher Anzahl FAs aufgrund der Größenunterschiede mehr Fluorophor-Moleküle am DA (molare Masse = 150 kDa) gebunden werden können als am sCD25 (molare Masse = 23,6 kDa) und somit zu einer höheren Signalintensität führt. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Cy5-Moleküle an einen Antikörper binden als an ein sCD25-Molekül sehr groß. Die Kopplung von Cy5 an ein Protein geschieht durch einen nukleophilen Angriff einer freien Aminogruppe des Proteins. Dazu kommt, dass bei der späteren Ausbildung eines Sandwich-Komplexes ebenfalls die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass mehrere DAs an ein sCD25-Molekül binden als mehrere sCD25-Moleküle an einen FA. Dadurch ist das Sandwich-Format sensitiver.<sup>164</sup> Obwohl FA-ABX im Forward-Format sCD25\* mit der höchsten Affinität gebunden hat (Abbildung 4-32), zeigt er im Sandwich-Format die niedrigsten Signalintensitäten auf. Um dieses Ergebnis zu

verifizieren, wurde der Versuch wiederholt. Es ergaben sich die gleichen Versuchsergebnisse (Ergebnis wird in dieser Arbeit nicht dargestellt). Für die Bindung von FA-ABX und sCD25 ist die Bindungsaffinität höher, wenn sCD25 an Cy5 und nicht vorweg an DA-BAF\* gebunden ist. Neben sterischen Hinderungen besteht die Möglichkeit, dass das DA-BAF\*-markierte sCD25 an andere Bindestellen von FA-ABX gebunden werden kann und somit zu anderen Ergebnissen führt.

Bei der Untersuchung von AF auf die Fähigkeit als DA (Anhang, Abbildung 7-6) konnte gezeigt werden, dass ein Sandwich-Komplex zwischen den verschiedenen Antikörpern ausgebildet werden kann. Allerdings ist dafür eine deutlich höhere sCD25-Konzentration nötig als bei DA-BAF\*. MAB\* hingegen ist als DA im Sandwich-Format nicht geeignet (Anhang, Abbildung 7-7). BAF\* zeigt als polyklonaler Antikörper im Vergleich mit AF\* und MAB\* die besten Ergebnisse und wurde aus diesem Grund in den folgenden Versuchen als DA verwendet.

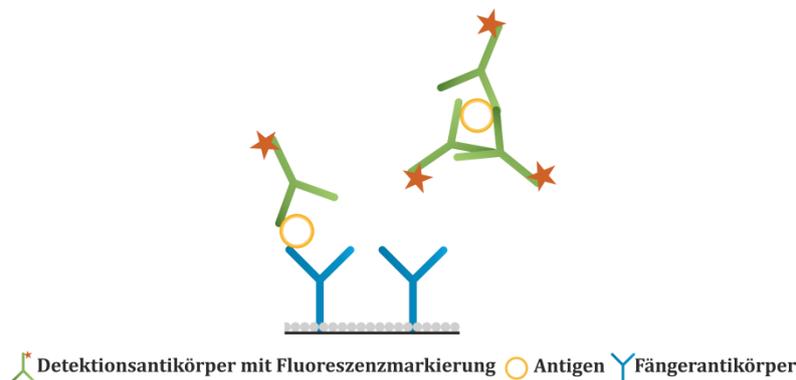
Einfluss verschiedener Detektionsantikörper (DA-BAF\*)-Konzentrationen: Zur Ermittlung der optimalen Konzentration des DA, also dem stärksten Signal bei möglichst geringer DA-Konzentration, wurde ein weiterer Microarray im Sandwich-Format durchgeführt. Diesmal sind die Konzentrationen von FA-MAB, FA-AF und FA-ABX ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie von sCD25 ( $2,5 \text{ nM}$ ) konstant gehalten worden, wohingegen die Konzentration von BAF\* zwischen  $0 - 1 \text{ }\mu\text{M}$  variiert wurde. Abbildung 4-35 zeigt den Verlauf der Signalintensität bei den verschiedenen BAF\*-Konzentrationen.



**Abbildung 4-35: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Detektionsantikörpers (BAF\*,  $0 - 1 \text{ }\mu\text{M}$ ) bei konstanter sCD25-Konzentration ( $2,5 \text{ nM}$ ) im Sandwich-Format mit den Fängerantikörpern FA-AF, FA-MAB und FA-ABX (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>).**

FA-ABX (◆) zeigte über den untersuchten DA-BAF\*-Konzentrationsbereich keinen Signalintensitätsanstieg und ist daher in dieser Kombination nicht geeignet. Ab einer DA-BAF\*-

Konzentration von 50 nM ist bei FA-MAB (●) und FA-AF (■) ein deutliches Signal zu verzeichnen. Dieses steigt bei FA-AF bis auf 5390 AU und bei FA-MAB auf 1840 AU jeweils für 0,5  $\mu$ M BAF\* an. Bei höheren BAF\*-Konzentrationen sinken die Signale wieder. Ein Grund für das Absinken des Signals kann sein, dass je mehr DA-BAF\*-Moleküle zu sCD25 gegeben wurden, desto mehr DA-BAF\*-Moleküle an das Antigen binden konnten. Durch die zahlreichen Bindungen wiederum werden alle Antigenbindestellen bereits durch DA-BAF\* besetzt und die FAs auf dem Microarray können den Antigen-BAF\*-Komplex nicht mehr binden. Das Fluoreszenzsignal bleibt aus (Abbildung 4-36).



**Abbildung 4-36: Schematische Darstellung von Detektionsantikörpern, die das Antigen abschirmen, sodass dieses nicht mehr an den Fängerantikörper auf dem Microarray binden kann.**

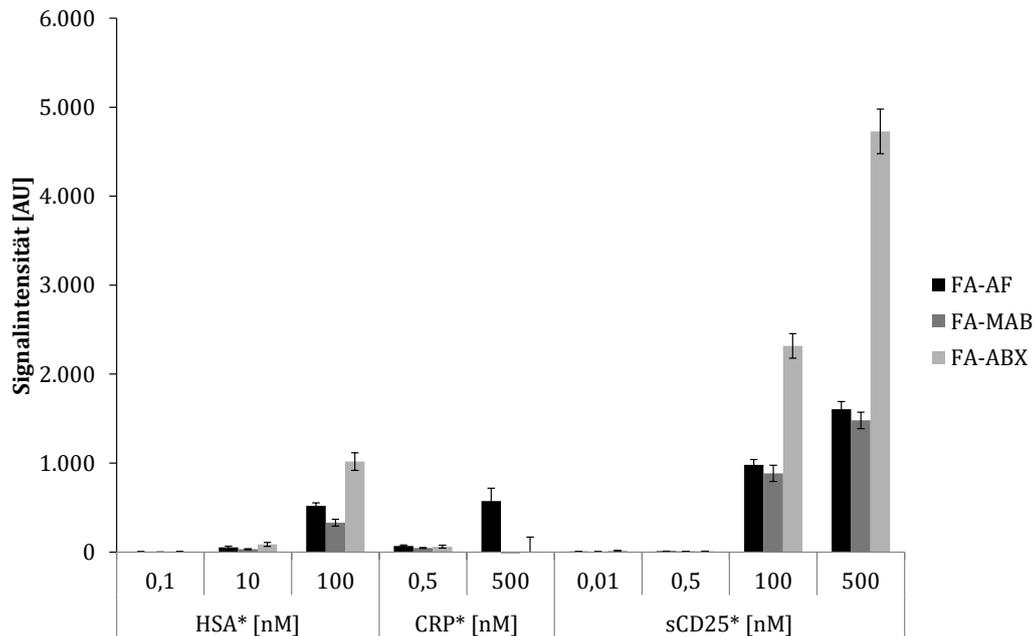
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei einer konstanten sCD25-Konzentration von 2,5 nM und der Verwendung von FA-AF mit einer DA-BAF\*-Konzentration von 500 nM die stärkste Signalintensität erreicht wurde. Mit dieser Antikörper-Kombination wurde der anschließende LFA in Kapitel 4.3.3.2 entwickelt.

#### 4.3.2.3 Beurteilung der Antikörperspezifität

Bei einem LFA werden zur Detektion des jeweiligen Antigens biologische Materialien wie Serum oder Urin auf den Teststreifen gegeben. Serum und Urin bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlichster Komponenten, die alle einen Einfluss auf die Bindung von Antikörper und Antigen haben können bzw. eventuell selber eine Bindung zu den Antikörpern ausbilden können. Aus diesem Grund wurden die sCD25-spezifischen Antikörper sowohl im Forward als auch im Sandwich-Format auf ihre Spezifität untersucht.

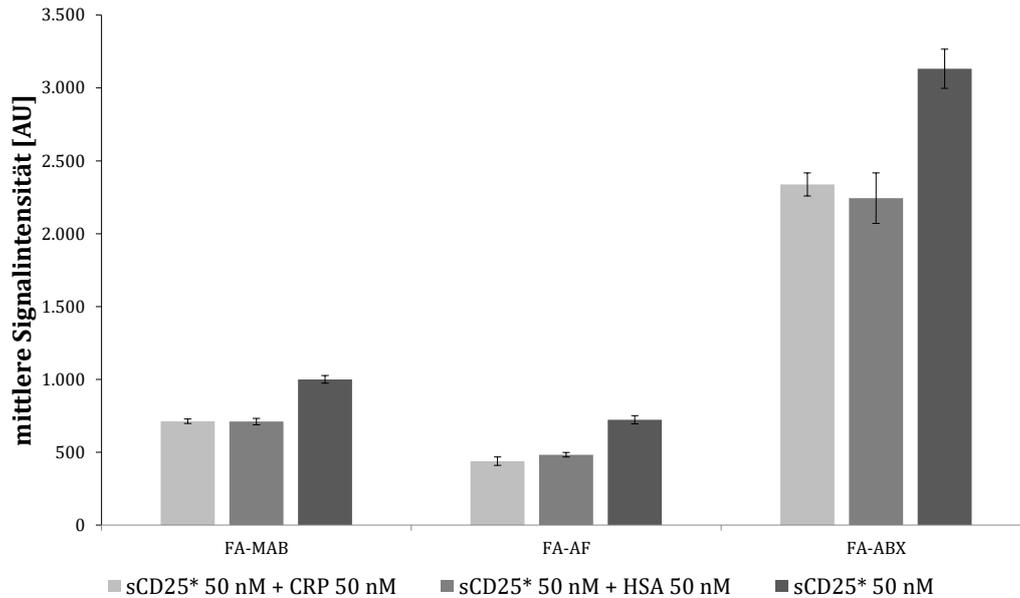
Standard Forward-Microarray: Im Forward-Format wurden als Kontrollen verschiedene Konzentrationen HSA\* und CRP\* zu den aufgetragenen FA-MAB, FA-AF und FA-ABX (1 mg·mL<sup>-1</sup>) gegeben. Anschließend wurden die Signalintensitäten mit denen von sCD25\* bei den jeweils gleichen Konzentrationen verglichen. Wie in Abbildung 4-37 zu sehen ist, binden alle drei Antikörper bei einer Konzentration von 100 nM HSA\*. Die Signalintensitäten bei der Bindung von sCD25\* sind 1,9 bis 2,7-fach so hoch, was bedeutet, dass alle drei Antikörper sCD25\* als Antigen

präferieren. Wurde FA-AF mit 500 nM CRP\* inkubiert, fand ebenfalls eine Bindung statt. FA-AF erreicht mit der Bindung von 500 nM sCD25\* nur 2,7-fach höhere Signalintensitäten.



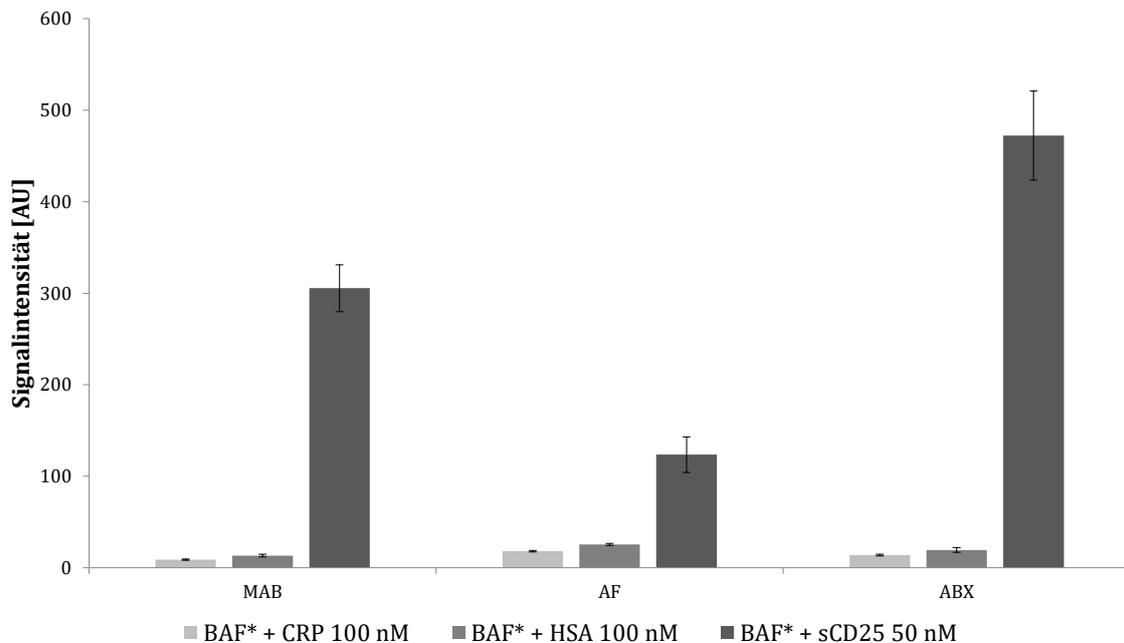
**Abbildung 4-37: Bindungsstudien im Forward-Format von verschiedenen sCD25\*-Konzentrationen (500; 100; 0,5; 0,01 nM) im Vergleich mit HSA\* (100; 10; 0,1 nM) und CRP\* (500; 0,5 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-AF, FA-MAB und FA-ABX (abgeändert nach Mergel<sup>158</sup>).**

Kompetitiver Forward-Microarray: Zusätzlich wurde ein kompetitiver Assay mit HSA sowie CRP durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 nM HSA bzw. CRP und sCD25\* zusammen auf einem Microarray inkubiert. Zur Kontrolle wurde immer die gleiche Konzentration sCD25\* ohne HSA bzw. CRP untersucht. Abbildung 4-38 zeigt, dass sowohl HSA als auch CRP eine Auswirkung auf die Bindung von sCD25\* mit den verwendeten FAs haben, da die Signalintensitäten bei kompetitiver Inkubation nur etwas schwächer sind als bei reiner sCD25\* Inkubation. Um sicher zu stellen, dass die Antikörper bevorzugt sCD25 und nicht HSA oder CRP binden, wurden ebenfalls Kontrollen im Sandwich-Format und auf dem späteren LFA durchgeführt.



**Abbildung 4-38: Kompetitive Bindungsstudien im Forward-Format mit markiertem sCD25 (50 nM) und verschiedenen Konzentrationen nicht-markiertem CRP (50 nM) bzw. HSA (50 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-MAB, FA-AF und FA-ABX (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>).**

Standard Sandwich-Microarray: Nachdem die Microarrays im Forward-Format die Spezifität der Antikörper nicht bestätigen konnten, wurde der Versuch im Sandwich-Format wiederholt, da die spätere Anwendung im LFA auf dem Sandwich-Format beruht. Dazu wurden die drei Antikörper MAB, AF und ABX ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) als FA und BAF\* als DA verwendet. Hierbei ist ersichtlich, dass die Signalintensität in Abbildung 4-39 bei einem Sandwich aus sCD25 und BAF\* deutlich stärker ist als bei einem Sandwich aus HSA bzw. CRP mit BAF\*.



**Abbildung 4-39: Bindungsstudien zum Vergleich verschiedener Antigene (CRP, 100 nM; HSA, 100 nM; sCD25, 50 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität mit BAF\* als Detektionsantikörper und FA-MAB, FA-AF und FA-ABX als Fängerantikörper im Sandwich-Format (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>). N=8**

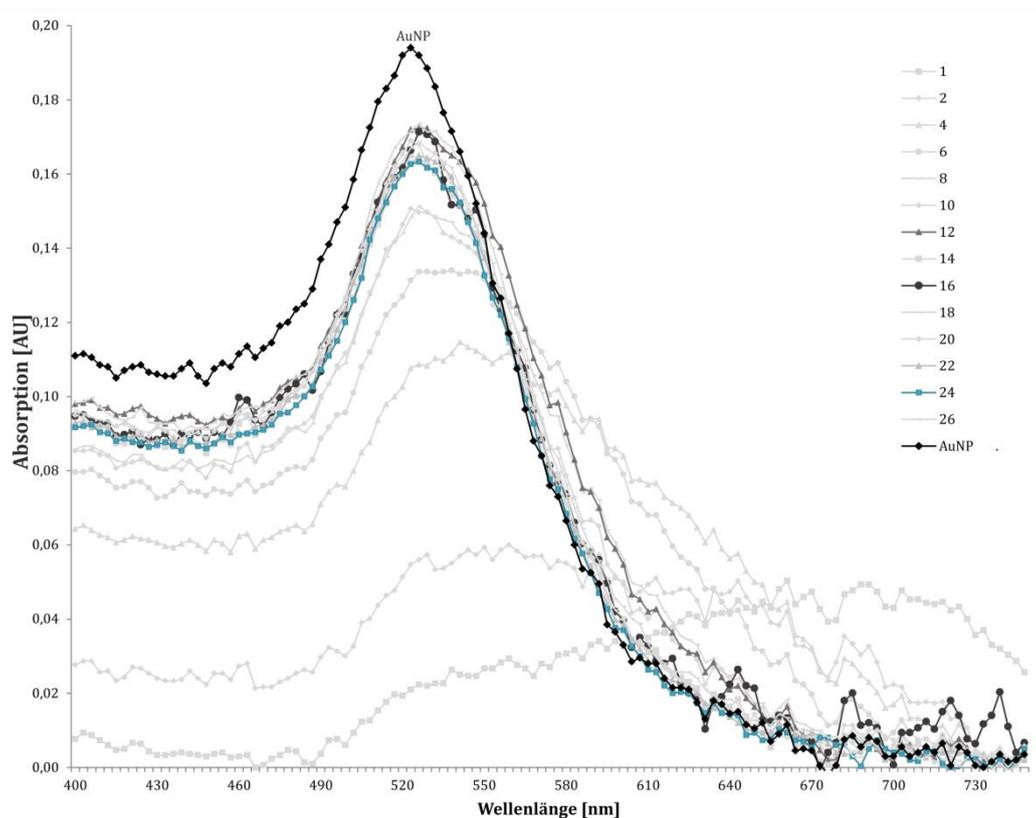
Durch das im Vergleich zum Forward-Format spezifischere Sandwich-Format konnte bestätigt werden, dass die getesteten Antikörperpärchen sCD25 spezifisch binden.

### 4.3.3 Lateral Flow Assay zur Detektion von sCD25

Nachdem die sCD25-spezifischen Antikörper mittels Microarrays auf ihre Affinität sowie Fähigkeit als FA und DA getestet wurden, konnte der Versuchsaufbau auf einen LFA übertragen werden. Dazu wurde zunächst das Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugat hergestellt und schließlich der LFA aufgebaut und optimiert.

#### 4.3.3.1 Herstellung von Goldnanopartikel-Antikörper-Konjugaten

Zur Herstellung von Goldnanopartikel-Antikörper-Konjugaten wurde zunächst wie beim CRP in Kapitel 4.2.3.1 ein Flokkulationstest durchgeführt. Dabei werden definierte Konzentrationen an DA zu einer definierten Menge AuNP gegeben und die für eine ausreichende Konjugat-Stabilität kritische Antikörper-Konzentration ermittelt. Die Aggregation infolge einer unzureichenden Konjugat-Stabilität nach Salzzugabe wurde photometrisch detektiert und die entstandenen Absorptionsspektren mit dem Spektrum reiner AuNPs ohne Antikörper verglichen. In Abbildung 4-40 sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 4-40:** Grafische Auswertung des Flokkulationstests mit Antikörper BAF als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 14 verschiedenen Antikörperkonzentrationen sowie unkonjugierte AuNPs (AuNP) als Referenz (1=0,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2=0,39  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4=1,17  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6=1,96  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 8=2,74  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10=3,52  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 12=4,30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 14=5,09  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 16=5,87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 18=6,65  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 20=7,43  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 22=8,22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 24=9,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 26=9,78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Zur besseren Übersicht ist nur jeder zweite Konjugationsansatz dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.24).

Zur besseren Übersicht ist nur jede zweite Antikörperkonzentration mit ihrem dazugehörigen Absorptionsspektrum abgebildet. Bei der Zugabe von niedrigen Antikörperkonzentrationen sind die Lösungen wie erwartet nach der Salzzugabe direkt von rot zu blau-grau gewechselt (Daten nicht gezeigt), die dazugehörigen Kurven sind keine definierten Peaks sondern sehr langgestreckt und zu hohen Wellenlängen (Maximum bei 600-700 nm) verschoben, was eine starke Agglomeration der AuNPs mit großen Agglomeraten anzeigt. Bei weiter ansteigender Antikörperkonzentration wird das Maximum der Kurven Richtung 520 nm verschoben, da die AuNPs immer weniger agglomerieren. Ab einer Antikörperkonzentration von  $4,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ähneln sich die Spektren des Konjugats und der reinen AuNPs; mit einem symmetrischen Peak und typischem Maximum um 520 nm. Bei weiterer Erhöhung der Antikörperkonzentration nähern sich die Spektren anhand des besseren *Tailing* des Kurvenverlaufs dem Spektrum der AuNPs immer weiter an.

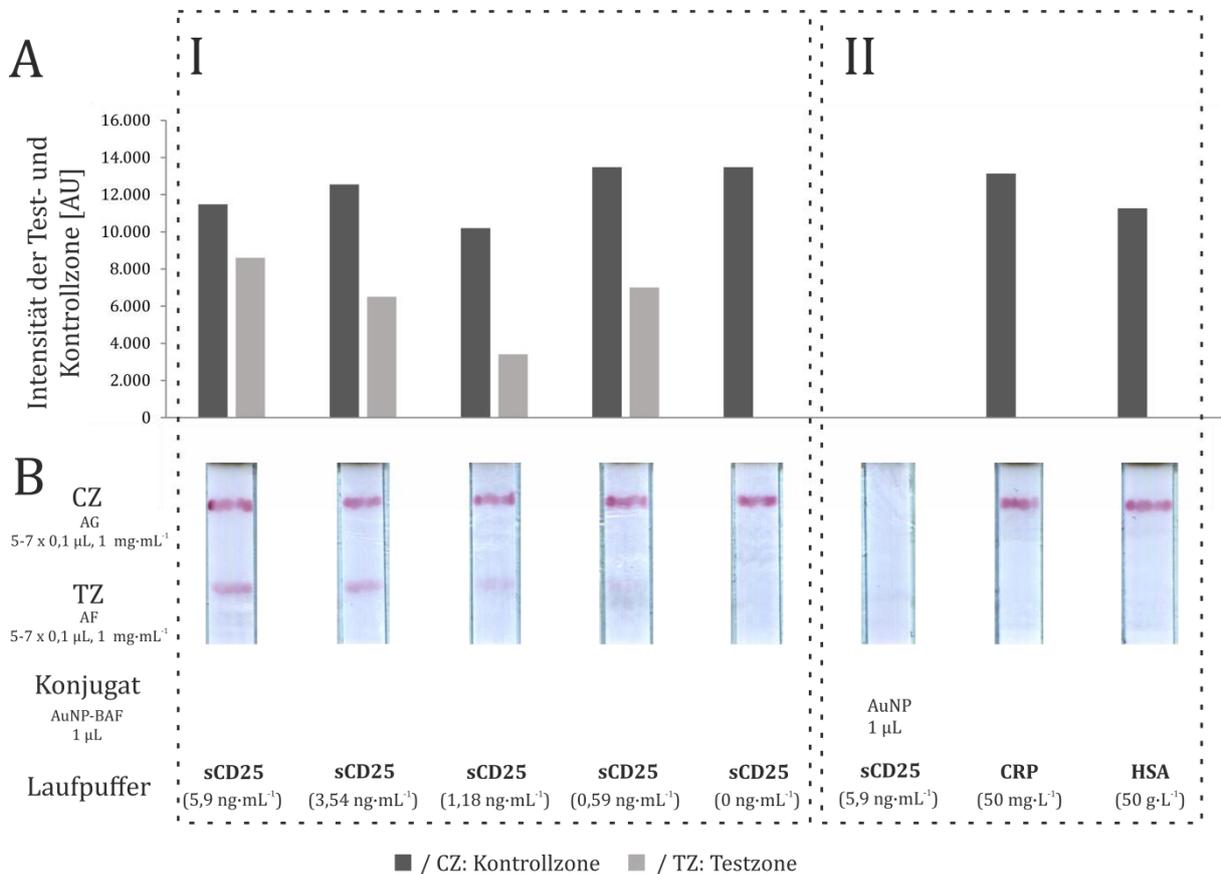
Zur Stabilisierung des Antikörpers wurden  $50 \mu\text{g}$  BSA pro  $1 \mu\text{g}$  Antikörper als Carrier-Protein bei der Produktion hinzugegeben. Dementsprechend ist die totale Proteinkonzentration im Konjugationsansatz höher und die Antikörper konkurrieren auf den AuNPs mit dem BSA. Aus diesem Grund wurde sich für eine etwas höhere Antikörperkonzentration als die minimal erforderliche entschieden und somit die folgenden Versuche mit  $9,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper (Abbildung 4-40, 24, blaue Kurve) durchgeführt.

#### 4.3.3.2 Etablierung des Lateral Flow Assays

Mit den Ergebnissen der Microarrays und des Flokkulationstests wurde ein Lateral Flow Assay (LFA) aufgebaut, der sCD25 entweder im Urin oder Plasma von Patientenproben detektieren soll. In Vorversuchen (Kapitel 4.3.1) wurde gezeigt, dass in Plasmaproben von Patienten mit einer TCMR im Durchschnitt eine sCD25-Konzentration von  $406 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  vorkommt. Im Gegensatz dazu weisen Plasmaproben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie einen Mittelwert von  $113 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 auf. Im Urin beträgt der Mittelwert von sCD25 in Proben von Patienten mit TCMR  $141 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und der Mittelwert der Kontrollen (Normal) liegt bei  $71 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Kapitel 4.3.1, Tabelle 4-3). Dies bedeutet, dass der hier entwickelte LFA für Plasmaproben ab ca.  $400 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 ein positives Ergebnis ("Ja") mit einer Rotfärbung in der Testzone liefern sollte und für Urinproben ab ca.  $140 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25.

Dazu wurde als erstes überprüft wie sensitiv der LFA mit den Charakteristika der Microarray-Ergebnisse ist. In Kapitel 4.2.3 wurde bereits detailliert auf die generelle Zusammensetzung, Durchführung sowie Auswertung der LFAs eingegangen. Hinsichtlich dessen wurden AF in der Testzone als Fängerantikörper (FA), der Antikörper AG in der Kontrollzone als FA und AuNP-BAF auf dem *Release Pad* aufgetragen. AG ist ein Sekundärantikörper aus dem Kaninchen und spezifisch gegen Antikörper aus der Ziege (wie BAF) gerichtet. Die sCD25-Konzentration im

Laufpuffer wurde variiert (0 - 5,9 ng·mL<sup>-1</sup>). Zusätzlich wurden drei Kontrollen durchgeführt. Bei der ersten Kontrolle wurde der Laufpuffer mit 5,9 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 versetzt und statt Konjugat wurden reine AuNPs verwendet. Als weitere Kontrollen wurden CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) und HSA (50 mg·L<sup>-1</sup>) zum Laufpuffer zugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-41 dargestellt.



**Abbildung 4-41: LFAs (B) mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen (0 - 5,9 ng·mL<sup>-1</sup>) im Laufpuffer sowie die jeweils grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und in der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-BAF auf dem Release Pad, Antikörper AF als sCD25-FA (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: sCD25 im Laufpuffer. II: Kontrollproteine im Laufpuffer: sCD25 (5,9 ng·mL<sup>-1</sup>, mit reinen Goldnanopartikeln als Konjugat), CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) und HSA (50 g·L<sup>-1</sup>).**

Wie erwartet wurde bei den LFAs eine rote Kontrolllinie erhalten, die Färbung ist auch mittels ImageJ ausgewertet worden. Lediglich die Kontrolle mit reinen AuNPs (Abbildung 4-41 II, linker LFA) wies keine Kontrolllinie auf, da die AuNPs ohne konjugierten DA nicht an der Kontrolllinie binden konnten und sich somit im Absorbent Pad angesammelt haben. Die Signalintensität der Kontrollzone bewegt sich in einem Bereich zwischen 13500 und 11200 AU und zeigte, dass der Test funktional ist.

Für die Testzone konnten bei einigen LFAs ebenfalls erfolgreiche Rotfärbungen erhalten werden (Abbildung 4-41 I). Mit einer sCD25-Konzentration von 5,9 ng·mL<sup>-1</sup> im Laufpuffer ist eine eindeutige Linie (8600 AU) erkennbar. Mit abnehmender sCD25-Konzentration nimmt auch die

Intensität der Linie in der Testzone ab bis sie bei  $0,59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  nicht mehr mit dem bloßen Auge zu sehen war. Je geringer die sCD25-Konzentration im Laufpuffer war, desto weniger Komplexe konnten aus FA-AF, sCD25 und AuNP-BAF ausgebildet und somit detektiert werden. Dabei fällt jedoch auf, dass die Intensität einer vermeintlichen Testlinie bei  $0,59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 mit 7000 AU genauso stark ausgewertet wurde wie bei einer sCD25-Konzentration von  $3,54 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , obwohl im Bereich der Testzone bei  $0,59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 keine eindeutige Testlinie sichtbar ist. Aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit der stark vernetzten Nitrozellulose kann es zu Unterschieden beim Scannen kommen, vor allem wenn noch eine Restfeuchtigkeit der Membran vorliegt, wodurch der leicht erhöhte Hintergrund im Bereich der Testzone erklärbar ist.

Bei den Kontrollen (Abbildung 4-41 II) wurde in keiner der Testzonen eine Linie gebildet. Daher konnte eine Kreuzreaktion des LFAs mit den beiden in Plasma und Urin vorkommenden Proteinen HSA und CRP ebenso ausgeschlossen werden, wie eine unspezifische Bindung der AuNPs mit der Membran, der Test- oder Kontrollzone.

Zur weiteren Optimierung und damit Herabsetzung der Nachweisgrenze von sCD25 wurden im Folgenden unter anderem verschiedene Trocknungsmethoden ausprobiert, das Konjugat verändert sowie eine Vorinkubation des Konjugats mit dem Antigen untersucht.

#### 4.3.3.3 Optimierung der Assaysensitivität

Für die Optimierung des LFAs wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zunächst wurde die Membran (140 mit *backing*) gegen die Membran 180 mit *backing* ausgetauscht. Die beiden Membranen weisen durch unterschiedlich starke Vernetzung der Nitrozellulose verschiedene Fließeigenschaften der Probenflüssigkeit auf. Dabei ist die Beschaffenheit der Porengröße und somit auch der *wicking rate*, der Zeit, die Wasser benötigt, um 4 cm der Membran entlang zu migrieren ( $\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), bei der Membranen 140 mit *backing* größer als bei der Membran 180 mit *backing* (Anhang, Tabelle 7-1). Da die Membran 180 mit *backing* durch ihre kleinere Porengröße eine höhere Verweilzeit der Testkomponenten aufweisen kann und dies wiederum zu einer höheren Assay-Sensitivität führt, wurde für die Versuche diese Membran verwendet. Aus Kostengründen wurden für die ersten Optimierungsversuche der Antikörper AF (AuNP-AF) anstelle von BAF (AuNP-BAF) zur Konjugation verwendet. Es handelt sich dabei um den gleichen Antikörper, BAF ist im Unterschied zu AF jedoch biotinyliert. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass sie weitestgehend die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen müssten.

Aus den Erfahrungen zur Entwicklung eines LFAs gegen CRP war bekannt, dass die Bindungseigenschaften der Microarray-Versuche nicht direkt auf die LFA-Versuche übertragbar sind. Deshalb wurden zusätzlich noch einmal LFAs mit FA-AF, FA-ABX und FA-MAB im Zusammenspiel mit AuNP-AF angefertigt (Anhang, Abbildung 7-8). Dabei ist deutlich zu sehen,

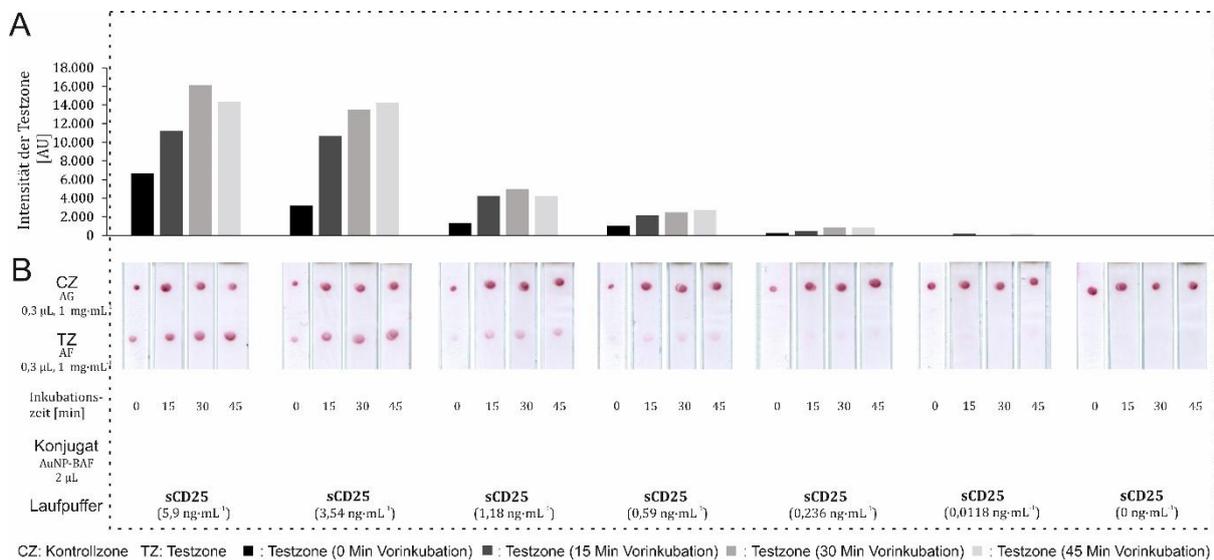
dass im LFA-Format, im Gegensatz zum Microarray, FA-ABX zusammen mit AuNP-AF nicht funktioniert. Die Teststreifen mit MAB und AF als FA zeigen hingegen bei beiden sCD25-Konzentrationen (5,9 und 1,18 ng·mL<sup>-1</sup>) einen leichten Punkt in der Testzone. Da die Versuche mit unterschiedlichen FAs auf der Membran aber an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse nicht exakt vergleichbar. Als monoklonaler Antikörper bindet MAB nur an ein spezifisches Epitop von sCD25. AF hingegen ist ein polyklonaler Antikörper und besteht dementsprechend aus verschiedenen Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope von sCD25 binden können. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass AF sCD25 in der Testzone bindet als bei MAB. Allerdings sinkt dadurch die Spezifität der Bindung. Infolgedessen werden für LFAs monoklonale Antikörper als FAs bevorzugt. Aus diesem Grund wurde zunächst FA-MAB eingesetzt. Nachdem hier aber keine weiteren Sensitivitätsverbesserungen erbracht werden konnten, wurde mit AF als FA weitergearbeitet (Daten nicht gezeigt).

Zur Optimierung wurden unter anderem die Konzentration der Antikörper in der Testzone erhöht, Tween 20 dem Laufpuffer hinzugesetzt und die Antikörper auf der Membran mit verschiedenen Methoden getrocknet. Obwohl sich bei der Erhöhung der FAs eine größere Menge Antikörper auf der Membran zum Binden befanden, wurde die Rotfärbung in der Testzone nicht verstärkt (Ergebnis wird nicht dargestellt). Dies kann daran liegen, dass entweder die Bindung der FAs an sCD25 durch die bereits gebundenen DA erschwert wurde oder dass sich die FAs auf der Membran gegenseitig sterisch hindern. Bei der Aufgabe der Antikörper auf die Membran werden diese nicht gerichtet an die Membran gebunden. Dies bedeutet, dass nicht jeder Antikörper so ausgerichtet ist, dass er ein Antigen binden kann. Um verschiedene Trocknungsmethoden zu testen, wurden die LFAs bei Raumtemperatur (RT), 40 °C oder 50 °C für 1 h und 24 h getrocknet und mit 5,9 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 im Laufpuffer durchgeführt (Anhang, Abbildung 7-9). Zwischen den verschiedenen LFAs konnte jedoch kein merklicher Unterschied festgestellt werden, sodass die Antikörper auf den LFAs weiterhin über Nacht bei RT getrocknet wurden.

Zur weiteren Optimierung wurde das Konjugat variiert. Für die Herstellung des Konjugats wurde bisher eine definierte Menge DAs zu einer definierten Menge AuNP gegeben. Nach Inkubations- und Blockierungsschritten wurde die Lösung zentrifugiert und das Pellet schließlich als Konjugat verwendet. Da sich in diesem Konjugat aber nach wie vor freie DAs, also Antikörper die nicht an AuNP gebunden haben, befinden können, wurde das Pellet nun noch zweimal mit Wasser gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen. Diese können somit auf dem LFA keine Bindestellen am Antigen mehr besetzen. Zur Überprüfung des gewaschenen Konjugats wurden zwei LFAs mit 5,9 ng·mL<sup>-1</sup> und 1,18 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 im Laufpuffer erstellt (Anhang, Abbildung 7-10). Zum Vergleich wurden ebenfalls LFAs mit den gleichen sCD25-Konzentrationen im Laufpuffer aber

ungewaschenem Konjugat durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Da das Waschen des Konjugats ungebundenen Antikörper entfernte und Bindungen reduzierte, die das Signal abschwächen könnten, wurde im Folgenden gewaschenes Konjugat verwendet.

Nachdem verschiedene Optimierungen zu keinem großen Fortschritt geführt haben, wurde wieder DA-BAF verwendet, um zu untersuchen, ob es doch Unterschiede zwischen den beiden DAs (AF und BAF) gab. Zusätzlich wurde zur Sensitivitätssteigerung eine Vorinkubation der Probenflüssigkeit mit AuNP-BAF vor dem eigentlichen LFA-Lauf durchgeführt und die Probenlösung hierbei für 0, 15, 30 oder 45 Minuten inkubiert. Wie zuvor konnte das sCD25 in den Proben nachgewiesen werden (Abbildung 4-42). Die Membran wurde nach 15, 30 und 60 Minuten gescannt, die stärksten Rotfärbungen in den Testzonen ergaben sich nach 60 Minuten.

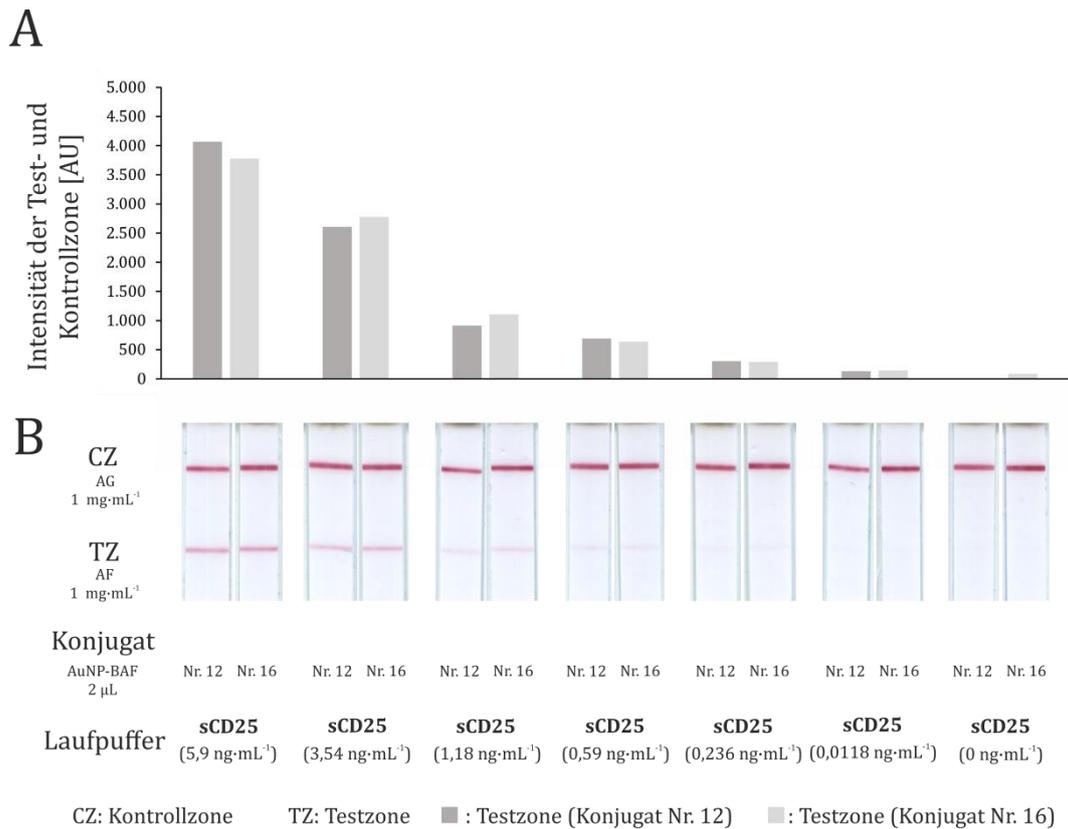


**Abbildung 4-42: Untersuchung einer Vorinkubation von Laufpuffer mit AuNP-BAF für 0 (schwarz), 15 (dunkelgrau), 30 (grau) und 45 (hellgrau) Minuten. Dazu wurden verschiedene sCD25-Konzentrationen (0 - 5,9 ng·mL<sup>-1</sup>) im Laufpuffer verwendet. Die Scans der Membranen wurden 60 min nach Testbeginn aufgenommen. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in den Testzonen (TZ) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurden 2 µL AuNP-BAF auf dem Release Pad, Antikörper AF als sCD25-FA (0,3 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (0,3 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet.**

Die verschiedenen Inkubationszeiten wirken sich auf die Intensitäten der Testzonen aus (Abbildung 4-42). Bei den LFAs mit der am höchsten verwendeten sCD25-Konzentration (5,9 ng·mL<sup>-1</sup>) steigt mit zunehmender Länge der Vorinkubation die Intensität der Testlinie, dabei sind für 30 und 45 min vergleichbare Intensitäten erhalten worden. So weist die Testzone des LFAs ohne Vorinkubation (0 Minuten, schwarzer Balken) eine Signalintensität von 6660 AU auf. Die Punkte der Testzone nach einer Vorinkubation von 15, 30 bzw. 45 Minuten hingegen erzeugen Signalintensitäten von mind. 11220 AU. Aufgrund manueller Auftragung der AF-Lösung unterliegt die Punktausbildung in der Testzone Schwankungen in der Größe des Punktes. Mit sinkender sCD25-Konzentration nahm auch die Rotfärbung der Testzone ab (Abbildung 4-42B). Dies ist auch

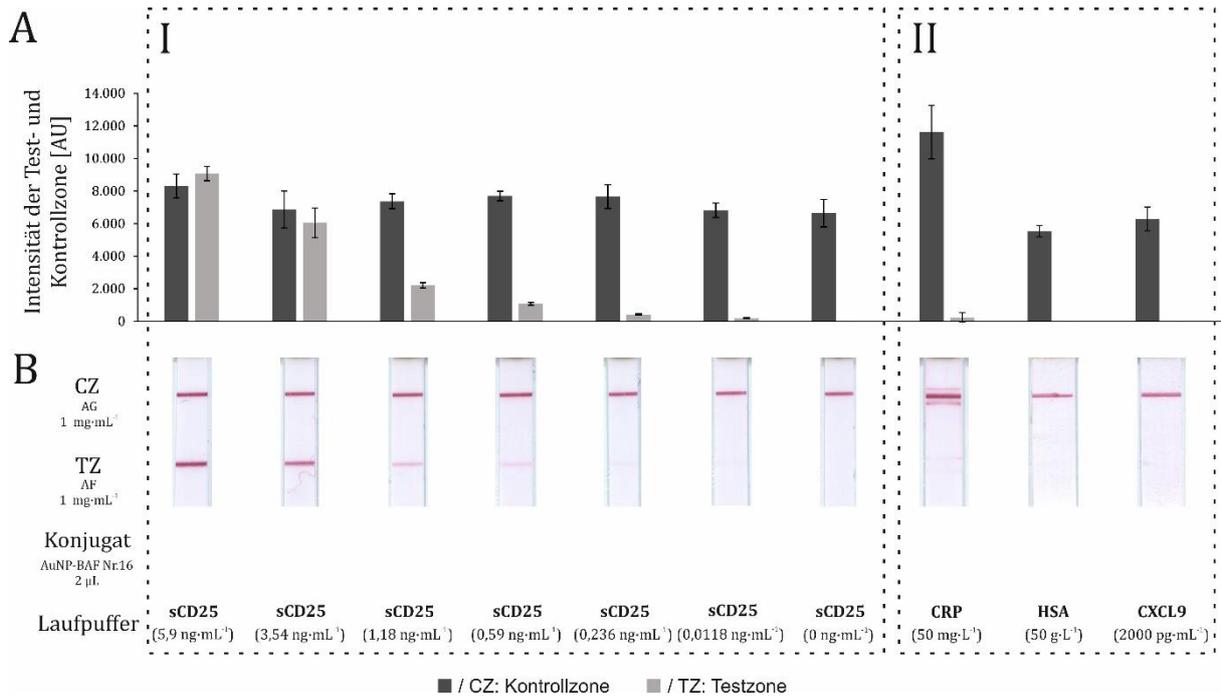
bei der Auswertung mittels ImageJ in den dazugehörigen Graphen gut erkennbar (Abbildung 4-42A). Sowohl mit dem bloßen Auge als auch bei der grafischen Auswertung sind die Unterschiede der Signalintensitäten bei den verschiedenen Inkubationszeiten nur gering. Im Gegensatz dazu ist die Signalintensität zu den LFAs mit Vorinkubation mindestens doppelt so hoch. Bei den LFAs ohne Vorinkubation ist ab  $0,59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  keine ausreichende Rotfärbung mehr erkennbar; LFAs mit Vorinkubation waren für diese sCD25-Konzentration noch visuell auswertbar. Aufgrund der geringen Signalunterschiede bei geringen sCD25-Konzentrationen und damit der LFA als Schnelltest schon nach kurzer Zeit ein Ergebnis liefert, wurde bei weiteren Versuchen eine Vorinkubation von 15 Minuten gewählt.

Für eine höhere Reproduzierbarkeit des Testergebnisses wurden im Folgenden die bisher manuell aufgetragenen Test- und Kontrollzonen mit dem Nano-Plotter 2.1 (GeSim) gedruckt. So wurden zwei Linien mit einem Abstand von 0,1 mm untereinander gedruckt. Für eine Linie wurden bei einem 4 mm breiten LFA-Streifen ca.  $0,2 \text{ }\mu\text{L}$  AF (TZ) bzw. AG (CZ) aufgetragen. Nach dieser Umstellung von der manuellen Auftragung der Test- und Kontrollzonen hin zu mittels Nano-Plotter gefertigten Linien, befand sich eine geringere Konzentration des FAs auf der Membran. Unter Verwendung dieser LFAs wurde das Konjugat erneut optimiert und bei der Konjugation geringere Mengen an DAs zu den AuNPs dazugegeben als zunächst im Flokkulationstest (Kapitel 4.3.3.1, Abbildung 4-40) eruiert wurde (bisher  $9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Nr. 24). Es wurden Konjugate mit einer Antikörperkonzentration von  $4,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Nr. 12) und  $5,87 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Nr. 16) hergestellt. Die verwendeten Konjugate mit der Nr. 12 und Nr. 16 wiesen auch im Flokkulationstest eine hohe Stabilität und mit reinen AuNPs vergleichbare Absorptionsspektren auf. Für das Konjugat Nr.16 wurde die geringste Antikörperkonzentration verwendet, die für eine hohe AuNP-Stabilität mindestens nötig war (Abbildung 4-40). Zur Stabilisation von BAF wurde BSA als Carrier-Protein von der Herstellerfirma während der Produktion dazugegeben ( $50 \text{ }\mu\text{g}$  BSA pro  $1 \text{ }\mu\text{g}$  BAF). Wird die BAF-Lösung nun für die Konjugation eingesetzt, konkurrieren Antikörper und BSA um Bindungsplätze auf der Oberfläche der AuNPs. Um die Antikörpermenge während der Konjugation zu erhöhen wurde zur Konjugation eine höhere Antikörperkonzentration verwendet. Nach der Konjugation wurde dann zum Blockieren noch freier Bindeplätze auf dem AuNP zusätzliches BSA hinzugegeben. Byzova et al. haben gezeigt, dass die Antikörperkonzentration bei der Konjugation monoklonaler Antikörper um das Sechsfache geringer eingesetzt werden kann, als der Flokkulationstest ergibt und die funktionalen Eigenschaften der Konjugate nach Stabilisierung mit BSA dennoch beibehalten werden. Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht generell für polyklonale Antikörper nachgewiesen werden.<sup>157</sup> In Abbildung 4-43 sind die LFAs dargestellt, bei denen die zwei verschiedenen Konjugate getestet wurden.



**Abbildung 4-43: Vergleich von zwei AuNP-BAF-Konjugaten mit einer BAF-Konzentration von 4,3  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> (Nr. 12) und 5,87  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> (Nr.16) bei unterschiedlichen sCD25-Konzentrationen (5,9-0 ng·mL<sup>-1</sup>) im Laufpuffer. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Die Scans der relevanten Membranbereiche wurden nach 60 min nach Testbeginn aufgenommen. Es wurden 2  $\mu$ L AuNP-BAF auf dem *Release Pad*, Antikörper AF als sCD25-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet.**

Beide Konjugate bilden ähnlich intensive Rotfärbungen der Test- und Kontrolllinien aus. Bei abnehmender sCD25-Konzentration sinkt auch die Signalintensität. Diese ist bei 0,236 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 in der Testlinie mit dem bloßen Auge nur schwer zu erkennen, auch die mittels ImageJ ausgewertete Intensität bestätigt dieses. Durch die beiden vorangegangenen Verfahrensoptimierungen, Verminderung der DAs auf den Konjugaten sowie Vorinkubation der Proben, konnte die Sensitivität des LFAs erhöht werden. Bei anschließender Vereinigung beider Verfahrensweisen konnte jedoch keine weitere Erhöhung der Sensitivität erreicht werden (Abbildung 4-44 I). Zusätzlich wurden der LFA-Aufbau mit drei Kontroll-Proteinen (CRP, HSA und CXCL9) durchgeführt. CXCL9 wurde als Kontroll-Protein eingesetzt, da - wie in der Einleitung ausgeführt - CXCL9 im menschlichen Körper auch erhöht im Plasma oder Urin i. R. einer Nierenabstoßung auftreten kann.



**Abbildung 4-44:** LFAs (B) mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen (5,9-0 ng·mL<sup>-1</sup>, I) und Kontrollproteinen (CRP, 50 mg·L<sup>-1</sup>; HSA, 50 g·L<sup>-1</sup>; CXCL9, 2000 pg·mL<sup>-1</sup>, II) im Laufpuffer. Die Proben wurden für 15 Minuten mit AuNP-BAF vorinkubiert. A) Mittels ImageJ quantifizierte Intensität der Test-(TZ, hellgrau) und Kontrollzonen (CZ, dunkelgrau) der LFAs. B) Die Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 60 min nach Testbeginn. Es wurden 2 µL AuNP-BAF (Nr.16) auf dem *Release Pad*, Antikörper AF als sCD25-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. N=3.

Auf den LFAs mit den Kontrollproteinen HSA und CXCL9 sind weder mit dem bloßen Auge noch graphisch Linien in der Testzone erkennbar (Abbildung 4-44 II). In der Test- und Kontrollzone des LFA-Streifens, der mit CRP im Laufpuffer durchgeführt wurde, sind ober- und unterhalb der eigentlichen Test- und Kontrolllinie leichte, rotgefärbte Linien entstanden.

In (Tabelle 4-4) sind alle Optimierungsstrategien dieses Kapitels mit verwendeten Antikörpern und Konjugaten sowie den Ergebnissen zusammengefasst. In der ersten Zeile sind dabei die Bedingungen vom ersten LFA ausgeführt und im letzten der fertig optimierte LFA.

**Tabelle 4-4: Verwendete Optimierungsstrategien zum Aufbau eines LFAs zu Detektion von sCD25. In der ersten Zeile sind die Ausgangsbedingungen aufgelistet. In der letzten Zeile ist die Zusammensetzung für den fertigen LFA dargestellt. In der Kontrollzone wurde immer der Antikörper AG (1 mg·L<sup>-1</sup>) verwendet. Wurden nicht ausreichend Konzentrationen getestet, gibt es keine Angabe (k.A.) zu ‚maximale Rotfärbung in TZ‘.**

| <b>Änderung im LFA-Aufbau</b>   | <b>Fängerantikörper</b><br>(Menge & Konzentration)              | <b>Konjugat</b><br>(Menge & Konzentration) | <b>Maximale Rotfärbung in TZ</b> | <b>Sensitivitätssteigerung</b>            |
|---|---|--|----------------------------------|---|
| <b>Membran 140 mit backing</b>  | <b>AF</b><br><b>(5-7x0,1 µL,</b><br><b>1 mg·L<sup>-1</sup>)</b> | <b>AuNP-BAF</b><br><b>(1 µL)</b>           | <b>1,18 ng·mL<sup>-1</sup></b>   |   |
| Membran 180 mit backing   | AF<br>(5-7x0,1 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                       | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 1,18 ng·mL <sup>-1</sup>         | nein                                      |
| ABX als Fängerantikörper eingesetzt   | ABX<br>(0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                          | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 0 ng·mL <sup>-1</sup>            | Nein                                      |
| MAB als Fängerantikörper eingesetzt   | MAB<br>(0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                          | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 1,18 ng·mL <sup>-1</sup>         | nein                                      |
| Höhere Konzentration der TL   | AF<br>(2x0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                         | AuNP-AF<br>(2 µL)                          | 1,18 ng·mL <sup>-1</sup>         | Nein                                      |
| Verschiedene Trocknungsmethoden des Antikörpers auf der TL                      | AF<br>(5-7x0,1 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                       | AuNP-AF<br>(1 µL)                          | k. A.                            | Alle TLs zeigen ein gleich starkes Signal |
| Tween 20-Zugabe zum Konjugat  | AF<br>(5-7x0,1 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                       | AuNP-AF<br>(2 µL)                          | k.A.                             | nein                                      |
| Konjugat „waschen“  | AF<br>(0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                           | AuNP-AF<br>(2 µL)                          | k.A.                             | Nicht signifikant                         |
| TZ näher an KZ aufgebracht  | AF<br>(0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                           | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | k.A.                             | nein                                      |
| Vorinkubation von AuNP-BAF mit Laufpuffer                                       | AF<br>(0,3 µL, 1 mg·L <sup>-1</sup> )                           | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 0,59 ng·mL <sup>-1</sup>         | ja  |
| Fängerantikörper mittels Nano-Plotter aufgebracht                               | AF<br>(1 mg·L <sup>-1</sup> )                                   | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 1,18 ng·mL <sup>-1</sup>         | nein                                      |
| Verminderung der Detektionsantikörper auf den Konjugaten                        | AF<br>(1 mg·L <sup>-1</sup> )                                   | AuNP-BAF<br>(2 µL)                         | 0,59 ng·mL <sup>-1</sup>         | ja  |
| <b>Vorinkubation + Verminderung der Detektionsantikörper auf den Konjugaten</b> | <b>AF</b><br><b>(1 mg·L<sup>-1</sup>)</b>                       | <b>AuNP-BAF</b><br><b>(2 µL)</b>           | <b>0,59 ng·mL<sup>-1</sup></b>   | <b>nein</b>                               |

Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung von klinischen Proben, die ein einfaches Puffersystem nicht abbilden kann, wurden im Folgenden Patientenproben verwendet.

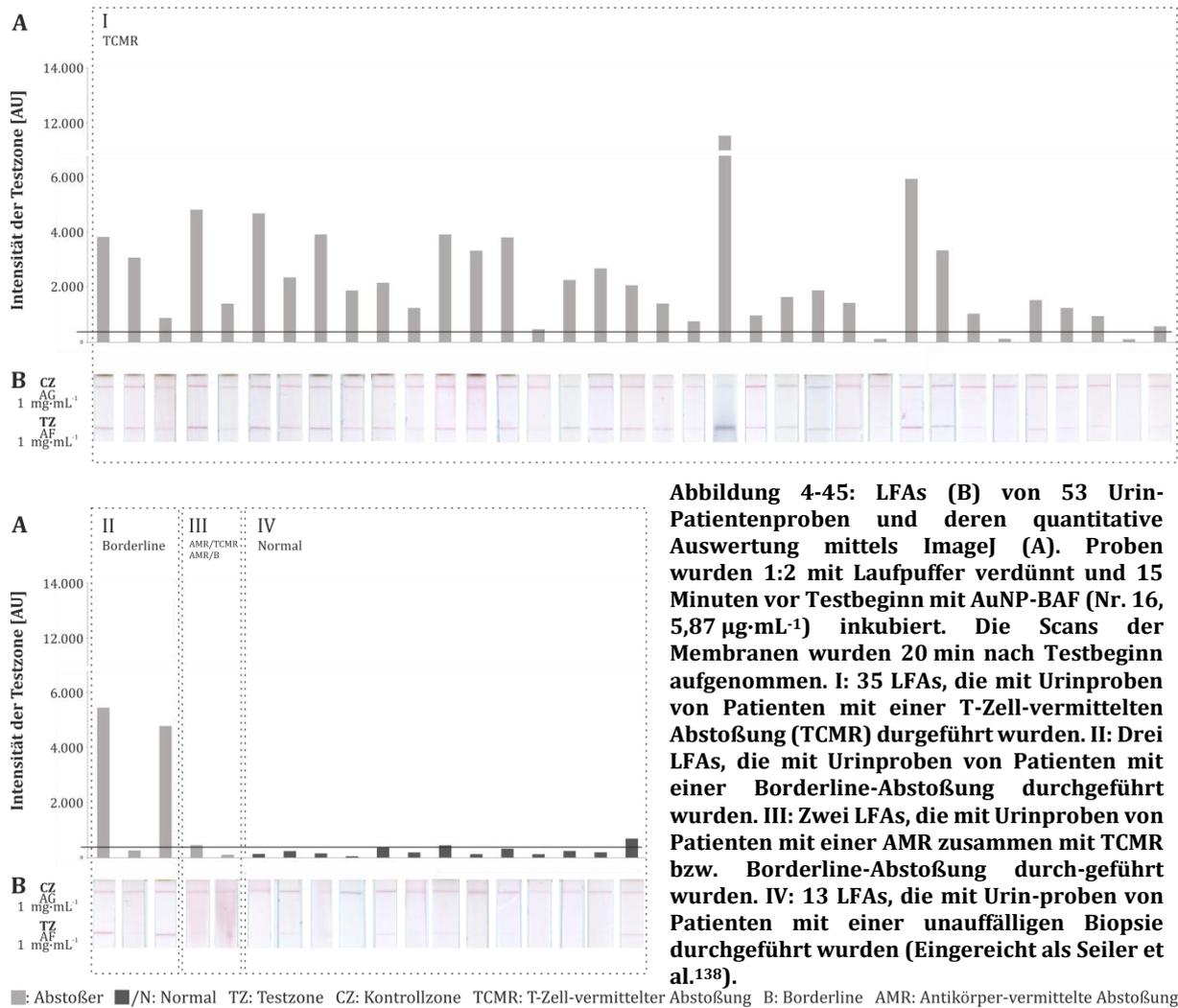
#### 4.3.3.4 Patientenproben

Die LFAs wurden mit Urin- und Plasmaproben durchgeführt, die über die BANFF-Klassifizierung nach einer Biopsie ihrer Abstoßungsart zugeordnet wurden und in Kapitel 4.3.1 zur Bestimmung der Signifikanz und relevanten Konzentration von sCD25 als Abstoßungsbiomarker verwendet wurden. Die Proben wurden nach BANFF in T-Zell-vermittelte Abstoßung (TCMR), Borderline-Abstoßung (Borderline), Antikörper-vermittelte Abstoßung (AMR) und Normal (Patienten mit einer unauffälligen Biopsie, erfüllen keine der Kriterien für eine Abstoßung) klassifiziert. Für die LFA-Durchführung wurde in der Testzone FA-AF ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) aufgetragen. Die Patientenproben wurden 2-fach verdünnt und 15 Minuten vor dem Teststart zusammen mit AuNP-BAF (Nr.16,  $2 \mu\text{L}$ ) in einem separaten Reaktionsgefäß vorinkubiert. Die Plasmaproben färbten die Membran gelb, wodurch die LFAs nicht mehr auswertbar waren und im Folgenden nur noch Urinproben verwendet wurden. Insgesamt wurden 53 Urinproben von Patienten mit einer TCMR, Borderline-Abstoßung oder AMR gemischt mit Borderline-Abstoßung oder AMR gemischt mit TCMR sowie Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (Normal) verwendet (Tabelle 4-5).

**Tabelle 4-5: Anzahl verwendeter Urinproben aufgeteilt nach ihrer BANFF-Klassifikation und Kohorte.**

| BANFF-Klassifikation | 2. Kohorte | 3. Kohorte |
|----------------------|------------|------------|
| TCMR                 | 4/35       | 31/35      |
| Borderline           | 2/3        | 1/3        |
| AMR, TCMR            | 1/1        | -          |
| AMR, Borderline      | 1/1        | -          |
| Normal               | 3/13       | 10/13      |

Die Scans der relevanten LFA-Membranabschnitte (A) und die quantitative Auswertung der Rotfärbung in den Testzonen mittels ImageJ (B) sind in Abbildung 4-45 dargestellt. Die Scans der Membranen wurden nach 20 Minuten aufgenommen, da sie zu diesem Zeitpunkt bereits klare Testergebnisse aufwiesen.



**Abbildung 4-45: LFAs (B) von 53 Urin-Patientenproben und deren quantitative Auswertung mittels ImageJ (A). Proben wurden 1:2 mit Laufpuffer verdünnt und 15 Minuten vor Testbeginn mit AuNP-BAF (Nr. 16, 5,87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) inkubiert. Die Scans der Membranen wurden 20 min nach Testbeginn aufgenommen. I: 35 LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR) durchgeführt wurden. II: Drei LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer Borderline-Abstoßung durchgeführt wurden. III: Zwei LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer AMR zusammen mit TCMR bzw. Borderline-Abstoßung durchgeführt wurden. IV: 13 LFAs, die mit Urin-proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie durchgeführt wurden (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).**

In Abbildung 4-45 I sind die 35 LFAs aufgeführt, die mit Proben von Patienten mit einer TCMR durchgeführt worden sind. Die Testzonen dieser Patienten weisen größtenteils eine eindeutige Rotfärbung in der Test- und Kontrollzone auf. Von den drei LFAs, die mit Proben von Patienten mit einer Borderline-Abstoßung durchgeführt wurden, zeigen zwei eine eindeutige Rotfärbung der Testzone an, der dritte nicht (II). Nach der BANFF-Klassifikation ist eine Borderline-Abstoßung eine begrenzte Form einer TCMR und somit mit diesem LFA voraussichtlich ebenfalls detektierbar. Auch bei den zwei LFAs mit Proben von Patienten mit einer AMR und TCMR bzw. AMR und Borderline-Abstoßung, weist einer eine leichte Rotfärbung der Testzone auf und der andere nicht (III). Auch diese fünf LFAs zeigen eine Rotfärbung in der Kontrollzone. Zwei der 13 LFAs mit Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (Normal) zeigten leichte und zwei LFAs eindeutige Rotfärbungen in der Testzone (IV). Die Intensität der Rotfärbung der Testzone korreliert nicht mit den untersuchten sCD25-Konzentrationen der Proben. Ein LFA ist ein qualitatives Nachweisverfahren und dient nicht der Konzentrationsbestimmung. Er liefert die binäre Antwort "Ja" (Abstoßung/Entzündung) oder "Nein" (Normal/gesund). Bei der Herstellung kann es zu Unregelmäßigkeiten bei der Auftragung der FAs gekommen sein, da diese durch eine

Aneinanderreihung vieler Punkte hinter einander realisiert und nicht als durchgehende Linie aufgetragen wurden. Zusätzlich können sich in den verschiedenen Patientenproben noch andere Proteine oder Bestandteile befinden, die zu einer Kreuzreaktion führen können.<sup>165</sup>

Zur Unterscheidung von Proben eines Patienten mit einer TCMR und eines Patienten mit einer unauffälligen Biopsie wurde ein Schwellenwert von 400 AU eingeführt. Alle LFAs mit Signalintensitäten über 400 AU (> 400 AU) werden als positiv gewertet, alle LFAs mit geringeren Signalintensitäten (< 400 AU) als negativ (siehe Linie in Abbildung 4-45A). Durch die Einführung dieses binären Systems ergeben sich fünf der 40 LFAs, die mit Proben von Patienten mit einer durch eine Biopsie nachgewiesenen Abstoßung durchgeführt wurden, als negativ (falsch negativ). Zwei der 13 LFAs mit Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie zeigten ebenfalls ein positives Ergebnis an und sind somit falsch positiv (Tabelle 4-6).

**Tabelle 4-6: Auswertung des sCD25-Lateral Flow Assays (LFA) mit Angabe der erkrankten und gesunden Personen in Zusammenhang mit dem LFA-Ergebnis (positiv/negativ) und die daraus resultierende Einordnung in richtig positiv (RP), falsch positiv (FP), falsch negativ (FN) und richtig negativ (RN).**

|                                  | <b>Patient ist krank<br/>(RP + FN)</b> | <b>Patient ist gesund<br/>(FP + RN)</b> |
|----------------------------------|--|---|
| <b>LFA positiv<br/>(FP + RP)</b> | Richtig positiv (RP)<br>N = 35         | Falsch positiv (FP)<br>N = 2            |
| <b>LFA negativ<br/>(RN + FN)</b> | Falsch negativ (FN)<br>N = 5           | Richtig negativ (RN)<br>N = 11          |

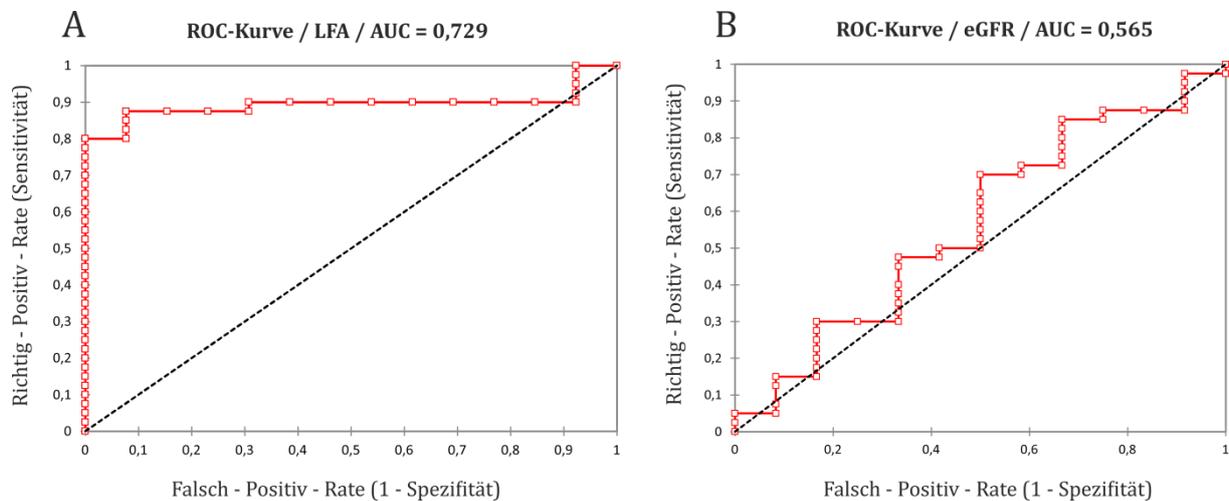
Anhand der richtig und falsch positiven sowie negativen Ergebnisse kann die Sensitivität sowie die Spezifität errechnet werden. Die Sensitivität gibt an, zu welchem Prozentsatz erkrankte Patienten durch den Test erfasst werden. Die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, dass tatsächlich Gesunde im Test auch gesund sind. Die Sensitivität des hier entwickelten LFAs liegt bei 87,5 % und die Spezifität beträgt 84,6 %. Als bisheriger Goldstandard zur Detektion einer Nierenabstoßung gelten die Biopsie und die glomeruläre Filtrationsrate. Die glomeruläre Filtrationsrate gibt das von den Glomeruli der Nieren filtrierte Volumen pro Zeiteinheit an und wird entweder über die Insulin- oder Kreatininkonzentration bestimmt. Zur Vereinfachung kann mit verschiedenen Formeln die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) berechnet werden. Als etablierte Formel wird die eGFR unter Berücksichtigung des Kreatinin-Wertes, des Geschlechts, des Alters und ethnischer Merkmale die CKD-EPI-Formel (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) verwendet:<sup>166</sup>

$$GFR = 141 \times \min\left(\frac{Skr}{\kappa}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{Skr}{\kappa}, 1\right)^{-1,209} \times 0,993^{Age} \times 1,018[\text{bei Frauen}] \times 1,159[\text{bei Männern}]$$

Skr = Serum Kreatinin,  $\kappa$  = 0,7 für Frauen/0,9 für Männer,  $\alpha$  = 0,329 für Frauen/-0,411 für Männer, Serum Kreatinin Level wurden zum Zeitpunkt der Biopsie gemessen.

Mit Hilfe der CKD-EPI-Formel, dem Serum-Kreatinin-Wert am Tag der Biopsie und einem festgesetzten *cut-off* von  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  wird für die im LFA verwendeten Patientenproben eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 30,8 % erreicht (Anhang, Tabelle 7-2). Hier liegt vor allem die Spezifität (30,8 %) deutlich unter der des entwickelten LFAs (84,6 %). Dies bedeutet, dass mit dem LFA im Vergleich zur Diagnose-Stellung mittels eGFR die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass tatsächlich Gesunde, bei denen keine Abstoßung vorliegt, auch dementsprechend angezeigt werden.

Mit der *Receiver Operating Characteristics* (ROC) Kurve kann ein Überblick über die diagnostische Güte eines Tests gewonnen werden. Dabei wird für verschiedene *cut-off*-Werte die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) gegen die Falsch-Positiv-Rate ( $1 - \text{Spezifität}$ ) aufgetragen (Abbildung 4-46).



**Abbildung 4-46: Receiver Operating Characteristics (ROC) – Kurven, die die Diskriminierung zwischen Proben von Patienten mit einer Abstoßungsreaktion von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (A) mittels des entwickelten Lateral Flow Assays zum Nachweis von sCD25 mit einer Fläche unter der Kurve (AUC, *area under curve*) von 0,894 und (B) unter Verwendung des Serum-Kreatinin-Wertes mit einer AUC von 0,565 beschreibt. Die ROC-Analyse wurde mithilfe von MS Excel XLSTAT durchgeführt (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>).**

Zur Bewertung eines diagnostischen Tests kann die Fläche unter der Kurve (AUC, *area under curve*) der ROC-Kurve hinzugezogen werden; je höher der Wert ist, desto eine bessere Güte liegt vor. Die Ergebnisse der ROC-Analysen zeigen, dass die AUCs bei der Verwendung der Intensität der Testzone der LFAs eine höhere Güte aufweist (AUC=0,729) als bei Verwendung der dazugehörigen eGFR (AUC=0,565). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein signifikanter Abfall der eGFR innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls vor der Transplantatbiopsie spezifischer und indikativer für eine TCMR wäre. Diese Daten lagen zu den verwendeten Patientenproben jedoch nicht vor.

Die hohe Spezifität und Sensitivität zeigt, dass der entwickelte LFA zur Detektion von sCD25 Proben von Patienten mit einer TCMR oder einer Diagnose mit begleitender TCMR von Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie unterscheiden kann.

### 4.3.3.5 Fazit

Ziel dieser Arbeit ist es ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay (LFA)-System zu entwickeln, das eine Abstoßungsreaktion nach vorangegangener Nierentransplantation detektiert. Dazu wurde in diesem Teil der Arbeit ein LFA zur Detektion von sCD25 entwickelt. CD25 ist eine Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R), welcher auf T-Zellen ausgebildet werden kann. Die lösliche Form von CD25 (sCD25) ist proportional zur Expression von CD25 auf der Zelloberfläche.

In Microarray-Versuchen haben sich im Sandwich-Format FA-AF und BAF\* als Antikörperpärchen als optimal erwiesen und wurden somit für den Aufbau eines LFAs verwendet. Für den Aufbau eines LFAs zur Detektion von sCD25 in Patientenproben wurde zunächst ein LFA mit im Laufpuffer zugesetztem sCD25 optimiert. Mit der Einführung einer Vorinkubation von 15 Minuten konnte eine Rotfärbung in der Testzone bei einer sCD25-Konzentration von  $0,59 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  erreicht werden. Bei der Anwendung von 53 Patientenproben auf dem Test konnte erfolgreich eine klare Unterscheidung zwischen Patientenproben mit einer TCMR oder T-Zell-vermittelten-Borderline-Abstoßung und Patientenproben mit einer unauffälligen Biopsie realisiert werden. Dabei ergaben sich eine Sensitivität von 87,5 % sowie eine Spezifität von 84,6 %. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des entwickelten LFAs spezifischer ist als die Bestimmung der eGFR am Tag der Transplantatbiopsie.

### 4.4 CXCL9

Der dritte LFA, der als Teil des "Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik" EFRE-Projektes in der vorliegenden Arbeit entwickelt werden sollte, soll als möglichen weiteren Abstoßungsbiomarker das Protein CXCL9 detektieren können. CXCL9 (auch *Monokine induced by Gamma-Interferone*, MIG) ist ein Signalprotein aus der Gruppe der homologen Chemokine und bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR3. Während einer Entzündungsreaktion wird CXCL9 vermehrt gebildet, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst und Immunzellen angelockt werden.

Zunächst wurde die Eignung von CXCL9 als Biomarker einer Nierenabstoßung sowie die für den Nachweis einer Abstoßung relevante CXCL9-Konzentration bestimmt (Kapitel 4.4.1). Daraufhin wurde das Protein CXCL9 von verschiedenen Firmen mittels Chemotaxistest auf seine biologische Aktivität untersucht (Ergebnisse nicht dargestellt). Das CXCL9 mit der höchsten biologischen Aktivität wurde zur Generierung von CXCL9-spezifischen Antikörpern verwendet (Kapitel 4.4.2), die anschließend mittels Microarray untersucht wurden (Kapitel 4.4.3). Darauf aufbauend und mit den Kenntnissen aus den vorigen Kapiteln wurde der LFA entwickelt und optimiert (Kapitel 4.4.4).

#### 4.4.1 Bestimmung der relevanten Biomarker-Konzentration

Zur Eignung von Biomarkern für nicht-invasive Überwachungsmethoden von Nierentransplantierten wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt und potentielle Biomarker ermittelt. CXCL9 wurde dabei von verschiedenen Forscherteams als nicht-invasiver Marker in Urin bei einer akuten Nierenabstoßung identifiziert.<sup>100,167-169</sup>

Für Untersuchung, ob CXCL9 als Biomarker für eine Nierenabstoßung geeignet ist, wurden von der Medizinischen Hochschule Hannover in zwei unabhängigen Kohorten Urin- und Plasmaproben sowie von der ersten Kohorte Lysate aus Nierenstanzzylindern der Transplantatbiopsien der Nierentransplantatempfänger erstellt und gesammelt. Die Biopsien waren eindeutig nach der BANFF-Klassifikation eingeordnet worden. Die erste Patientenkohorte wurde von Prof. Dr. Blume in einem Projekt des IFB-Tx gesammelt und zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christine Falk am Institut für Transplantationsimmunologie der Medizinischen Hochschule Hannover analysiert. Die Patientenproben der zweiten Kohorte wurden als Teil des EFRE-Projektes "Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik" mittels Protein-Multiplex-Analyse (Biorad) im Institut für Technische Chemie analysiert, im Rahmen dessen auch die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Untersuchungen von Biopsie-Lysaten der ersten Kohorte (Ergebnisse nicht dargestellt, da noch nicht veröffentlicht) weisen darauf hin, dass CXCL9 signifikant erhöht in der Nierenrinde bei Proben von Patienten mit AMR und Borderline-Abstoßung auftritt. Egelkamp et al. konnten bei Patienten mit einer AMR eine erhöhte CXCL9-Konzentration auch im Nierenmark verzeichnen.<sup>170</sup> Hierbei scheinen die Spenderendothelzellen im Zusammenspiel mit T- und NK-Zellen Einfluss auf die Mikroumgebung nehmen zu können und als Antwort Chemokine und Zytokine auszuschütten.<sup>170</sup>

Zusätzlich zur Untersuchung der Biopsie-Lysate wurden die CXCL9-Konzentration der Urin- und Plasmaproben ermittelt. Dabei konnte eine erhöhte CXCL9-Konzentration in Proben von Patienten, die eine AMR oder Borderline-Abstoßung nach BANFF-Kriterien aufweisen, und Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (Normal) gezeigt werden. In Tabelle 4-7 sind die entsprechenden CXCL9-Konzentrationen sowie die Anzahlen der verwendeten Urin- und Plasmaproben der 2. Kohorte sowie deren Klassifikation nach BANFF aufgelistet. Als Richtwert zur Entwicklung des LFAs werden für Urin CXCL9-Konzentrationen von  $134,6 \pm 162,2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abstoßung) vs.  $34,9 \pm 30,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Normal) und für Plasma CXCL9-Konzentration von  $683,8 \pm 699,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abstoßung) vs.  $213,6 \pm 160,2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Normal) verwendet.

**Tabelle 4-7: CXCL9-Konzentrationen der Urin- und Plasmaproben aus Kohorte 2 eingeteilt nach ihrer BANFF-Klassifikation. TCMR=T-Zell-vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung, N: Anzahl analysierter Proben.**

|   | AMR                                | TCMR                 | Borderline                      | Normal                |
|---|------------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <b>Mittelwert Urin<br/>[pg·mL<sup>-1</sup>]</b>   | 145,6 ± 149,3<br>N=17<br>p<0,00001 | 115 ± 212,7<br>N=8   | 128,9 ± 159,7<br>N=8<br>p<0,002 | 34,9 ± 30,5<br>N=33   |
| <b>Mittelwert Plasma<br/>[pg·mL<sup>-1</sup>]</b> | 722,3 ± 604,9<br>N=18<br>p<0,001   | 197,1 ± 133,4<br>N=7 | 1080,2 ± 933,9<br>N=7           | 213,6 ± 160,2<br>N=33 |

Die Signifikanz der CXCL9-Konzentration zwischen Proben von Patienten mit einer diagnostisch nachgewiesenen Abstoßung (Plasma, p<0,001; Urin, p<0,000001) bzw. AMR (Urin, p<0,0001) oder einer Borderline-Abstoßung (Urin, p<0,002) und Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie, macht CXCL9 zu einem wichtigen Biomarker zur nicht-invasiven Erkennung einer Nierenabstoßung. Die ermittelten CXCL9-Konzentrationen werden in Kapitel 4.4.4 für die Etablierung des LFAs als Richtwert verwendet. Aus diesem Grund soll ein LFA entwickelt werden, der innerhalb weniger Minuten den Nachweis eines erhöhten CXCL9-Levels mit einer "Ja" (Nierenabstoßung liegt vor) oder "Nein"-Antwort (Nierenabstoßung liegt nicht vor) anzeigt.

#### 4.4.2 Antikörpergenerierung

Für den Aufbau des Lateral Flow Assays (LFAs) zum Nachweis des Proteins CXCL9 wurden in Absprache mit der Fassisi GmbH, die den Test nach Fertigstellung vermarkten wollen, keine kommerziellen Antikörper erworben. Die Herstellung eigener monoklonaler Antikörper hat den Vorteil, dass man bei einer späteren Vermarktung des LFAs nicht der Entscheidungsgewalt der Antikörper-Hersteller-Firmen unterliegt und somit verhindert, dass die Antikörper durch Sortimentänderungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Dadurch wird eine dauerhafte und beständige Produktionskette sowie gleichbleibende Qualität des Produktes gewährleistet. Stattdessen wurde das Helmholtz-Zentrum München (HZI München) beauftragt, monoklonale Antikörper gegen CXCL9 herzustellen. Dazu wurden sowohl Ratten als auch Mäuse immunisiert. Die Hybridoma-Überstände mit Antikörpern wurden vor ihrer Etablierung sowie Aufreinigung auf ihre Spezifität gegenüber CXCL9 in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum Braunschweig überprüft.

Für die Immunisierung der Tiere wurde kommerziell erworbenes rekombinant hergestelltes CXCL9 verwendet. Um sicher zu stellen, dass die produzierten Antikörper auch trotz allen im Menschen vorkommenden Modifikationen das Protein binden, wurde CXCL9 durch mit Interferon- $\gamma$  stimulierte Makrophagen von Christoph Nikolin aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering bereitgestellt.<sup>171</sup> Um die Hybridomaüberstände mittels *Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf ihre Fähigkeit als

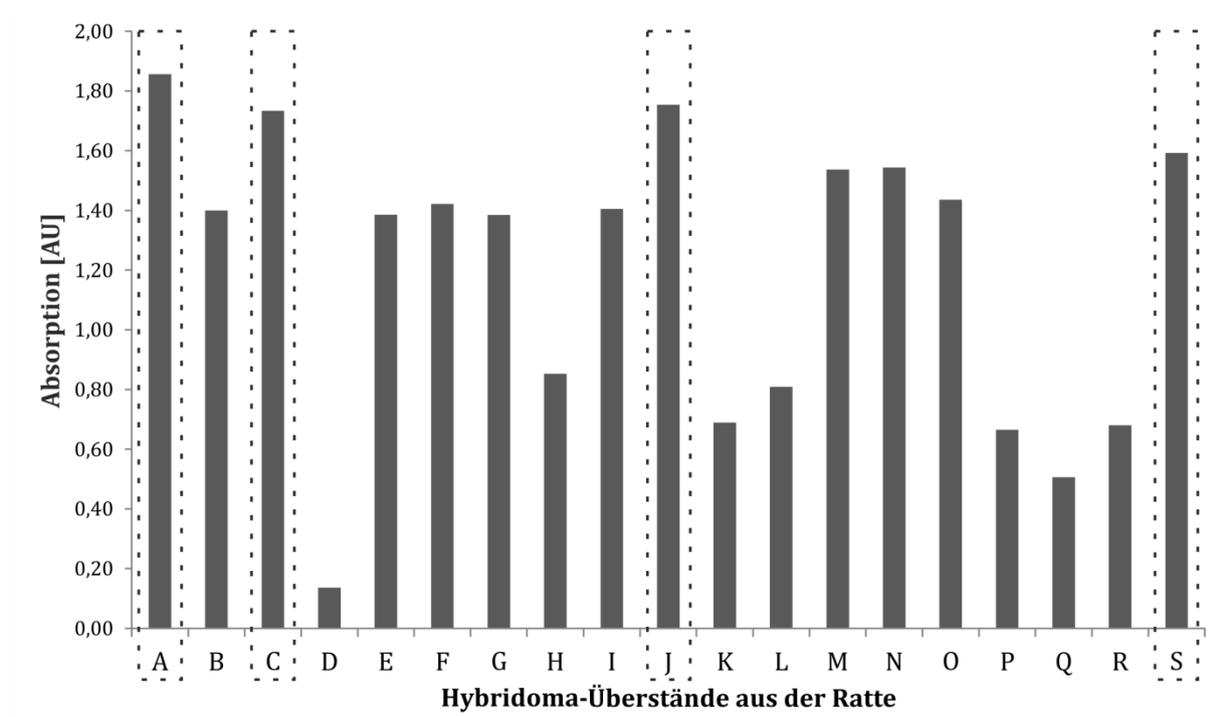
Fängerantikörper (FA) sowie als Detektionsantikörper (DA) zu untersuchen, wurde daher der Kulturüberstand der Makrophagen sowie Bestandteile des Human CXCL9/MIG DuoSet ELISA-Kits (R&D Systems) verwendet.

Eignung der Antikörper aus der Ratte als Fängerantikörper: Zunächst wurden die Antikörper aus den Überständen der Rattenkultur auf ihre Fähigkeit als FA untersucht. Insgesamt wurden 19 Antikörperüberstände (A-S) aus Ratten untersucht. Dazu wurden die Überstände zu einem gegen den Fc-Abschnitt von Rattenantikörpern gerichteten und bereits in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper gegeben. Dies bedeutet, dass neben dem zu interessierenden Protein auch andere Proteine die Möglichkeit haben an den Boden der Mikrotiterplatte zu binden und dadurch die Kapazität des ELISAs heruntersetzen können. Durch die Beschichtung der Platte mit einem Anti-Ratten-Antikörper (gegen Anti-CXCL9-Antikörper aus Rattenüberständen) wurde dieses verhindert. Anschließend wurde nacheinander CXCL9, ein Anti-CXCL9-DA, ein Biotin-markierter Antikörper gegen den DA sowie Peroxidase-markiertes Streptavidin dazugegeben (Abbildung 4-47). Die einzelnen Komponenten sollten an die jeweils darunterliegende Komponente binden, durch Waschschriffe zwischen den einzelnen Zugabeschritten wurde überschüssiges Material entfernt, sodass final nur der gezeigte Komplex vorliegen sollte.



**Abbildung 4-47: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Rattenüberstände auf ihre Fähigkeit als Fängerantikörper.**

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin als Substrat, die mittels Absorptions-Mikroplatten-Reader bei 450 nm ausgelesen wurde. Anhand der Absorption kann auf die relative Menge an vollständig ausgebildeten Komplexen geschlossen werden. Je höher die Absorption, desto mehr Komplexe wurden vollständig ausgebildet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-48 dargestellt.



**Abbildung 4-48: Überprüfung der Hybridoma-Überstände aus der Ratte auf ihre Fähigkeit als Fängerantikörper. Die vier Detektionsantikörper mit der höchsten Affinität gegenüber CXCL9 sind gestrichelt umrandet. N=2.**

In Abbildung 4-48 ist zu sehen, dass alle Antikörper, bis auf Antikörper D, CXCL9 als FA binden und somit einen Komplex aus Antikörper und CXCL9 ausbilden können. Antikörper H, K, L, P, Q und R weisen eine Absorption unter 0,9 AU auf. Die Antikörper B, E, F, G, I, M, N und O hatten mit maximal 1,55 AU eine höhere Absorption. Die vier Antikörper A, C, J und S (jeweils rot markiert) zeigen die höchsten Absorptionen und damit die besten Bindungsaffinitäten als Fänger.

Zur Affinitätsüberprüfung der vier besten Fängerantikörper (A, C, J und S) wurde ein ELISA mit dem gleichen Versuchsaufbau, aber verschiedenen CXCL9-Konzentrationen ( $0-20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durchgeführt. In Abbildung 4-49 ist zu erkennen, dass die Absorption bei allen vier FAs mit zunehmender CXCL9-Konzentration ansteigt und demnach stetig mehr CXCL9 gebunden wird.

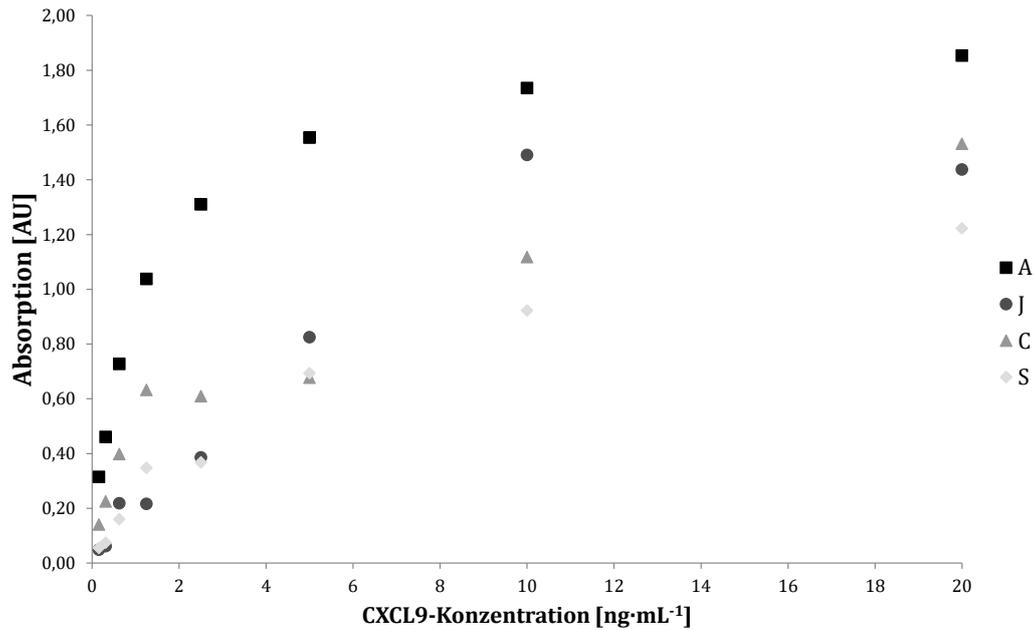
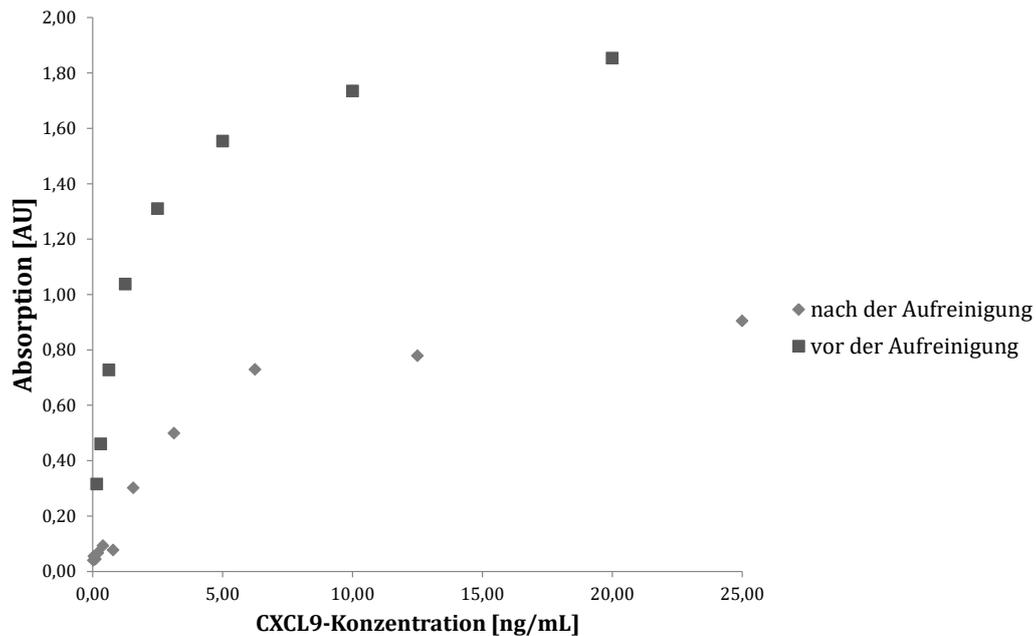


Abbildung 4-49: Überprüfung der Fängerantikörper A, J, C und S auf ihre Bindungsaffinität zu CXCL9 bei verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (0-20 ng·mL<sup>-1</sup>). N=1.

Die Antikörper C (▲), J (●) und S (◆) zeigen einen ähnlichen Verlauf und starten bei 0,156 ng·mL<sup>-1</sup> CXCL9 bei einer Absorption zwischen 0,049 AU und 0,141 AU. Anschließend steigen alle drei Kurven langsam an bis sie bei 20 ng CXCL9 bei einer Absorption zwischen 1,22 AU und 1,531 AU enden. Der FA-A (■) zeigt durchgehend die höchste Absorption sowie einen steileren Verlauf. So beginnt er bei einer Absorption von 0,315 AU bei 0,156 ng·mL<sup>-1</sup> CXCL9 und endet mit 1,853 AU bei 20 ng·mL<sup>-1</sup> CXCL9. Aufgrund der höchsten Absorptionen, vor allem im niedrigen CXCL9-Konzentrationsbereich, wurden Antikörper A und C im Folgenden weiterverwenden.

Nach der Aufreinigung der Antikörper A und C vom HZI München wurde Antikörper A nochmal mittels ELISA auf seine Affinität geprüft (Abbildung 4-50). Dabei ist durch die geringeren Absorptionswerte nach der Aufreinigung (◆) zu erkennen, dass durch die Aufreinigung ein Affinitäts-Verlust entstanden ist. Dies kann an der Aufreinigungsmethode liegen: Es wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei können extreme pH-Werte oder hohe Konzentrationen chaotroper Verbindungen zu Veränderungen oder Affinitätsverminderungen des Antikörpers führen.



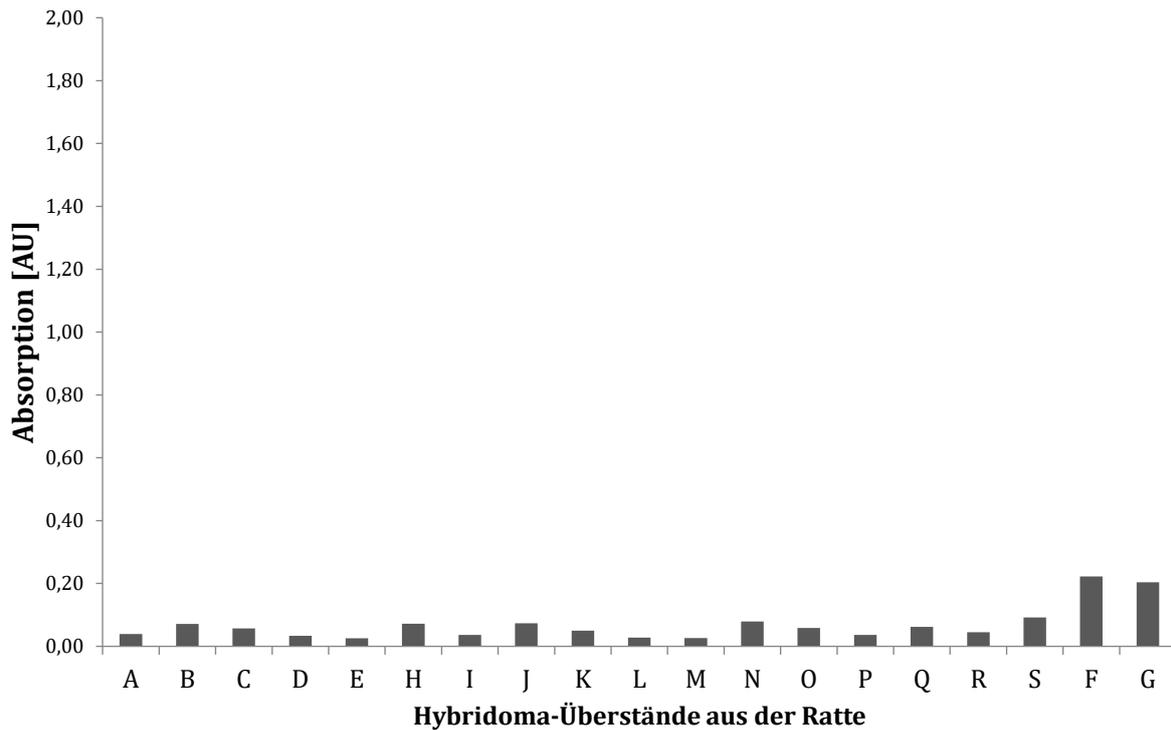
**Abbildung 4-50: Bindungsaffinität von Fängerantikörper A zu CXCL9 vor und nach der Aufreinigung.**

Eignung der Antikörper aus der Ratte als Detektionsantikörper: Die Antikörper aus den 19 Hybridoma-Überständen wurden mittels ELISA auch auf ihre Fähigkeit als DA untersucht. Hierfür wurde ein kommerziell erworbener Anti-CXCL9-FA verwendet, sodass dieser direkt zur Beschichtung der Platte verwendet werden konnte. Nach dem Beschichten wurden nacheinander CXCL9 aus Makrophagen, Rattenüberstand mit anti-CXCL9-Antikörpern, ein Anti-Ratte-Antikörper mit Peroxidase sowie Streptavidin dazugegeben. Zwischen den einzelnen Zugabeschritten wurden die überschüssigen Proteine entfernt (Abbildung 4-51).



**Abbildung 4-51: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Rattenüberstände auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper.**

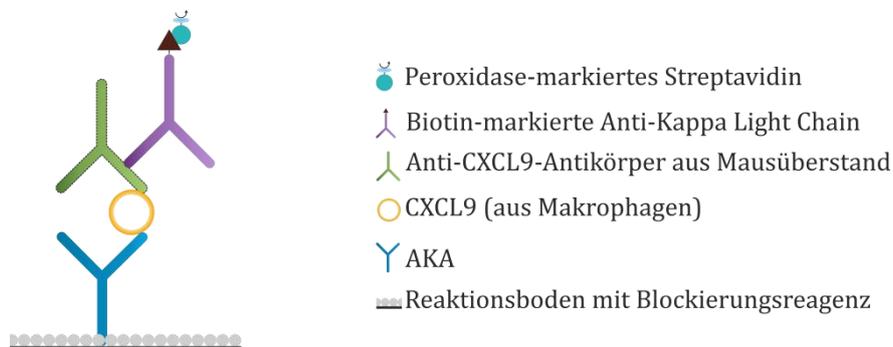
Alle Antikörper weisen eine geringe Absorption unter 0,2 AU auf, und sind somit nicht als DA geeignet. Daher wurden anschließend die Hybridomaüberstände aus der Maus untersucht.



**Abbildung 4-52: Überprüfung der Hybridoma-Überstände aus der Ratte auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper.**

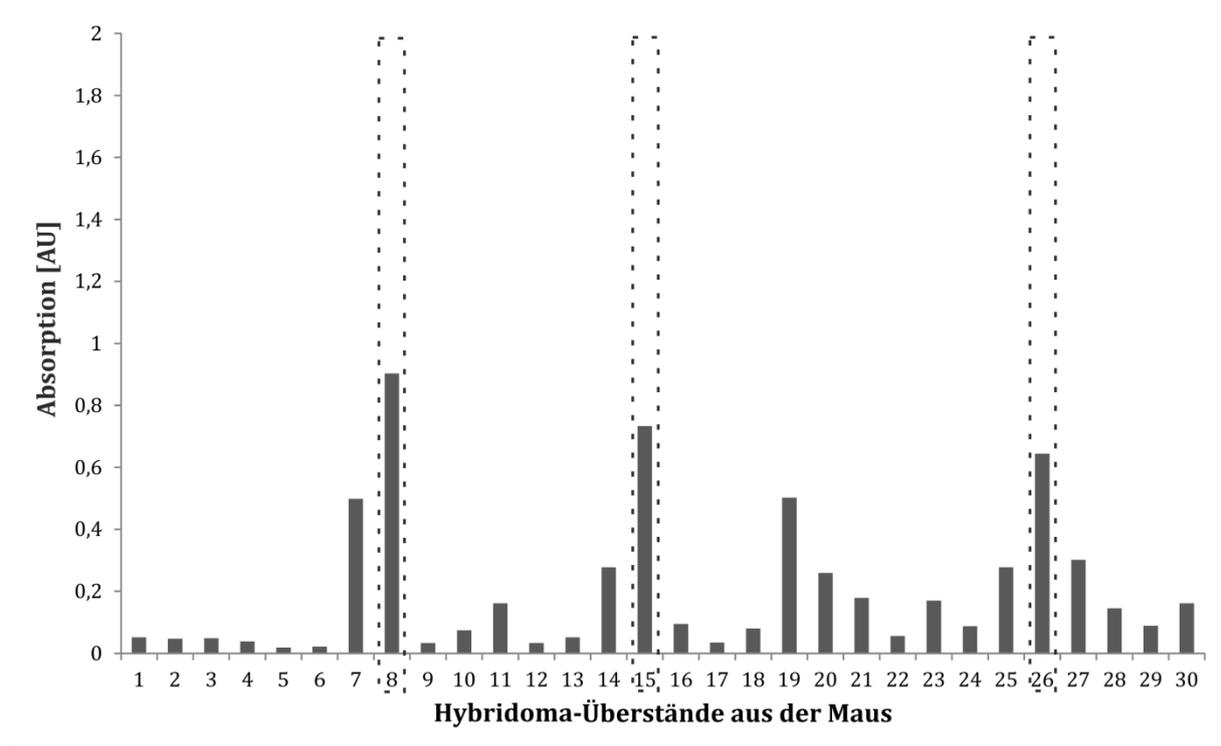
Eignung der Antikörper aus der Maus als Fängerantikörper: Die Antikörper von 30 Hybridoma-Überständen der immunisierten Mäuse wurden ebenfalls mittels ELISA auf ihre Bindungsaffinität als Fänger begutachtet. Keiner der getesteten Antikörper zeigte eine ausreichend hohe Absorption im ELISA und war somit als FA geeignet.

Eignung der Antikörper aus der Maus als Detektionsantikörper: Um herauszufinden welche Antikörper aus den 30 Überständen der Maus als gute DAs fungieren, wurden diese ebenfalls in einem ELISA untersucht. Als FA wurde der bereits aufgereinigte Antikörper A aus der Ratte verwendet, da sich dieser als der affinste Antikörper herausgestellt hat (Abbildung 4-53).



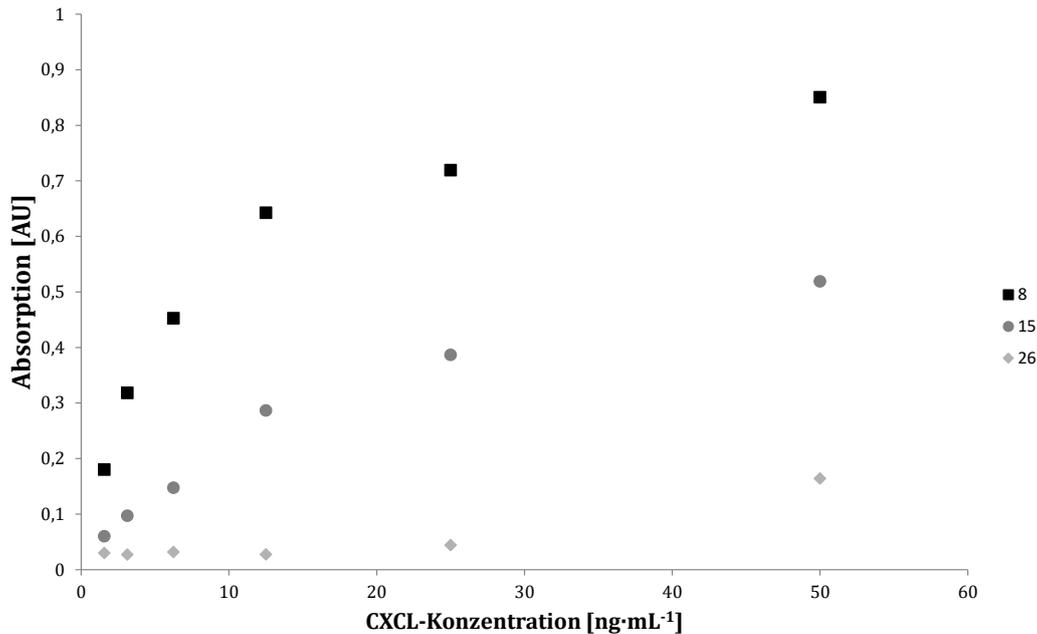
**Abbildung 4-53: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Mausüberstände auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper.**

Die untersuchten Antikörper wiesen dabei unterschiedliche Stärken als DA auf (Abbildung 4-54). So zeigen 21 Messungen eine Absorption unter 0,2 AU, sechs Messungen befinden sich zwischen 0,2 und 0,3 AU und drei weitere Messungen haben Werte zwischen 0,3 und 0,5 AU. Die Antikörper, die eine Absorption unter 0,2 AU aufweisen, sind als Detektionsantikörper nicht geeignet. Die Antikörper mit Absorptionswerten zwischen 0,2 und 0,6 AU bilden ausreichend Sandwich-Komplexe aus, wurden aber aufgrund von höheren Absorptionswerten verworfen. Die Antikörper 8, 15 und 26 zeigten die größten Absorptionswerte zwischen 0,6 und 0,9 AU und können als geeignete DAs betrachtet werden.



**Abbildung 4-54: Überprüfung Hybridoma-Überstände aus der Maus auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper. Die drei Detektionsantikörper mit der höchsten Affinität gegenüber CXCL9 sind gestrichelt umrandet. N=2.**

Mit den drei besten Antikörpern (8, 15, 26) wurde ebenfalls die Affinität gegenüber CXCL9 untersucht (1,56-50 ng·mL<sup>-1</sup>, Abbildung 4-55). Dabei zeigte der Antikörper Nr. 26 (◆) erst bei CXCL9-Konzentrationen ab 50 ng·mL<sup>-1</sup> eine schwache Bindung zum Antigen. Ab 6,25 ng·mL<sup>-1</sup> konnte der Antikörper mit der Nr. 15 (●) eine Bindung eingehen. Der Antikörper mit der Nummer 8 (■) hingegen konnte das Antigen auch schon in niedrigen Konzentrationen ab 1,56 ng·mL<sup>-1</sup> binden.



**Abbildung 4-55: Überprüfung der Detektionsantikörper 8, 15 und 26 auf ihre Bindungsaffinität zu CXCL9 bei verschiedenen Konzentrationen (1,56-50 ng·mL<sup>-1</sup>).**

Mit steigender Konzentration nahm die Bindung des Antikörpers an das Antigen wie erwartet zu. Antikörper Nr. 8 zeigte dabei durchgehend höhere Affinitäten gegenüber CXCL9 als Antikörper Nr. 15. Allerdings konnte der zu Antikörper Nr. 8 gehörige Klon in den weiteren Subklonierungsschritten der Antikörperherstellung vom HZI München nicht etabliert werden. Daher wurde der Antikörper Nr. 15 weiterverwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Antikörper A und C aus der Ratte in den ELISA-Versuchen am affinsten gegenüber CXCL9 erwiesen haben, weshalb die entsprechenden Hybridoma-Zelllinien etabliert und die Antikörper produziert wurden. Trotz der Absorptionsabnahme nach der Aufreinigung von Antikörper A wies dieser weiterhin eine gute Aktivität gegen CXCL9 auf. Aus den Hybridomaüberständen der Maus zeigten die Antikörper Nr. 8 und Nr. 15 das höchste Vermögen CXCL9 als DA zu binden. Nur die Hybridoma-Zelllinie zu Antikörper Nr. 15 konnte etabliert werden. In den folgenden Kapiteln werden daher die drei Antikörper (15, A und C) zur Entwicklung eines LFAs gegen CXCL9 verwendet. Zur Vereinfachung wird der Antikörper Nr. 15 in den kommenden Kapiteln als Antikörper B (AKB) bezeichnet. Antikörper A und Antikörper C werden im Weiteren formgleich mit AKA und AKC abgekürzt.

#### 4.4.3 Bindungsstudien mittels Microarray

Wie bereits für die Proteine CRP und sCD25 wurden auch vor der Etablierung des LFAs zur Detektion von CXCL9 Microarray-Versuche durchgeführt. Zur Detektion von CXCL9 wurden die vom HZI München hergestellten und in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum Braunschweig in Kapitel 4.4.2 überprüften Antikörper A (AKA), Antikörper 15 (AKB) und Antikörper C (AKC)

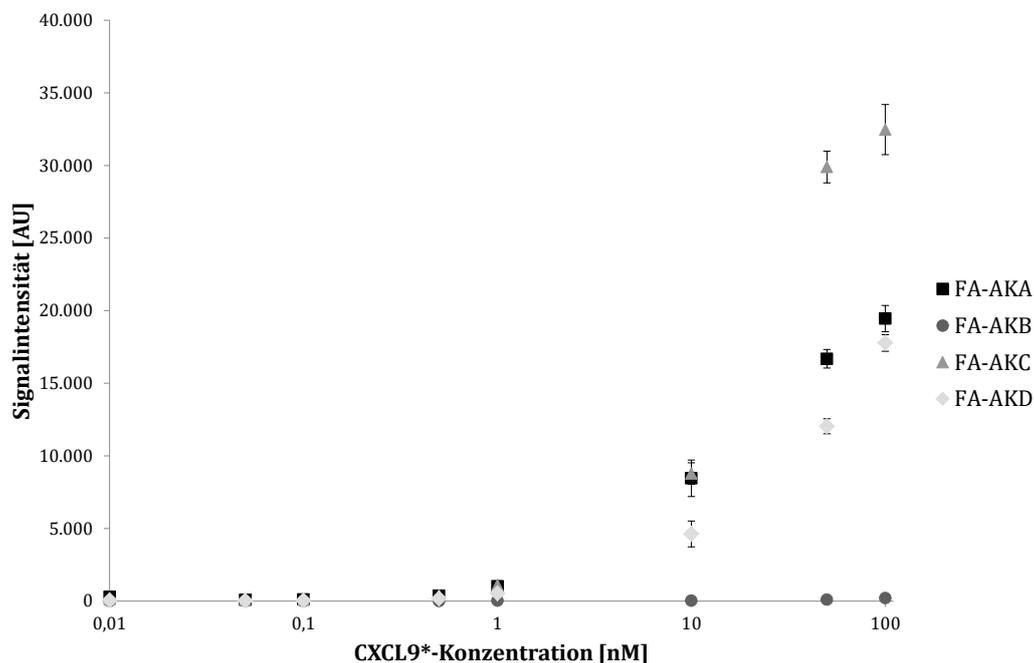
sowie ein kommerziell erworbener Antikörper (AKD) verwendet. Proteine, die für die Versuche mit einem Fluoreszenzmolekül konjugiert wurden, sind im Folgenden mit einem Stern (\*) markiert.

Ein Großteil der Ergebnisse dieses Kapitels wurde mithilfe einer Bachelorarbeit mit dem Titel „Entwicklung eines antikörperbasierten Systems zur Detektion von CXCL9“ von Charlotte Hauschildt erhalten.

#### 4.4.3.1 Forward-Microarray

In einem Forward-Microarray wird der Fängerantikörper auf die Nitrozellulose gespottet und anschließend das markierte zu interessierende Protein dazugegeben (Kapitel 4.2.2.1, Abbildung 4-6). Bei diesem Verfahren können verschiedene Eigenschaften der Antikörper wie z.B. optimale Inkubationszeiten, Konzentrationsverhalten oder Pufferzusammensetzungen getestet werden. Für detailliertere Informationen siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.2.1.

Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen: Zur Überprüfung der Affinität der vier Antikörper (AKA, AKB, AKC, AKD) gegenüber CXCL9 wurden diese auf die Membran aufgetragen ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und mit unterschiedlichen CXCL9\*-Konzentrationen (0,01 – 100 nM) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-56 dargestellt.

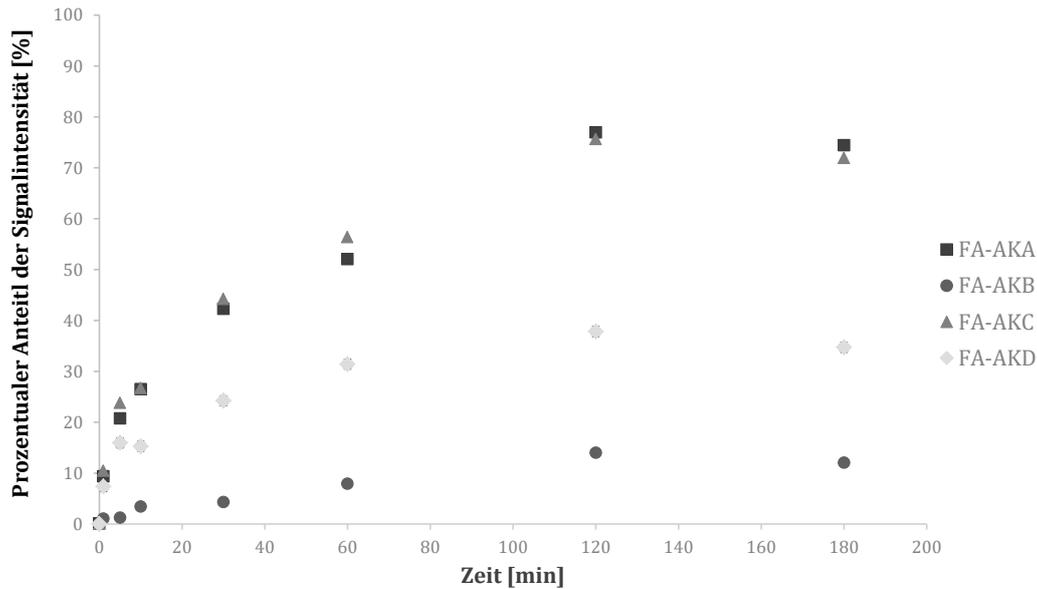


**Abbildung 4-56: Einfluss verschiedener CXCL9\*-Konzentrationen (0,01 – 100 nM) bei gleichbleibender Konzentration ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) der vier monoklonalen Fängerantikörper (FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD) im Forward-Format (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). N=8.**

Antikörper FA-AKB (●) weist über den kompletten Konzentrationsbereich eine kontinuierliche Signalintensität von 205 AU auf, was darauf hindeutet, dass hier keine Bindung zwischen

Antikörper und Antigen stattgefunden hat. Dies kann z.B. daran liegen, dass bei der Immobilisierung des Antikörpers auf der Nitrozellulosemembran das Paratop zur Bindung des Antigens verdeckt wurde. Außerdem kann es durch die Modifizierung von Cy5 an CXCL9 zu einer Konformationsänderung gekommen sein, sodass die Bindestelle von FA-AKB nicht mehr vorhanden ist.<sup>140</sup> Zusätzlich kann die herstellungsbedingte Aufreinigung des Antikörpers zum Verlust seiner Aktivität geführt haben. So können z.B. denaturierende Reagenzien bei der Elution während der affinitätschromatographischen Aufreinigung eine Konformationsänderung des Antikörpers auslösen. Zusätzlich wurde AKB zuvor in Kapitel 4.4.2 in den ELISA-Versuchen als guter DA ermittelt, die ELISA-Versuche mit den Hybridomaüberständen aus der Maus als FA waren nicht auswertbar. Eignet sich ein Antikörper als DA, besitzt er nicht zwangsläufig auch gute Eigenschaften als FA. Genauso ist ein Antikörper nicht für jede Anwendung geeignet; färbt er z.B. hervorragend ein Protein bei der Immunfluoreszenz an, muss er nicht auch im Western Blot funktionieren.<sup>163</sup> Für die Antikörper FA-AKA (■), FA-AKC (▲) und FA-AKD (◆) steigen die Signalintensitäten mit Zunahme der CXCL9\*-Konzentration. Bei niedrigeren CXCL9\*-Konzentrationen ist die Signalintensität sehr gering; das Antigen CXCL9\* wird nicht bzw. nur sehr geringfügig gebunden. Ab einer CXCL9\*-Konzentration von 1 nM steigen die Signalintensitäten an, bis FA-AKC eine Signalintensität von 32470 AU, FA-AKA eine Signalintensität von 19460 AU und FA-AKD eine Signalintensität von 17780 AU bei 100 nM CXCL9\* erreicht haben. Antikörper FA-AKC weist somit die höchste Affinität zu CXCL9\* auf.

Einfluss verschiedener Inkubationszeiten: Um zu untersuchen, welchen Einfluss verschiedene Inkubationszeiten auf die Bindungseigenschaften der vier Antikörper ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) als FAs gegen CXCL9\* haben, wurden sie unterschiedlich lange (wenige Sekunden bis 180 Minuten) mit 50 nM CXCL9\* inkubiert. In Abbildung 4-57 ist zu sehen, dass mit steigender Inkubationszeit bei allen Antikörpern auch die Signalintensität steigt.



**Abbildung 4-57:** Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (wenige Sekunden bis 180 Minuten) der CXCL9-spezifischen Antikörper (FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD;  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) gegenüber CXCL9 im Forward-Format. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Signalintensität bezogen auf die jeweils höchste in einem Versuchsdurchlauf erzielte Signalintensität (=100 %) (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>).

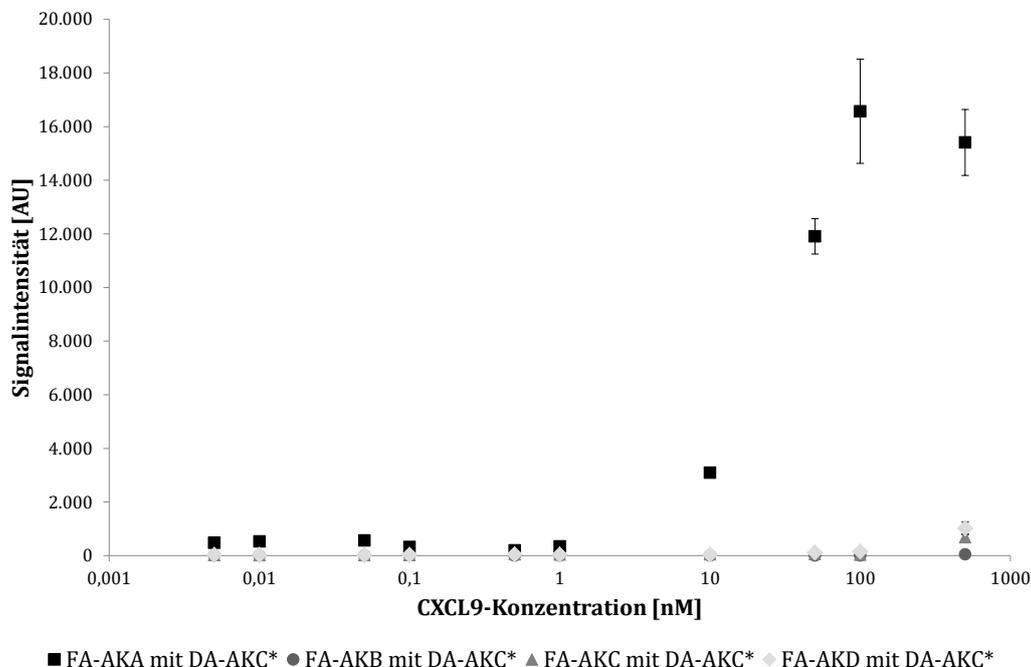
Aufgrund technischer Probleme wurden in Abbildung 4-57 für zahlreiche Bedingungen zwei Versuchsdurchläufe kombiniert ausgewertet. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Versuche prozentual gemittelt, wobei die höchste Signalintensität im jeweiligen Versuch auf 100 % gesetzt wurde. Die Antikörper AKA (■) und AKC (▲) zeigten als FA schon bei geringen Inkubationszeiten die höchsten prozentualen Anteile der Signalintensität, sodass auch in diesem kurzen Zeitraum (unter 10 min) zahlreiche Bindungen des Antigens an den Antikörper erfolgten. Ausreichend viele Bindungen bei einer geringen Inkubationszeit sind elementar für den LFA. Die Signale von FA-AKD (◆) stiegen ebenfalls mit fortschreitender Inkubationszeit an. Bei einer Inkubationszeit von 3 h war die Signalintensität bei FA-AKA und FA-AKC doppelt so hoch wie die von FA-AKD. Der prozentuale Anteil der Signalintensität von FA-AKB (●) steigt über den gesamten Versuchszeitraum nur unwesentlich an und pendelt sich bei um die 10 % ein. Dementsprechend kann der Antikörper FA-AKB für einen LFA ausgeschlossen werden. Die Antikörper AKA und AKC binden CXCL9\* gleichermaßen gut. Die Affinität von FA-AKD ist gegenüber dem Antigen dagegen nicht so stark, bindet diese jedoch auch ausreichend stark und sollte für weitere Versuche weiterverwendet werden.

#### 4.4.3.2 Sandwich-Microarray

Das Sandwich-Format dient der Überprüfung, welche der Antikörper in Kombination mit- und untereinander als Fänger- und Detektionsantikörper fungieren können. Nähere Informationen können Kapitel 4.2.2.2 entnommen werden. Für die Etablierung des LFAs ist die Beurteilung der

Antikörper im Sandwich-Format ein wichtiger Bestandteil, da diese im selben Format später auf dem LFA fungieren.

Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen: Die vier Antikörper (AKA, AKB, AKC und AKD) wurden auf ihr Zusammenspiel als FA und DA untersucht. Im Forward-Format hatte sich AKB als nicht geeigneter FA erwiesen, seine Fängereigenschaften wurden dennoch in einem Sandwich-Microarray weiter untersucht. Bindet bei einem ELISA das Antigen zunächst an den FA, finden sich bei einem LFA zuerst DA und Antigen. Die unterschiedliche Inkubationsreihenfolge der verschiedenen Komponenten kann zu unterschiedlichen Konformationsänderung des CXCL9s führen und somit für den Antikörper, der als zweites bindet, ein neues Epitop freigelegt werden. Aus diesem Grund wurde der jeweilige DA separat mit CXCL9 inkubiert, bevor die Probenlösung auf den Microarray gegeben wurde. Um zu überprüfen, welche Antikörperpaare in welcher Ausrichtung einen Komplex mit CXCL9 ausbilden können, wurden alle vier Antikörper fluoreszenzmarkiert und als DA verwendet (50 nM). Die FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) wurden wie gewohnt auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die CXCL9-Konzentration variierte zwischen 0 – 500 nM. Abbildung 4-58 zeigt die Ergebnisse des Sandwich-Microarrays mit AKC\* als DA. Die Ergebnisse der anderen DAs befinden sich im Anhang (Anhang, Abbildung 7-11 bis Abbildung 7-13). Für DA-AKC\* kann bei FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD keine zunehmende Signalintensität bei steigender CXCL9-Konzentration verzeichnet werden. Bei Verwendung von FA-AKA hingegen steigt die Signalintensität ab 10 nM bis auf ca. 16000 AU bei 100 nM CXCL9.



**Abbildung 4-58: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 – 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD,  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKC\*; 50 nM) im Sandwich-Format (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). N=8.**

Bei den Kombinationen aus FA-AKB (●), FA-AKC (▲) oder FA-AKD (◆) mit DA-AKC\* konnte mit dem Antigen CXCL9 kein Sandwich-Komplex ausgebildet werden. Ursachen hierfür wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln zur Detektion von CRP (Kapitel 4.2.2.2) und sCD25 (Kapitel 4.3.2.2) mittels Microarray ausführlich diskutiert. DA-AKC\* kann zusammen mit FA-AKA (■) und CXCL9 hingegen erfolgreich einen Sandwich-Komplex erzeugen. Ab 100 nM CXCL9 haben eventuell zu viele DA-AKCs\* jeweils ein CXCL9-Molekül gebunden, sodass diese nicht mehr an FA-AKA binden konnten. Liegt zu viel CXCL9 vor, so konkurrieren möglicherweise die markierten und nicht-markierten CXCL9-Moleküle um die FAs. Bindet ein nicht markiertes CXCL9-Molekül an einen FA, nimmt es somit einem markierten CXCL9-Molekül einen Platz weg und die Signalintensität sinkt.

Beim Einsetzen von DA-AKA\* zeigt sich ein ähnlicher Kurverlauf zu Abbildung 7-11 (Anhang). Hier ist es FA-AKC, bei dem die Signalintensität bei steigender CXCL9-Konzentration ansteigt (8000 AU bei 50 nM) und schließlich wieder sinkt (2500 AU bei 500 nM). FA-AKA, FA-AKB und FA-AKD zeigen unabhängig von der CXCL9-Konzentration kein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal (Anhang, Abbildung 7-11). Bei Verwendung von AKB\* oder AKD\* werden für alle Antikörperkombinationen lediglich maximale Signalintensitäten von 400 AU erreicht, woraus geschlossen werden kann, dass hier keine Sandwich-Komplexe gebildet wurden (Anhang, Abbildung 7-12 & Abbildung 7-13).

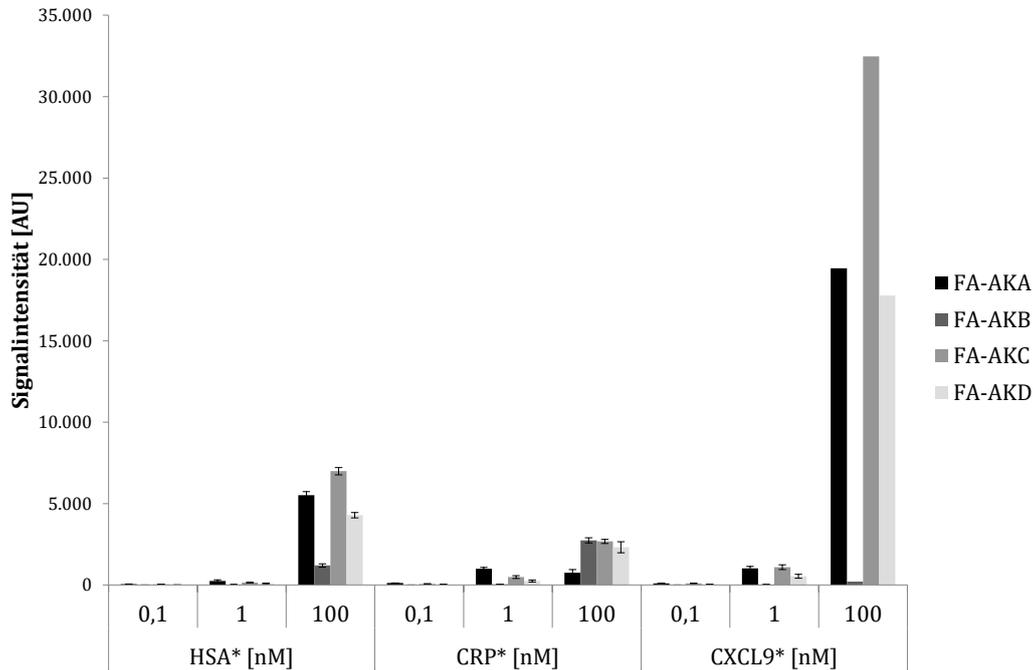
Von allen 16 möglichen Antikörperkombinationen gegen CXCL9 konnte nur die Kombination aus Antikörper AKA und AKC erfolgreich einen Sandwich-Komplex ausbilden. Prinzipiell können beide Antikörper sowohl als FA als auch als DA im Zusammenspiel verwendet werden. Wurde AKC\* als DA verwendet, war die Signalintensität jedoch höher als bei der Verwendung von AKA\* als DA. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen FA-AKA und DA-AKC eingesetzt.

### 4.4.3.3 Beurteilung der Spezifität

Da auf den zu entwickelnden LFA Serum- oder Urinproben verwendet werden sollten, wurden die Antikörper AKA und AKC auf ihre Spezifität untersucht. Hierfür wurden HSA und CRP verwendet. HSA ist das im Serum am häufigsten vorkommende Protein und wird während einer Proteinurie über den Harn ausgeschieden.<sup>146</sup> CRP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und wird vermehrt bei einer Entzündung gebildet. Die Überprüfung der Antikörper wurde sowohl im Forward- als auch im Sandwich-Format umgesetzt.

Standard Forward-Microarray: Die Spezifität der Antikörper wurde wie zuvor im Forward-Format mit den Proteinen HSA\* und CRP\* untersucht. Die Fängerantikörper AKA, AKB, AKC und AKD (1 mg·mL<sup>-1</sup>) wurden auf die Nitrozellulose aufgetragen. Die Kontroll-Proteine sowie das

Antigen CXCL9 wurden fluoreszenzmarkiert in den Konzentrationen 0,1, 1 und 100 nM zur Inkubation auf die Nitrozellulose gegeben (Abbildung 4-59).

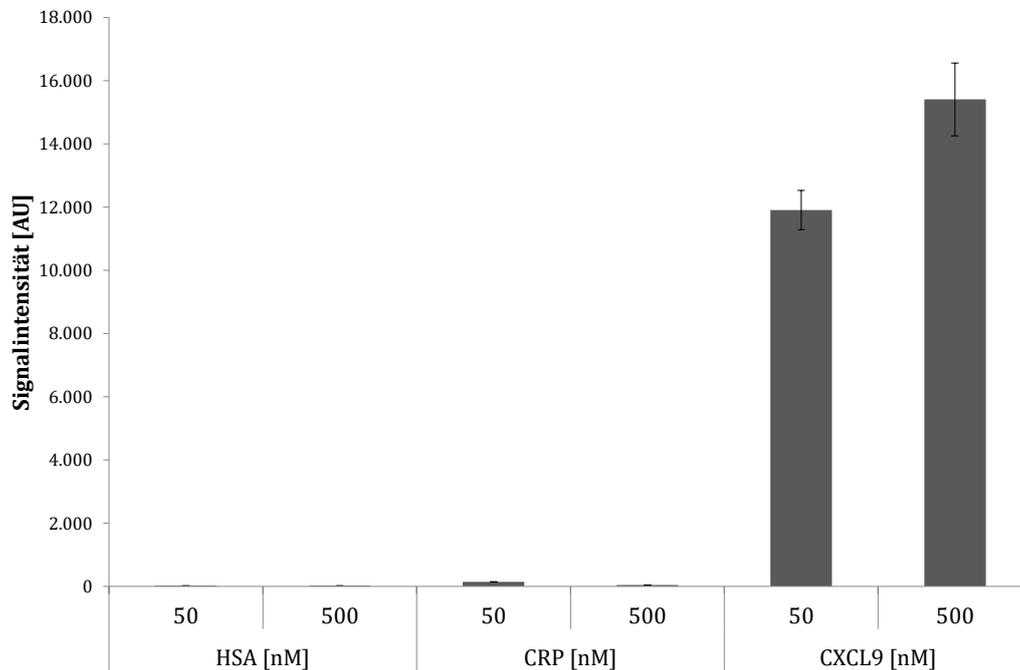


**Abbildung 4-59: Bindungsstudien im Forward-Format von CXCL9\* im Vergleich zu HSA\* und CRP\* in den gleichen Konzentrationen (100 nM, 1 nM, 0,1 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>).**

Die geringe Affinität von FA-AKB zu CXCL9 wurde hier wieder bestätigt. HSA\* und CRP\* (100 nM) werden von diesem FA sogar stärker gebunden als CXCL9\*. Bei einer Proteinkonzentration von 100 nM weisen HSA\* und CRP\* durch unspezifische Bindungen an alle FAs durchschnittliche Signalintensitäten von 5000 AU bzw. 2500 AU auf. Diese Werte sind jedoch um das 3,5 bis 25-fache geringer als die Signalintensitäten bei der Bindung von CXCL9\*. Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 nM werden jeweils zu wenige Antigene gebunden, um aussagekräftige Fluoreszenzsignale zu erzeugen; erst bei 100 nM des Antigens kann ein deutlicher Unterschied der Affinität festgestellt werden. Mit Hilfe des Forward-Formats kann aus diesem Grund eine Kreuzreaktion nicht ganz ausgeschlossen werden und muss somit weiter untersucht werden.

Standard Sandwich-Microarray: Das Antikörperpärchen FA-AKA und DA-AKC\* wurde auch im Sandwich-Format auf seine Spezifität überprüft. Dafür wurde AKA (1 mg·L<sup>-1</sup>) auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die Proteine HSA, CRP und CXCL9 wurden in den Konzentrationen 500 und 50 nM zunächst mit AKC\* vorinkubiert (50 nM, 90 Minuten) und anschließend auf die Membran gegeben. Wie in Abbildung 4-60 zu sehen ist, kam es weder bei HSA noch bei CRP zu einer Sandwich-Komplex-Bildung, da hier keine relevanten Signalintensitäten erhalten wurden. CXCL9 hingegen zeigt mit Signalintensitäten von 15410 AU (500 nM) bzw. 11910 AU (50 nM) deutlich die Ausbildung eines Sandwich-Komplexes aus FA-

AKA, CXCL9 und AKC\*. Wie erwartet liegt im Sandwich-Microarray durch die Voraussetzung, dass zwei CXCL9-spezifischen Antikörpern für die Komplexbildung benötigt werden, eine hohe Spezifität vor.



**Abbildung 4-60: Beurteilung der Antikörperspezifität im Sandwich-Format unter Verwendung von CXCL9, HSA und CRP in den gleichen Konzentrationen (50 nM, 500 nM) mit AKA als Fängerantikörper ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und AKC\* als Detektionsantikörper (50 nM) (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). N=8.**

#### 4.4.4 Lateral Flow Assay zur Detektion von CXCL9

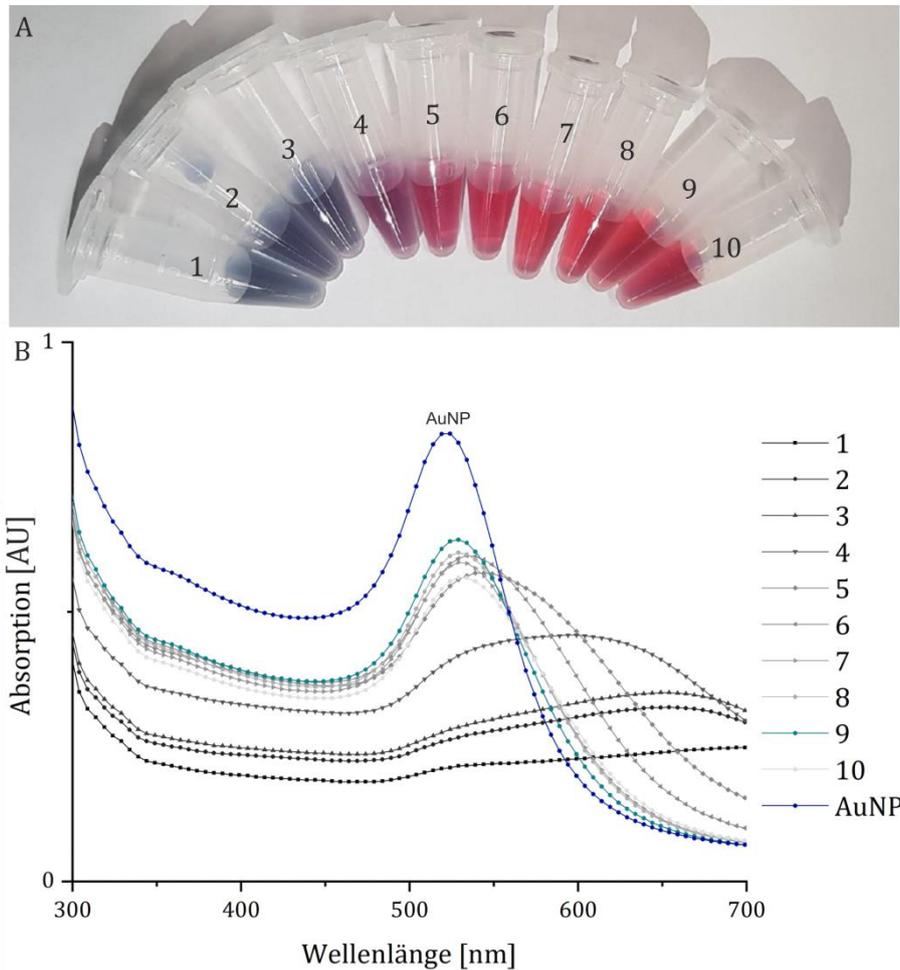
Nachdem die CXCL9-spezifischen Antikörper auf ihre Affinität sowie Fähigkeit als Fänger- und Detektionsantikörper mittels Microarrays getestet wurden, wurden sie für die Etablierung eines LFAs eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugat hergestellt und schließlich der Lateral Flow Assay (LFA) aufgebaut und optimiert.

##### 4.4.4.1 Herstellung von Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugaten

Bei der Herstellung der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate ist es wichtig, wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, die optimale Antikörperkonzentration zu finden, damit die AuNPs durch die Antikörper vor Agglomeration geschützt werden.

Abbildung 4-61A wurde nach der Salzzugabe bei der Flokkulation von AKC mit Goldnanopartikeln (AuNP-AKC) aufgenommen. Dabei wurde die Antikörperkonzentration von links nach rechts erhöht ( $0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  -  $8,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Bei den ersten drei Proben von links ( $0,87$ - $2,54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ist ein Farbumschlag zu einem Blauton zu sehen. Die vierte Probe ist lila und ab der fünften Probe weisen die AuNP-Konjugate eine rötliche Farbe auf. Mit zunehmender Antikörperkonzentration

wiesen die Konjugate somit wie erwartet eine höhere Stabilität auf, sodass sie salztoleranter wurden und weniger Agglomerate gebildet wurden.



**Abbildung 4-61: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit AKC als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2=1,71  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 3=2,54  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4=3,36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 5=4,17  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6=4,96  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 7=5,74  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 8=6,50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 9=7,26  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10=8,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , AuNP=0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr. 9).**

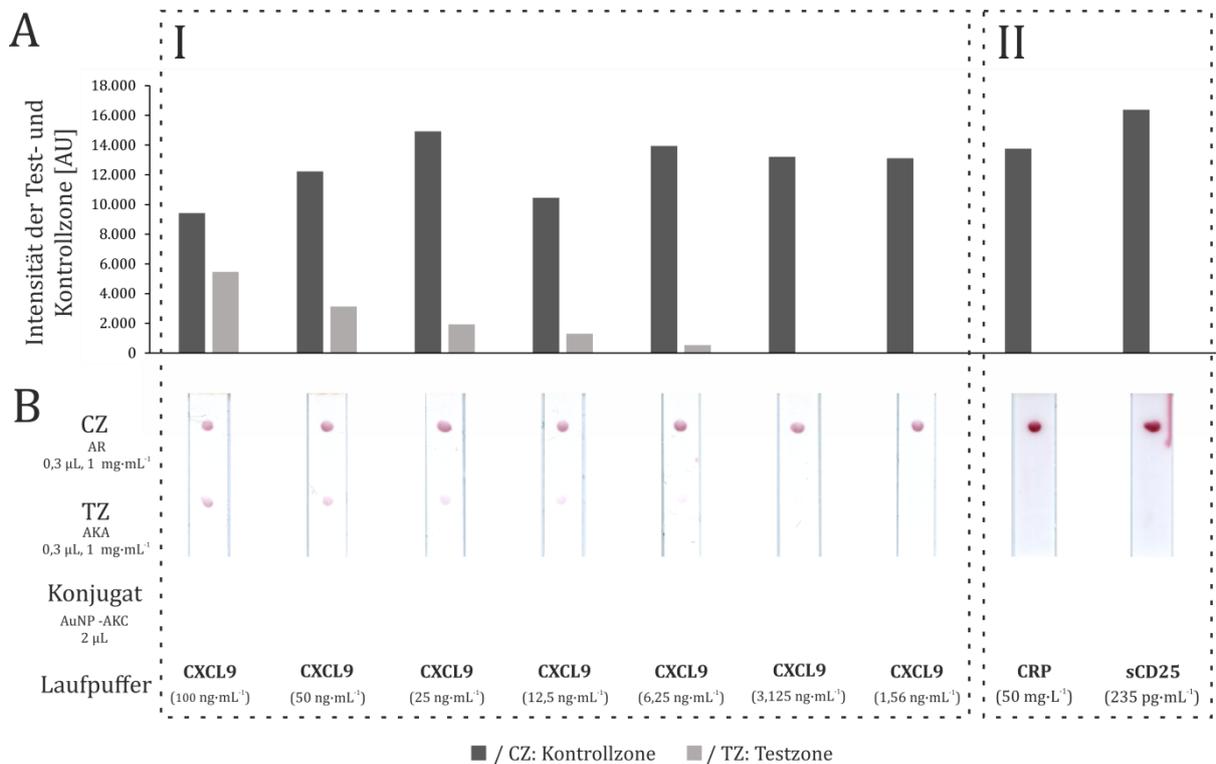
Um den Farbumschlag besser beurteilen zu können, wurde ebenfalls eine grafische Auswertung der Proben mittels UV-Vis-Spektroskopie durchgeführt (Abbildung 4-61B). Dabei wurde zusätzlich eine Probe ohne die Zugabe von DAs als Referenz vermessen (AuNP, blaue Kurve). Die Konjugate mit einer finalen Antikörperkonzentration zwischen 0,87 und 3,36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (1-4) zeigen ein sehr flaches Absorptionsspektrum ohne klar definierten Peak und mit einem Maximum, das zu hohen Wellenlängen (600-700 nm) verschoben ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die AuNPs nicht ausreichend durch Proteine geschützt wurden und somit ausgefallen sind. Bei weiterer Erhöhung der Antikörperkonzentration, nähert sich der Kurvenverlauf der Konjugate immer mehr der Referenzkurve, also der Absorptionsmessung von reinen AuNPs, an. Dies entspricht auch dem visuellen Ergebnis. Das Konjugat mit einer Antikörperkonzentration von

7,26  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Nr. 9, türkise Kurve) wurde als niedrigste Konzentration mit höchster Stabilität ausgewählt und für die weiteren Versuche verwendet.

Für die tatsächliche Konjugatherstellung wird anstelle des Salzes (Flokkulationstest) ein Blockierungsreagenz (hier BSA) verwendet, um eventuelle freiliegende Stellen der AuNPs abzuschirmen und dadurch eine Stabilisierung des Konjugates zu erreichen.

#### 4.4.4.2 Etablierung des Lateral Flow Assays

Mit den Ergebnissen aus den vorherigen Kapiteln wurde aus FA-AKA (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Testzone und AuNP-AKC ein LFA aufgebaut. In Kapitel 4.2.3 wurde bereits näher auf die generelle Zusammensetzung, Durchführung sowie Auswertung der LFAs eingegangen. Da AKC ein Antikörper aus der Ratte war, wurde für die Kontrollzone als FA ein Anti-Ratte-Antikörper (AR, 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) eingesetzt. Zunächst wurde der LFA mit einer Konzentrationsreihe (1,56-100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9) auf seine Sensitivität überprüft (Abbildung 4-62).



**Abbildung 4-62:** LFAs (B) mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (100 – 1,56  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) im Laufpuffer sowie die jeweils grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und in der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. Es wurde 2  $\mu\text{L}$  AuNP-AKC auf dem *Release Pad*, Antikörper AKA als CXCL9-FA (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der TZ und Antikörper AR als FA für DA-AKC (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. I: CXCL9 im Laufpuffer. II: Kontrollproteine im Laufpuffer: CRP (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und sCD25 (235  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Mit sinkender CXCL9-Konzentration nimmt auch die Intensität des Punktes in der Testzone ab, bis er bei 12,5  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  nur noch sehr schwach und bei 6,25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  gar nicht mehr zu sehen ist. Die Rotfärbung in der Kontrollzone zeigt, dass die sieben LFA-Streifen funktional und gültig sind.

Es wurden zwei Kontrollen durchgeführt, um eventuelle Kreuzreaktivitäten ausschließen zu können. Zum einen wurde ein Streifen mit  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP versetzt, ein anderer mit  $235 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25. Bei beiden Teststreifen war in der Testzone keine Rotfärbung zu sehen, nur wie erwartet in der Kontrollzone. Dies spiegelte sich ebenfalls in Abbildung 4-62A graphisch wider. Das bedeutet, dass der Test spezifisch für CXCL9 ist, aber weder CRP noch sCD25 detektiert.

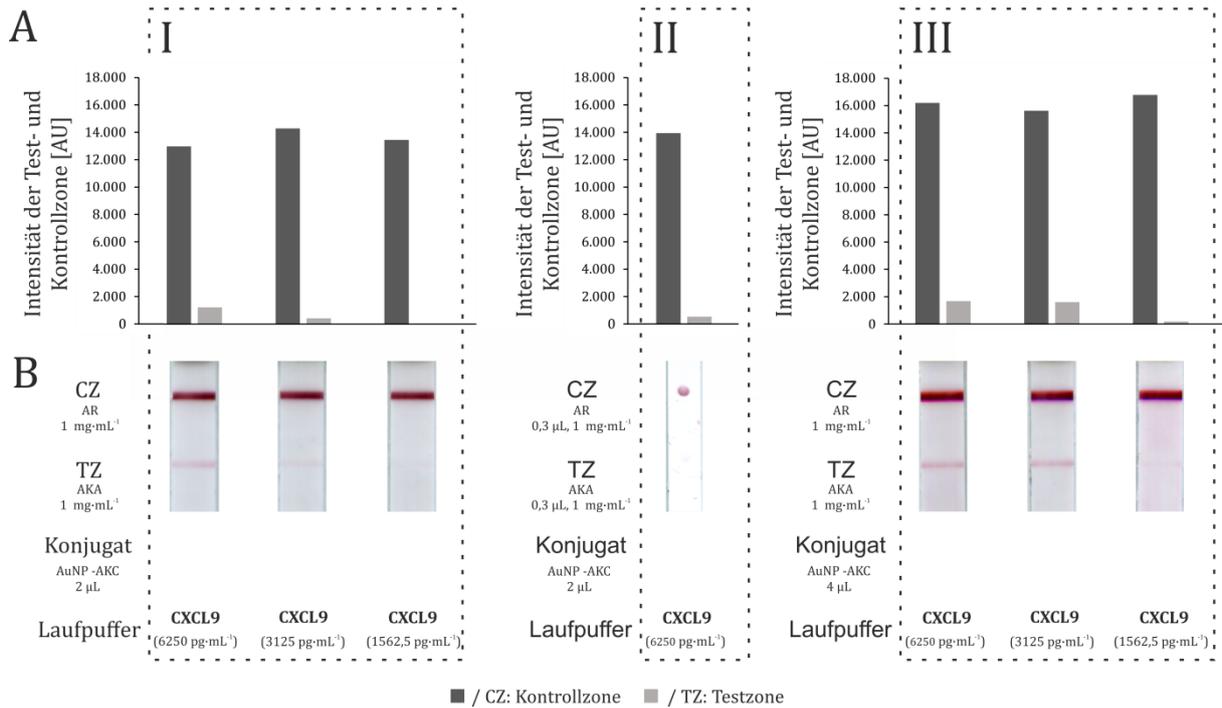
#### 4.4.4.3 Optimierung der Assaysensitivität

Da die im Urin und Plasma mittels Bioplex in Kapitel 4.4.1 gemessenen mittleren CXCL9-Konzentrationen noch deutlich unter  $12,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Urin:  $127,6 \pm 143,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw. Plasma:  $721 \pm 678 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) lagen, musste der LFA optimiert werden. In Tabelle 4-8 sind die Veränderungen für verschiedene Optimierungsstrategien aufgelistet.

**Tabelle 4-8: Optimierungsstrategien des LFA-Aufbaus für die Detektion von CXCL9 hinsichtlich einer Intensivierung der Rotfärbung in der Testzone mit dem zugehörigen Ergebnis.**

| Veränderung  | Verbleibende Problematik   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Variation der Antikörpermenge (<math>0,6 \mu\text{L}</math>) in der Testzone</li> </ul>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Blocken der Testzone mit BSA</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Laufpuffer wird beim Migrieren gehindert</li> <li>Rotfärbung in TZ wird abgeschwächt</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>pH-Wert-Änderung der Fängerantikörper</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Variation der Höhe der Testzone (Verlängerung der Laufzeit)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Verwendung verschiedener Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten für <i>Release Pad-Vorbehandlung</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Unspezifische Bindungen</li> <li>Konjugat verbleibt im <i>Release Pad</i></li> </ul>            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>AKB, AKC und AKD als Fängerantikörper eingesetzt</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>AKA, AKB und AKD als Detektionsantikörper eingesetzt</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Einsatz verschiedener Membranen</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Rotfärbung der TZ <math>&lt;6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}</math></li> </ul>          |

Trotz zahlreicher Optimierungsstrategien konnte keine Intensivierung der Rotfärbung in der Testzone erreicht werden. Anschließend wurde von der manuellen Antikörperauftragung zur maschinellen gewechselt, da es aufgrund der manuellen Auftragung der Testzone in Form eines Punktes möglich ist, dass Probenflüssigkeit um die Testzone an den Seitenrändern migriert und das Antigen nicht detektiert werden kann. Zur standardisierten Auftragung der FAs auf die Testzone wurden die FAs zu der Kooperationsfirma Fassisi GmbH geschickt, die Qualität der Auftragung mit einem dafür entwickelten Gerät ist wesentlich höher als bei der Auftragung mit dem zunächst verwendeten Nano-Plotter. Die neue FA-Auftragung führte zu einem verbesserten Rotfärbung und einer Sensitivitätssteigerung (Abbildung 4-63I).

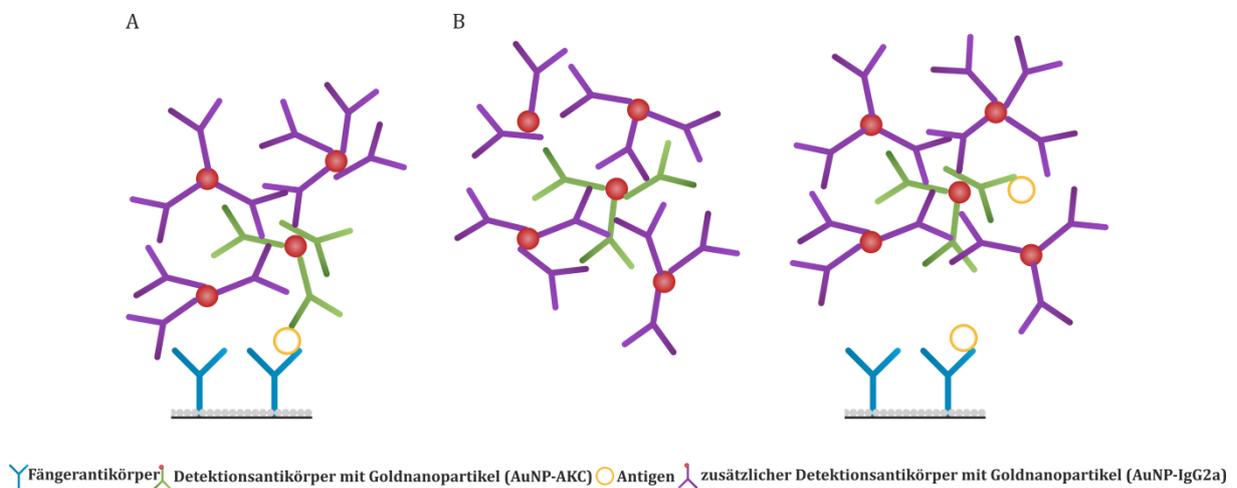


**Abbildung 4-63: LFAs (B) mit Beschichtung der Fängerantikörper in der Test- und Kontrollzone (TZ, CZ) durch eine externe Firma (Fassisi GmbH). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: Testung der neuen Beschichtung mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (6250 – 1562,5 pg·mL<sup>-1</sup>) im Laufpuffer und Antikörper AKA als CXCL9-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der TZ, Antikörper AR als FA für DA-AKC (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der CZ und 2 µL AuNP-AKC. II: LFA mit 6250 pg·mL<sup>-1</sup> CXCL9 im Laufpuffer zum Vergleich. III: Verdopplung der Konjugat-Menge (AuNP-AKC, 4 µL). LFAs wurden mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (6250 – 1562,5 pg·mL<sup>-1</sup>) im Laufpuffer sowie FA-AKA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der TZ und FA-AR (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der CZ durchgeführt.**

Eine CXCL9-Konzentration von 6250 pg·mL<sup>-1</sup> ist hier deutlich zu erkennen und das Signal der Intensität hat sich bei der Auswertung bei ImageJ verdoppelt. Außerdem ist nun eine leichte Rotfärbung bei 3125 pg·mL<sup>-1</sup> zu erkennen, wie auch im Graph sichtbar ist (Abbildung 4-63A I). Zusätzlich konnte eine intensivere Rotfärbung der Testzone erreicht werden, indem die doppelte Menge Konjugat verwendet wurde (Abbildung 4-63III). Dies führte zu einer mit dem bloßen Auge erkennbaren Linie bei einer CXCL9-Konzentration von 3125 pg·mL<sup>-1</sup>, welche bei der Quantifizierung ein vierfach so starkes Signal im Vergleich zu Abbildung 4-63A I erzeugte. Mit diesen beiden Optimierungsstrategien (professionelle FA-Auftragung und doppelte Konjugatmenge) wurde die Sensitivität des Testsystems zwar gesteigert, war aber noch nicht ausreichend für die gewünschte Anwendung. Aus Kostengründen und zur Materialeinsparung wurden die Versuche zunächst dennoch weiterhin mit 2 µL anstatt mit 4 µL AuNP-AKC durchgeführt.

Als weitere LFA-Optimierung wurde eine zusätzliche Verstärkung der Testlinie mittels eines weiteren AuNP-konjugierten DAs nach Choi et al. eingeführt.<sup>173</sup> Choi et al. haben dazu einen zweiten Antikörper, der gegen BSA gerichtet ist, verwendet. Da auch in der vorliegenden Arbeit im Konjugationsprozess der AuNPs mit den AKC-Antikörpern (Kapitel 4.4.4.1) BSA zur Belegung

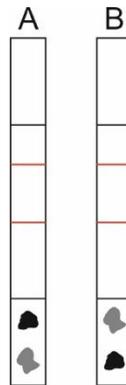
freier Bereiche der AuNPs verwendet wurde, enthielt das Konjugat immobilisiertes BSA. In dieser Arbeit wurde aber kein Antikörper gegen BSA, sondern ein Antikörper eingesetzt, der gegen den ersten DA gerichtet war. Dieser zweite DA (IgG2a) ist gegen Antikörper der Klasse IgG2a gerichtet und kann somit an den Detektionsantikörper DA-AKC binden, da dieser der Klasse IgG2a angehört. FA-AKA in der Testzone hingegen gehört der Klasse IgG2b an, weshalb der neue Antikörper hier nicht binden kann. DA-IgG2a kann in der Testzone nur binden, wenn AuNP-AKC dort bereits über CXCL9 und FA-AKA gebunden hat (Abbildung 4-64A). Wird IgG2a nun ebenfalls an AuNPs konjugiert (AuNP-IgG2a), wird das rote Signal in der Testzone verstärkt. Dabei ist mutmaßlich aufgrund von sterischen Hinderungen untereinander nicht hervorzusagen, mit welchem Faktor die Intensivierung stattfinden kann. Jedoch werden schon bei der Konjugation mit AKC mehrere Antikörper ungerichtet an einen AuNP gebunden, sodass hier auch dem zweiten DA mehrere Epitope für eine Bindung zur Verfügung stehen.



**Abbildung 4-64: Verstärkung des Signals in der Testzone (TZ) durch einen zweiten mit Goldnanopartikeln konjugierten Detektionsantikörper (AuNP-IgG2a, lila). Der zweite Detektionsantikörper ist spezifisch gegen IgG2a-Antikörper gerichtet und bindet AuNP-AKC (grün). A) Rotfärbung in der TZ wird durch AuNP-IgG2a verstärkt. B) AuNP-IgG2a binden AuNP-AKC, sodass FA-AKA nicht mehr gebunden werden kann und eine Rotfärbung in der TZ ausbleibt.**

Es ist wichtig ein gutes Verhältnis zwischen den zwei verschiedenen mit AuNPs konjugierten DAs zu finden sowie die dazu passende Reihenfolge der Zugabe auf das *Release Pad*. Liegt AuNP-IgG2a im Überschuss vor, so kann AuNP-AKC nicht mehr an den FA-AKA binden und es entsteht keine Rotfärbung in der TZ (Abbildung 4-64B). Wird AuNP-IgG2a auf dem *Release Pad* näher an der Membran aufgetragen und AuNP-AKC zu Beginn des Streifens (Abbildung 4-65A), so kann das im Laufpuffer vorhandene CXCL9 zuerst an den CXCL9-spezifischen DA binden, welcher dann anschließend von AuNP-IgG2a gebunden werden kann. Wird die Reihenfolge gewechselt (Abbildung 4-65B), so wandert AuNP-IgG2a zusammen mit CXCL9 im Laufpuffer zu AuNP-AKC und die Konjugate können dann gemeinsam einen Komplex ausbilden. Allerdings muss dabei auch

bedacht werden, dass der Bereich zwischen den beiden Auftrags-Positionen nur wenige Millimeter beträgt und der Laufpuffer nur wenige Zehntelsekunden zur Wanderung benötigt.

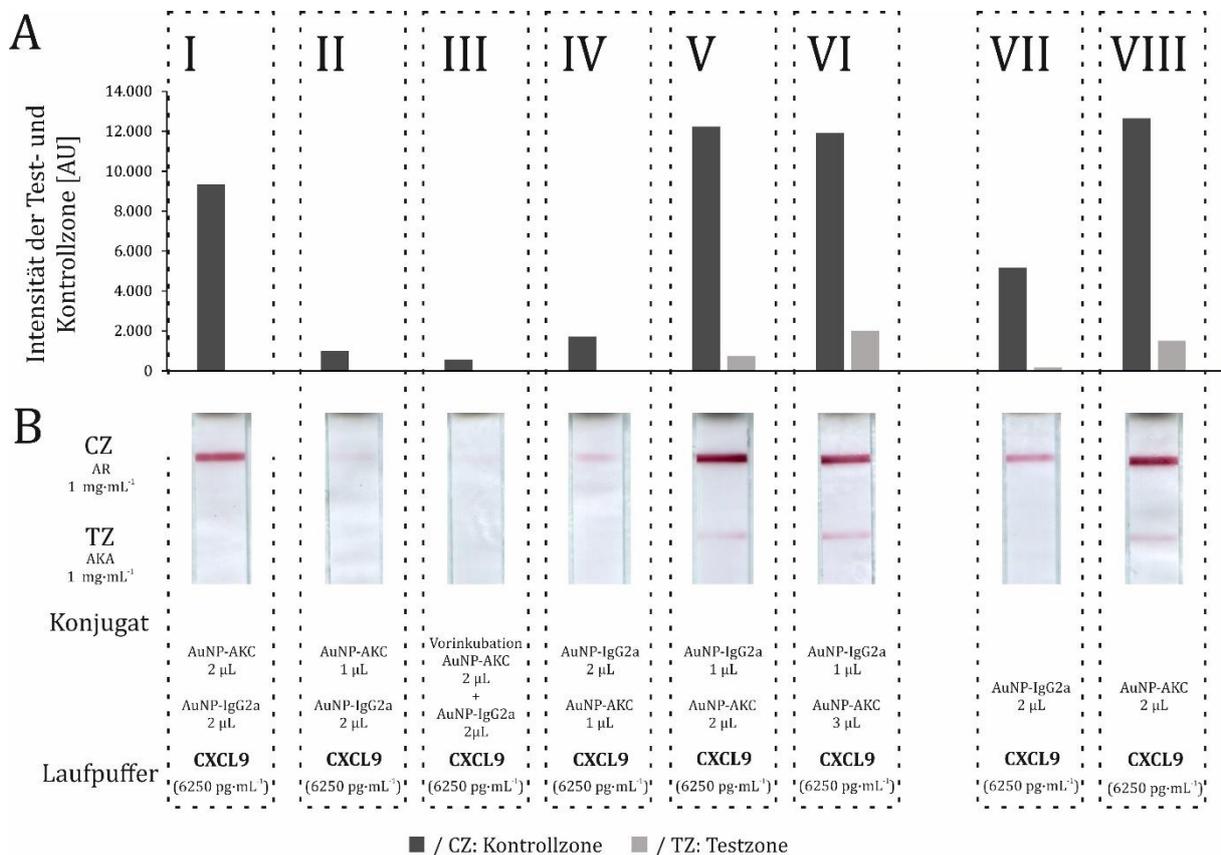


**Abbildung 4-65: Verschiedene Auftrags-Positionen der beiden Konjugate. A) AuNP-IgG2a (schwarz) wird in der Nähe der Membran auf dem *Release Pad* aufgetragen B) AuNP-AKC (grau) wird in der Nähe der Membran auf dem *Release Pad* aufgegeben.**

Zur Untersuchung dieses neuen Testaufbaus wurden LFAs mit verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen an AuNP-AKC und AuNP-IgG2a mit einem Laufpuffer mit  $6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 durchgeführt und verglichen (Abbildung 4-66). Zusätzlich wurde ein LFA als Referenz und ein LFA als Kontrolle angefertigt. Bei der Kontrolle wurde als Konjugat nur AuNP-IgG2a verwendet, um zu überprüfen, ob der Antikörper auch ohne CXCL9 oder AuNP-AKC an den FA in der Testzone bindet. Für die Referenz wurde ein LFA mit  $2 \mu\text{L}$  AuNP-AKC, also dem bisherigen LFA-Aufbau, durchgeführt. Bei der zusätzlichen Verwendung des AuNP-IgG2a Konjugats konnte bei bestimmten Testbedingungen eine verbesserte Detektion von CXCL9 erreicht werden. Die aufgetragenen Konjugatmengen sowie Auftragungsorte der zwei verschiedenen Konjugate sind dabei entscheidend (Abbildung 4-66).

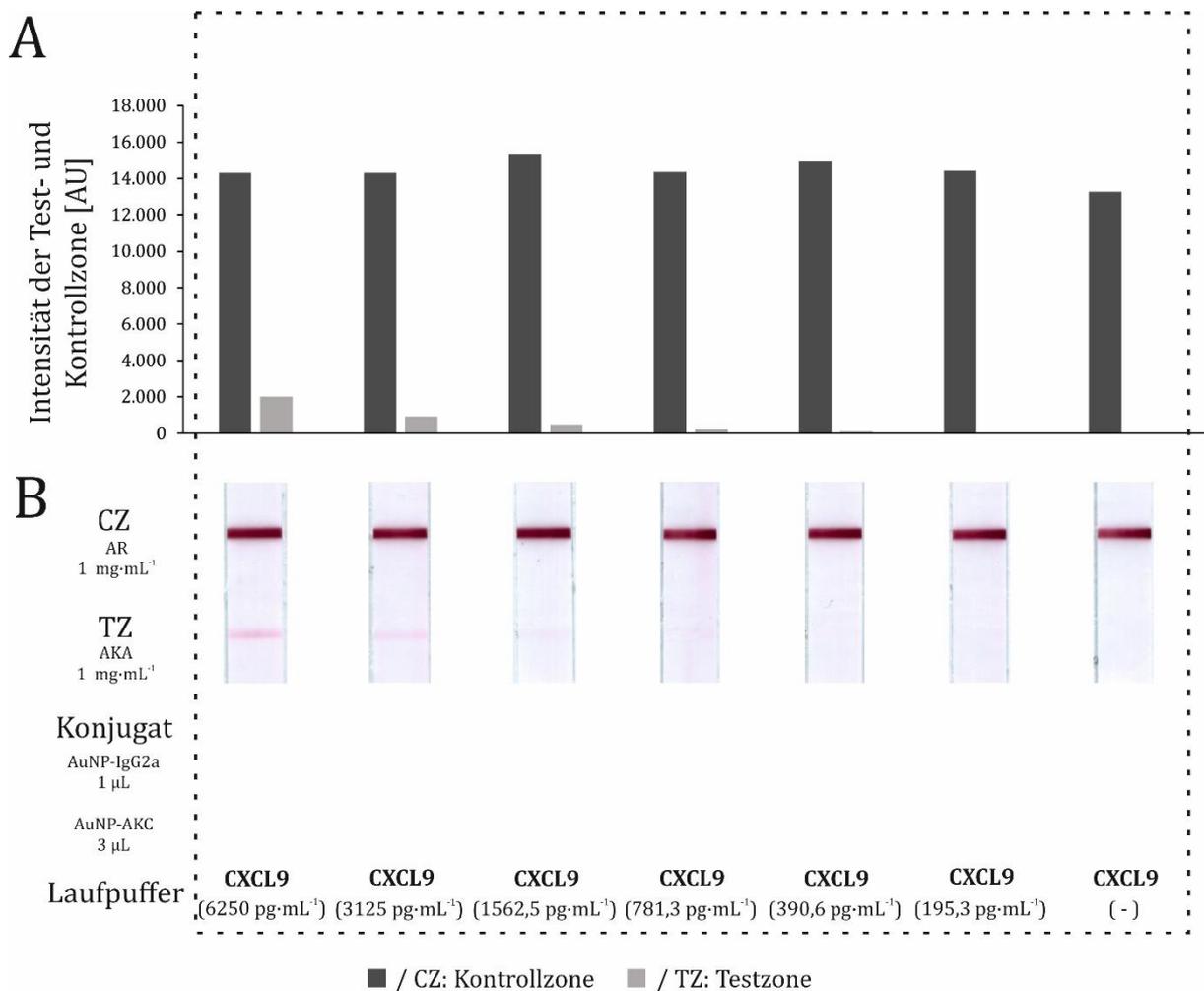
So wird mit  $2 \mu\text{L}$  AuNP-AKC und  $2 \mu\text{L}$  AuNP-IgG2a keine Rotfärbung in der Testzone erhalten (Abbildung 4-66I). Nach Halbierung der AuNP-AKC-Menge wird sogar nur eine sehr schwache Rotfärbung in der Kontrollzone ausgebildet (Abbildung 4-66 II). Hierfür können zwei Gründe vorliegen, zum einen kann es sein, dass IgG2a AKC so bindet, dass dieser das Antigen CXCL9 nicht mehr binden kann oder aus sterischen Hinderungen das bereits gebundene CXCL9 nicht mehr von FA-AKA auf der Membran detektiert werden kann (Abbildung 4-64B). Durch die doppelte Menge AuNP-IgG2a wird das Konjugat mit AKC sogar so gut abgeschirmt, dass der FA in der Kontrollzone nur schwer Epitope von AKC binden kann und somit dort nur eine schwache Linie ausgebildet wird. Wird der Laufpuffer vorweg für 15 Minuten mit den AuNP-AKC und AuNP-IgG2a inkubiert, fällt das Ergebnis vergleichbar aus. Es ist keine Linie in der Testzone und nur eine schwache Linie in der Kontrollzone sichtbar (Abbildung 4-66III). Auch hier hat vermutlich die Bindung an IgG2a AKC bzw. CXCL9 zu stark abgeschirmt, sodass keine weitere Bindung an die FA in der Test- oder Kontrollzone stattfinden kann. Wird die Reihenfolge, in der der Laufpuffer die Konjugate auf dem

*Release Pad* erreicht (zunächst AuNP-AKC dann AuNP-IgG2a (Abbildung 4-65A)), geändert, wird die Linie in der Kontrollzone etwas intensiver, eine Linie in der Testzone blieb aber weiterhin aus (Abbildung 4-66IV). Erst wenn das Verhältnis der beiden Konjugate umgedreht wird (1  $\mu\text{L}$  AuNP-IgG2a und 2  $\mu\text{L}$  AuNP-AKC), entsteht eine rote Linie in der Testzone (Abbildung 4-66V). Bei einer Erhöhung der Menge an AuNP-AKC auf 3  $\mu\text{L}$  ist die Linie in der Testzone deutlicher zu sehen als bei dem Referenz-LFA (Abbildung 4-66 VI vs. VIII) und weist eine Intensität von 2014 AU auf. Die Intensität der Linie in der Testzone bei dem Referenz-LFA ist mit 1500 AU deutlich niedriger. Um sicher zu stellen, dass die Intensivierung der Testlinie durch die Anlagerung von AuNP-IgG2a an DA-AKC entsteht und nicht AuNP-IgG2a direkt an FA-AKA oder die Membran bindet, ist der LFA nur mit AuNP-IgG2a erstellt worden (Abbildung 4-66VII). Bei diesem Streifen war keine rote Linie in der Testzone, sondern nur in der Kontrollzone zu sehen. Dies bedeutet, dass AuNP-IgG2a nicht an FA-AKA, CXCL9 oder die Membran selber bindet.



**Abbildung 4-66:** LFAs (B) mit zwei unterschiedlichen Konjugaten (AuNP-AKC und AuNP-IgG2a) in verschiedenen Konjugatvolumina und Auftrage-Positionen auf dem *Release Pad* (entspricht in B genannter Konjugat-Reihenfolge, I-VIII) zur Verstärkung der Rotfärbung in der Testzone mit  $6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 im Laufpuffer Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ) und Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: AuNP-AKC (2  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (2  $\mu\text{L}$ ). II: AuNP-AKC (1  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (2  $\mu\text{L}$ ). III: mit zusätzlicher Vorinkubation (15 Minuten) von AuNP-AKC mit der Laufprobe (2  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (2  $\mu\text{L}$ ). IV: AuNP-IgG2a (2  $\mu\text{L}$ ). und AuNP-AKC (1  $\mu\text{L}$ ) V: AuNP-IgG2a (1  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC (2  $\mu\text{L}$ ). VI: AuNP-IgG2a (1  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC (3  $\mu\text{L}$ ). VII: Kontroll-LFA mit AuNP-IgG2a (2  $\mu\text{L}$ ), ohne AuNP-AKC. VIII: Referenz-LFA zum Vergleich der Veränderung der Signalintensität mit AuNP-AKA (2  $\mu\text{L}$ ).

Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei dem Einsatz von 3  $\mu\text{L}$  AuNP-AKC im Zusammenspiel mit 1 bzw. 0,5  $\mu\text{L}$  AuNP-IgG2a die beste Intensivierung der Rotfärbung in der Testzone zeigten (Anhang, Abbildung 7-14). Dazu wurden 1562,5  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 im Laufpuffer verwendet, um direkt eine Optimierung und somit Signal bei niedriger Konzentration zu erkennen. Da bei der Verwendung von 3  $\mu\text{L}$  AuNP-AKC und 1  $\mu\text{L}$  AK-IgG2a bei einer CXCL9-Konzentration von 6250  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  als auch bei 1562,5  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  eine relativ intensive Rotfärbung in der Testzone entstand, wurde mit diesem Testaufbau verschiedene LFAs mit variierender CXCL9-Konzentration im Laufpuffer erstellt (Abbildung 4-67).



**Abbildung 4-67: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0-6250  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf dem optimierten LFA.** LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-IgG2a (1  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC (3  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe.

Dabei ist wie erwartet zu beobachten, dass mit sinkender CXCL9-Konzentration auch die Intensität der Rotfärbung in der Testzone abnimmt. So halbiert sich die Intensität der Testlinie bei gleichzeitiger Halbierung der CXCL9-Konzentration. Bei 6250  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 erreicht die Rotfärbung in der Testzone eine Intensität von 2024 AU, bei 3125  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 hingegen sinkt

sie auf 920 AU und bei  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 liegt sie nur noch bei 470 AU. Bis zu einer Konzentration von  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 ist die Linie in der Testzone mit bloßem Auge erkennbar. Ab  $781,3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 ist sie visuell nicht mehr erkennbar, weist aber noch eine Intensität von 230 AU auf und bei  $390,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 zeigt die Testlinie noch eine Intensität von ca. 100 AU. Eine Konzentration von  $195 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ergibt weder für die Auswertung mit dem Auge noch mittels ImageJ eine erkennbare Testlinie. Somit liegt die Nachweisgrenze nach der Einführung eines zweiten DAs und der optimierten Konjugat-Positionen auf dem *Release Pad* bei  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9.

Mit der Einführung des zweiten DAs konnte die Sensitivität insgesamt von  $6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  auf  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  verbessert werden, jedoch wurde der *cut-off* von  $134,6 \pm 162,2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Urin) bzw.  $683,8 \pm 699,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Plasma) noch nicht erreicht. Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung von klinischen Proben, die ein einfaches Puffersystem nicht abbilden kann, wurden nach der Optimierung Patientenproben verwendet.

#### 4.4.4.4 Patientenproben

Im nächsten Schritt wurde der entwickelte und optimierte LFA mit verschiedenen Patientenproben getestet. Da der *cut-off* von  $127,6 \pm 143,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Urin) bzw.  $721 \pm 678 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Plasma) noch nicht erreicht werden konnte, wurden auch mit den Patientenproben verschiedene Bedingungen getestet. Für die Versuche wurde bei allen LFAs FA-AKA und AuNP-AKC verwendet, zusätzlich wurden verschiedene Volumina der Patientenproben verwendet und als zweiter Detektionsantikörper AuNP-IgG2a eingesetzt. Aufgrund der erfolgreichen Ergebnisse bei der Anwendung einer Vorinkubation der Probenflüssigkeit mit dem Konjugat zur Detektion von sCD25, wurden zusätzlich Untersuchungen mit einer Vorinkubation für 15 Minuten durchgeführt. Außerdem wurden sowohl Urin- als auch Plasmaproben von erkrankten und gesunden Patienten verwendet. Die Proben der erkrankten Patienten wurden aufgrund einer durchgeführten Biopsie in die jeweilige Abstoßungsart (TCMR, AMR oder Borderline) eingeteilt. Die Proben der gesunden Patienten wurden zur Kontrolle auf Spezifität des LFAs durchgeführt.

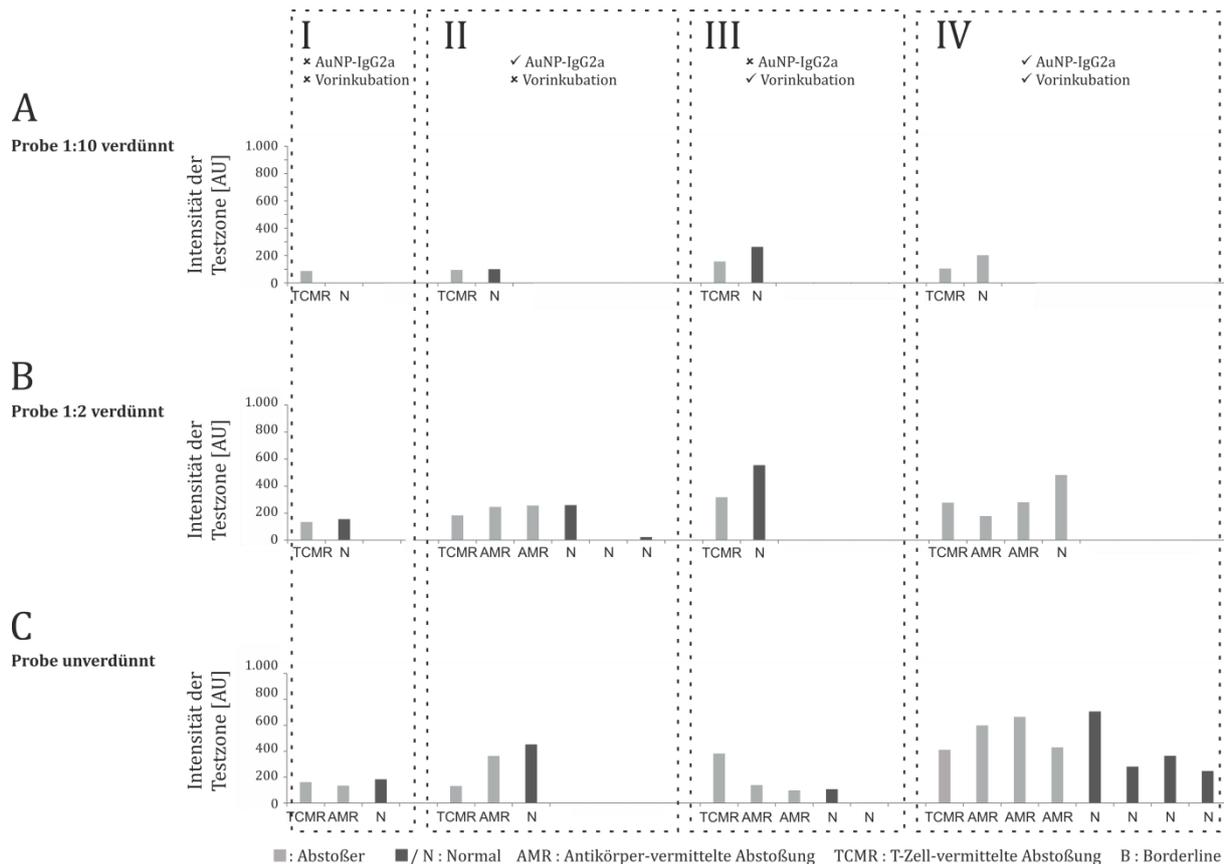
Für eine höhere Anzahl an Patientenproben wurden zusätzlich Proben aus einer 3. Kohorte mittels ELISA analysiert. Dabei wurden die CXCL9-Konzentrationen in den Proben ermittelt. Zur Vergleichbarkeit der Proben aus der 2. Kohorte wurde diese ebenfalls mittels ELISA vermessen (Tabelle 4-9).

**Tabelle 4-9: Verteilung der Urin- und Plasmaproben nach ihrer BANFF-Klassifikation aus der 2. und 3. Kohorte. TCMR=T-Zell-vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung**

| BANFF-Klassifikation | Anzahl Urinproben | Anzahl Plasmaproben | Anzahl Urinproben | Anzahl Plasmaproben |
|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
|                      | 2. Kohorte        |                     | 3. Kohorte        |                     |
| TCMR                 | 6                 | 6                   | 31                | 0                   |
| AMR                  | 22                | 20                  | 0                 | 0                   |
| Borderline           | 8                 | 10                  | 1                 | 0                   |
| TCMR + Borderline    | 1                 | 1                   | 0                 | 0                   |
| AMR + Borderline     | 3                 | 1                   | 0                 | 0                   |
| AMR + others         | 1                 | 2                   | 0                 | 0                   |
| AMR/TCMR             | 1                 | 1                   | 0                 | 0                   |
| Borderline + others  | 3                 | 3                   | 0                 | 0                   |
| Normal               | 32                | 37                  | 31                | 0                   |

Der mittels ELISA bestimmte Mittelwert der CXCL9-Konzentration der Urinproben in der 2. Kohorte beträgt  $134,6 \pm 126,2,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abstoßung) vs.  $34,9 \pm 30,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Normal). Der Mittelwert der CXCL9-Konzentration der Plasmaproben in der 2. Kohorte beträgt  $683,8,3 \pm 699,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abstoßung) vs.  $213,6 \pm 160,2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Normal). Für die Urinproben der 3. Kohorte beträgt der Mittelwert der CXCL9-Konzentrationen  $142,0 \pm 315,1 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abstoßung) vs.  $11,9 \pm 29,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Normal).

Nachweis von CXCL9 in Urinproben: In Abbildung 4-68 sind die Intensitäten der Rotfärbung in der Testzone bei Verwendung von Urin-Patientenproben dargestellt. Es sind die Ergebnisse bei einer 10-fachen Verdünnung der Patientenproben aufgezeigt (A), bei einer 2-fachen Verdünnung (B) und in (C) wurden die Patientenproben unverdünnt auf den LFA aufgetragen. Zusätzlich wurden die Proben in I, II, III und IV nach ihrer Behandlung (mit/ohne IgG2a und mit/ohne Vorinkubation) eingeteilt.



**Abbildung 4-68: LFAs durchgeführt mit Urin-Patientenproben. LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone, Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone sowie AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. TCMR=T-Zell vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung, B=Borderline, TCMR, AMR und Borderline werden als Abstoßer zusammengefasst (hellgrau). N=Normal (Probe mit unauffälliger Biopsie, dunkelgrau) A) Proben wurden 1:10 mit Laufpuffer verdünnt. B) Proben wurden 1:2 mit Laufpuffer verdünnt. C) Proben wurden unverdünnt verwendet. I: Ohne Zusatzbedingungen. II: Zusätzlicher Einsatz von AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ). III: Zusätzlicher Einsatz einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Patientenprobe mit AuNP-AKC. IV: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Patientenprobe mit AuNP-AKC.**

Bei einer 2-fach und 10-fach Verdünnung der Urin-Patientenprobe ist zu erkennen, dass die Intensitäten der Rotfärbung in der Testzone sowohl bei erkrankten Patienten als auch bei gesunden Patienten unter 200 AU bzw. 560 AU liegt (Abbildung 4-68A & B). Mit dem bloßen Auge sind bei diesen LFAs keine Rotfärbungen in der Testzone erkennbar. In Abbildung 4-68C wurden die Patientenproben unverdünnt aufgetragen. Liegt die Intensität der Rotfärbung in der Testzone ohne den Einsatz von AuNP-IgG2a und ohne Vorinkubation bei unter 200 AU (I), steigt diese bei der zusätzlichen Verwendung von AuNP-IgG2a auf bis zu ca. 500 AU an (II) und bei der zusätzlichen Verwendung einer 15-minütigen Vorinkubation, ohne AuNP-IgG2a, entstehen Intensitäten bis ca. 400 AU (III). Die Kombination aus AuNP-IgG2a und einer Vorinkubation führt zu den stärksten Rotfärbungen mit Intensitäten von bis zu ca. 710 AU (IV). Aufgrund der Rotfärbung kann allerdings nicht zwischen Proben von erkrankten und gesunden Patienten unterschieden werden. Dementsprechend sind die LFAs mit ihren verschiedenen Kombinationen

für Urin-Proben noch nicht sensitiv genug und können nicht zwischen erkrankten und gesunden Patienten unterscheiden.

Nachweis von CXCL9 in Plasmaproben: Sowohl bei Verwendung der Urin- als auch der Plasma-Patientenproben konnte gezeigt werden, dass die eindeutigsten Rotfärbungen der Testzone bei unverdünnter Patientenprobe erhalten wurden. Wie zu erwarten, zeigen die Vergleiche von Plasma- und Urin-Proben von vier verschiedenen Patienten, dass die Intensitäten der Testzone bei der Verwendung von Plasma-Proben stärker ist, da im Plasma höhere CXCL9-Konzentrationen gemessen wurden (Anhang, Abbildung 7-15).

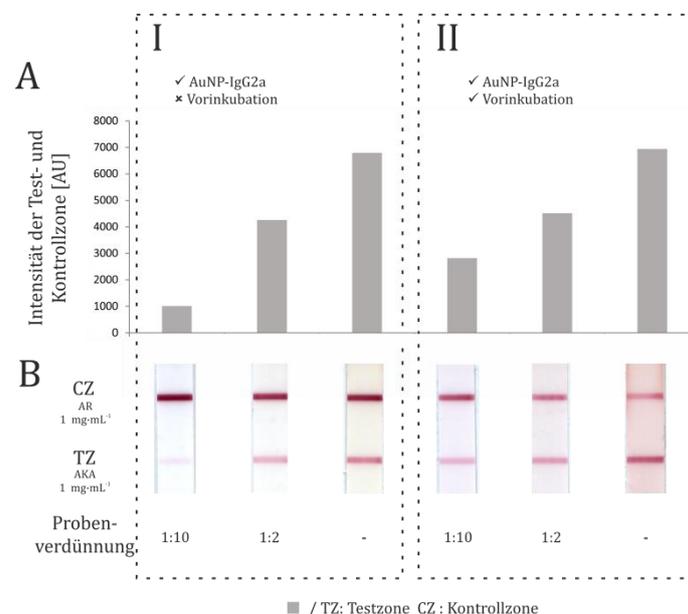
Für Plasma-Patientenproben wurden ebenfalls mehrere LFAs durchgeführt, bei denen die Proben wie zuvor die Urinproben verdünnt wurden, weder AuNP-IgG2a noch eine Vorinkubation angewendet wurde, zusätzlich nur AuNP-IgG2a verwendet wurden oder zusätzlich AuNP-IgG2a sowie eine Vorinkubation verwendet wurden (Abbildung 4-69).

Durch die 10-fache Verdünnung der Plasma-Patientenproben entsteht bei acht von 14 LFAs weder eine Rotfärbung der Testzone noch kann bei diesen LFAs mittels ImageJ ein Signal festgestellt werden. Durch die 10-fache Verdünnung wird das Antigen zu stark verdünnt, sodass es nicht detektiert werden kann (Abbildung 4-69A). Bei einer 2-fachen Verdünnung weisen die Rotfärbungen der Testlinie Intensitäten von bis zu ca. 8600 AU auf (Abbildung 4-69B). Jedoch findet bei den meisten LFAs (24/32) keine eindeutige Rotfärbung in der Testzone statt. Davon weisen 6 von 18 LFAs mit Proben von erkrankten Patienten eine eindeutige Rotfärbung auf. Eindeutige Rotfärbungen in der Testzone weisen einige LFAs auf, bei deren Durchführung zusätzlich IgG2a verwendet wurde (II). Allerdings zeigt ein Großteil dieser LFAs keine eindeutige Differenzierung zwischen Proben von erkrankten Patienten Proben von gesunden Patienten. Bei diesen Proben (ohne Vorinkubation, mit AuNP-IgG2a, 2-fach Verdünnung, N=19) wurden eine Sensitivität von 40 % und eine Spezifität von 56 % erreicht.



Die Verwendung von unverdünntem Probenmaterial führte zu den eindeutigsten Rotfärbungen in der Testzone (Abbildung 4-69C). Die drei LFAs, die mit Proben von erkrankten Patienten und nur mit AuNP-AKC durchgeführt worden sind, zeigen in der Testzone eine klare Rotfärbung mit Intensitäten bis zu ca. 8000 AU auf (I). Der LFA, der mit einer Probe eines gesunden Patienten durchgeführt wurde, zeigt hingegen keine eindeutige, mit dem bloßen Auge erkennbare Färbung der Testzone an (I). Vier LFA-Streifen wurden mit der Kombination aus dem zusätzlichen Konjugat AuNP-IgG2a und der Vorinkubation unter Verwendung von Proben erkrankter Patienten durchgeführt. Alle vier LFAs zeigen eindeutige Rotfärbungen in der Testzone mit Intensitäten bis zu ca. 7000 AU (III). In dieser Kategorie wurden keine LFAs mit Proben von gesunden Patienten erstellt, wodurch keine Aussage zu Sensitivität und Spezifität möglich ist. Wird zusätzlich zu AuNP-AKC das Konjugat AuNP-IgG2a verwendet aber keine Vorinkubation entsteht auf den LFAs mit Proben erkrankter Patienten (N=17) eine eindeutige Rotfärbung in der Testzone mit einer maximalen Intensität von 9500 AU (II). Bei den LFAs mit Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie hingegen konnten nur schwache Rotfärbungen in der Testzone ausgemacht werden. Im Folgenden werden einige Ergebnisse der gezeigten LFAs unter Berücksichtigung der Verdünnung detaillierter miteinander verglichen, sodass eine Aussage zu Spezifität und Sensitivität des entwickelten LFAs getroffen werden kann.

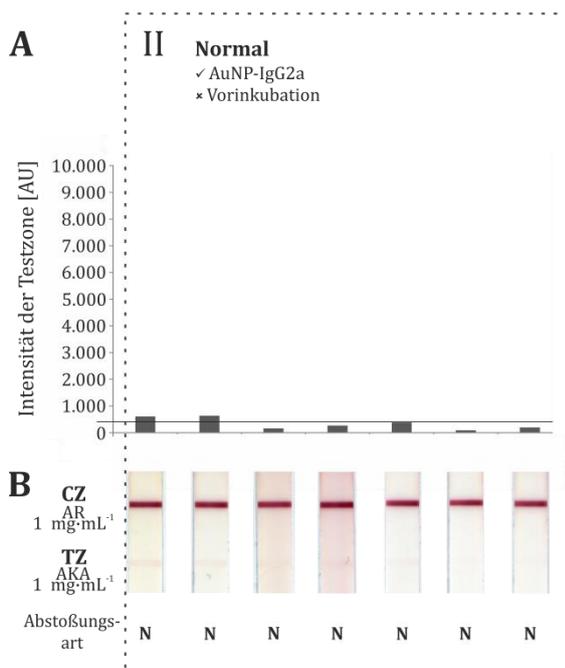
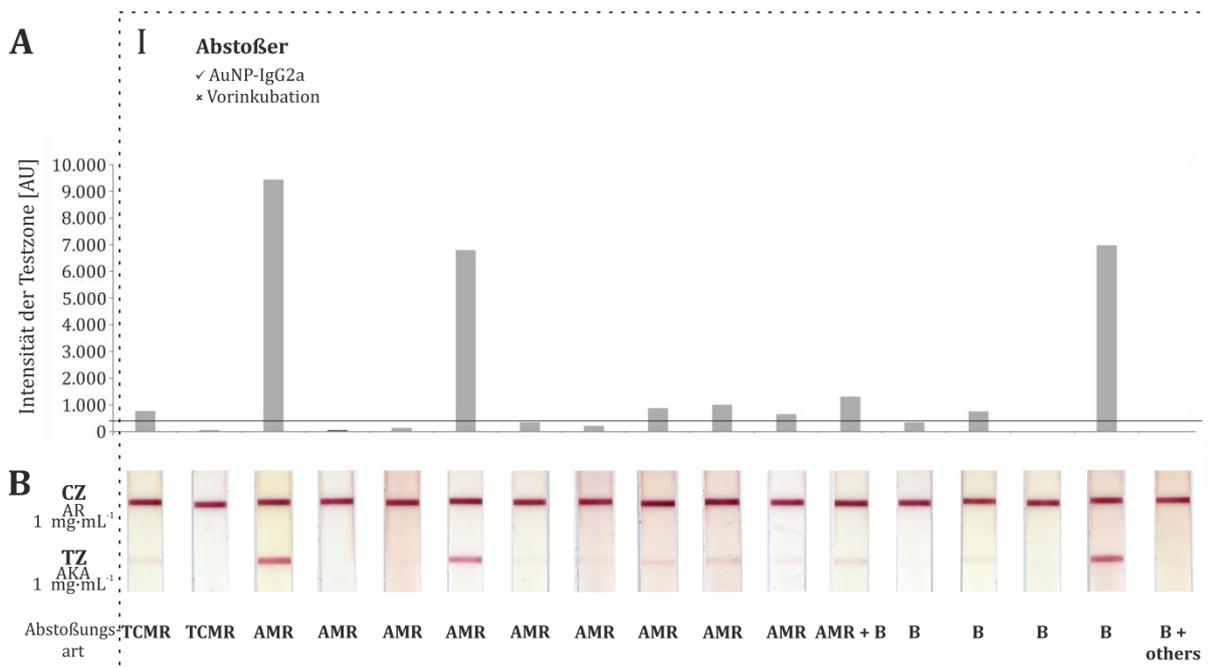
Ein Vergleich der verschiedenen Verdünnungen einer einzigen Patientenprobe im Zusammenhang mit den verwendeten LFA-Bedingungen (mit AuNP-IgG2a, ohne Vorinkubation und mit AuNP-IgG2a und mit Vorinkubation) ist in Abbildung 4-70 dargestellt.



**Abbildung 4-70: Vergleich einer Plasma-Patientenprobe mit verschiedenen Verdünnungen der Probe. LFAs wurden mit FA-AKA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Testzone, FA-AR (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Kontrollzone sowie AuNP-AKC (3 µL) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) darstellen. B) Scan der relevanten Membranbereiche der LFAs I: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a (1 µL). II: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a (1 µL) und einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Probe mit AuNP-AKC.**

Dabei ist zu erkennen, dass bei abnehmender Verdünnung die Intensität der Rotfärbung in der Testzone zunimmt. Dies ist damit zu erklären, dass sich bei diesen Proben mehr CXCL9 in der Probe befindet und detektiert werden kann. Bei hohen Verdünnungen wird mit einer zusätzlichen Vorinkubation eine stärkere Rotfärbung der Testzone erreicht (1000 AU vs. 2800 AU). Nimmt der Grad der Verdünnung ab, ist trotz Vorinkubation weder mit dem bloßen Auge noch graphisch ein klarer Unterschied in der Rotfärbung in der Testzone nachweisbar.

Aus diesem Grund sind in Abbildung 4-71 die LFAs dargestellt, die mit unverdünnten Patientenproben und AuNP-IgG2a durchgeführt worden sind.



**Abbildung 4-71: LFAs, die mit Plasmaproben von Patienten mit verschiedenen Biopsie-Diagnosen durchgeführt wurden. Die LFAs wurden mit unverdünnten Proben, Antikörper AKA als CXCL9-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-AKC (3 µL) und AuNP-IgG2a (1 µL) durchgeführt. Die Linie bei 400 AU stellt den *cut-off* zwischen positiven und negativen Testergebnissen dar. I: Zwei LFAs wurden mit Proben von Patienten, die an einer T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR) leiden durchgeführt. Neun der verwendeten Proben stammen von Patienten mit einer Antikörper-vermittelten Abstoßung (AMR). Vier der aufgetragenen Proben kommen von Patienten, die eine Borderline-Abstoßung (B) aufweisen. Zwei LFAs wurden mit Proben von Patienten, bei denen eine AMR mit B bzw. B + others diagnostiziert wurde durchgeführt (davon neun richtig positiv und acht falsch negativ). II: Sieben LFAs mit Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (davon 2 falsch positiv und 5 richtig negativ).**

■: Abstoßer ■: Normal TZ: Testzone CZ: Kontrollzone AMR: Antikörper-vermittelte Abstoßung TCMR: T-Zell-vermittelte Abstoßung B: Borderline

Insgesamt wurden 17 LFAs mit unverdünnten Patientenproben und AuNP-IgG2a durchgeführt und können miteinander verglichen werden. LFAs, die eine eindeutige Rotfärbung in der Testzone aufweisen, wurden mit Proben erkrankter Patienten durchgeführt, die im Mittel eine CXCL9-Konzentration von  $1125 \pm 785 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  enthielten. Hingegen wurden LFAs, die keine eindeutige oder gar keine Rotfärbung der Testzone zeigten, mit Proben erkrankter Patienten durchgeführt, die im Mittel  $516 \pm 311 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 enthielten. Unter Verwendung von Proben von gesunden Patienten lag der Unterschied der CXCL9-Konzentration bei  $660 \pm 185 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zu  $177 \pm 162 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Zur Abgrenzung zwischen positiven und negativen LFAs wurde ein Grenzwert von 400 AU eingeführt. Somit werden alle LFAs, die eine größere Signalintensität als 400 AU ( $\geq 400 \text{ AU}$ ) aufweisen, als positiv angesehen; LFAs mit einer kleineren Signalintensität als 400 AU ( $< 400 \text{ AU}$ ) wurden als negativ bewertet. Somit wurden in Abbildung 4-71 I neun von 17 LFAs, die mit Proben von erkrankten Patienten durchgeführt wurden, als positiv bewertet. Von den 7 LFAs mit Proben von gesunden Patienten wurden fünf LFAs als negativ bewertet. Dies führt zu einer Sensitivität von 53 % und einer Spezifität von 71 % für den entwickelten LFA zur Detektion von CXCL9 als Abstoßungsbiomarker.

**Tabelle 4-10: Auswertung des CXCL9-Lateral Flow Assays (LFAs, unverdünnte Patientenprobe & mit AuNP-IgG2a) mit Angabe der erkrankten und gesunden Personen in Zusammenhang mit dem LFA-Ergebnis (positiv/negativ) und die daraus resultierende Einordnung in richtig positiv (RP), falsch positiv (FP), falsch negativ (FN) und richtig negativ (RN).**

|                                  | <b>Patient ist krank<br/>(RP + FN)</b> | <b>Patient ist gesund<br/>(FP + RN)</b> |
|----------------------------------|--|---|
| <b>LFA positiv<br/>(FP + RP)</b> | Richtig Positiv (RP)<br>N = 9          | Falsch Positiv (FP)<br>N = 2            |
| <b>LFA negativ<br/>(RN + FN)</b> | Falsch Negativ (FN)<br>N = 8           | Richtig Negativ (RN)<br>N = 5           |

#### 4.4.4.5 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay (LFA)-System zu entwickeln, das eine Abstoßungsreaktion nach vorangegangener Nierentransplantation detektiert. Dazu wurde in diesem Teil der Arbeit ein LFA zur Detektion von CXCL9 entwickelt. In einigen Studien wurde gezeigt, dass CXCL9 als Marker zur akuten Abstoßungsdiagnostik eingesetzt werden kann, da dieser an den Rezeptor CXCR3 bindet und dadurch u.a. T-Zellen aktiviert sowie rekrutiert (Kapitel 3.2.3). Außerdem konnte in eigenen noch nicht veröffentlichten Studien gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer AMR oder Borderline-Abstoßung eine signifikant erhöhte CXCL9-Konzentration in Biopsie-Lysaten der Nierenrinde sowie in Urin- und Plasmaproben vorliegt (Kapitel 4.4.1).

Für den späteren LFA wurden zunächst Antikörper generiert. Nach der Validierung der Hybridomaüberstände aus den Ratten und Mäusen mittels ELISA, wurden zwei Antikörper aus der Ratte und ein Antikörper aus der Maus etabliert und aufgereinigt. Zusätzlich wurde in den folgenden Versuchen ein kommerziell erworbener Antikörper eingesetzt. In den Microarray-Versuchen im Sandwich-Format haben die Antikörper AKA und AKC als einzige Kombination einen Sandwich-Komplex ausgebildet. Beide Antikörper waren dabei in der Lage als FA und DA zu fungieren. Eine höhere Affinität gegenüber CXCL9 entstand jedoch, wenn AKA als FA und AKC als DA eingesetzt wurden. Außerdem wiesen AKA und AKC insbesondere im Sandwich-Format eine deutlich höhere Affinität gegenüber CXCL9 auf als gegen die im Serum und Urin enthaltenen Proteine HSA bzw. CRP. Aus diesem Grund wurde der LFA aus diesen beiden Antikörpern aufgebaut.

Als erfolgreichste Optimierung zeigte sich die Einführung eines zweiten Konjugates (AuNP-IgG2a), das an das erste Konjugat bindet. Mithilfe des zweiten Konjugates konnten  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 im Laufpuffer mit dem entwickelten LFA detektiert werden. Bei der Verwendung von Urin-Patientenproben waren die Rotfärbungen in der Testzone mit dem entwickelten LFA nicht eindeutig erkennbar, da die CXCL9-Konzentrationen im Urin zu gering waren. Die Durchführung der LFAs mit Plasma-Patientenproben führte je nach Verdünnung und verwendeter Kombination aus zusätzlichem AuNP-IgG2a und einer Vorinkubation zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Kombination aus unverdünnter Patientenprobe, der Verwendung von AuNP-IgG2a und keiner Vorinkubation führte erfolgreich zu einer vielversprechenden Differenzierung von Patientenproben mit einer Abstoßung und Proben von gesunden Patienten mit einer Sensitivität von 53% und einer Spezifität von 71% (N=24).

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Multi-Parameter-LFA-System bestehend aus drei Lateral Flow Assays (LFAs) zur Früherkennung einer Nierenabstoßung nach einer Nierentransplantation entwickelt werden. Die zu entwickelnden LFAs sollten eine qualitative Differenzierung zwischen Patienten mit einer stattfindenden Entzündungsreaktion bzw. Abstoßung (Ja = positiv) und gesunden Patienten (Nein = negativ) liefern.

Patienten, die eine Niere transplantiert bekommen, werden vor allem in den ersten Monaten nach der Transplantation regelmäßig untersucht, um eine Abstoßungsreaktion frühzeitig diagnostizieren zu können. Eine Abstoßung kann dabei auf zellulärer oder auf humoraler Ebene stattfinden. Als Goldstandard für die Diagnose gilt die Biopsie, welche u. a. bei einem Anstieg des Serum-Kreatinin-Werts durchgeführt wird. Eine Biopsie kann jedoch mit Risiken verbunden sein und wird durch einen Spezialisten in einem Transplantationszentrum durchgeführt. Um die damit verbundenen Kosten und Risiken zu vermindern, wird nach zusätzlichen Wegen zur Früherkennung der Abstoßung des Nierentransplantates weltweit geforscht. Biomarker, die spezifisch für eine Nierentransplantatabstoßung sind, könnten über einfache Testsysteme wie einen LFA über Serum- oder Urinproben nachgewiesen werden. Ein solcher Test könnte vom Patienten selber zuhause oder Hausarzt durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden dazu die Biomarker C-reaktives Protein (CRP), sCD25 (sIL-2R $\alpha$ ) und CXCL9 (auch MIG, *Monokine induced by Gamma-Interferon*) ausgewählt. CRP zählt zu den Akute-Phase-Proteinen und dient daher zum Nachweis einer allgemeinen Entzündungsreaktion. Das Protein CD25 wird von aktivierten T-Zellen für den Aufbau des Interleukin-2-Rezeptors gebildet und in gleichen Mengen in seiner löslichen Form (sCD25) in die Umgebung sezerniert. Dieser Biomarker soll eine T-Zell-vermittelte Abstoßung im LFA anzeigen. Das dritte Protein, CXCL9, bindet an den Rezeptor CXCR3, aktiviert sowie rekrutiert T-Zellen und ist laut aktuellem Forschungsstand ein Marker der akuten Abstoßung.

Die Ziele dieser Arbeit können in drei Bereiche eingeteilt werden, die für jeden Biomarker separat untersucht wurden: (i) die Bestimmung hochaffiner Antikörper-Kombinationen aus Fängerantikörper (FA) und Detektionsantikörper (DA) mittels Microarray-Studien, (ii) die Herstellung stabiler Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate mittels Flokkulationstest und (iii) die Etablierung eines LFAs. Die zu entwickelnden LFAs beruhen auf einem Sandwich-Prinzip, sodass die Komponenten FA und DA die Biomarker simultan binden müssen.

Die Arbeit wurde durch den ‚Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung‘ (EFRE) mit dem Projekttitel ‚Screen Reject: Lateral Flow Assay zur Nierentransplantationsdiagnostik‘ und der Antragsnummer 85006385 gefördert. Das Projekt wurde mit den Kooperationspartnern Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, D) und Fassisi Deutschland GmbH (Göttingen, D) sowie im Verbund mit der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. med. Stephan Immenschuh vom Institut für

Transfusionsmedizin (ITM, MHH, Hannover, D) und der von Herr Prof. Dr.-Ing. Oliver Bott von der Abteilung Informatik und Kommunikation (IK, HsH, Hannover, D) durchgeführt.

#### *Nachweis von CRP mit Hilfe eines LFAs*

Nachdem für den Biomarker CRP im Forward-Format gezeigt wurde, dass alle vier ausgewählten monoklonalen Antikörper das Antigen spezifisch binden konnten, wurden im Sandwich-Format die besten Antikörper-Kombinationen (FA-43/DA-39, FA-39/DA-43) ermittelt. Für die Herstellung der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate konnte für die verschiedenen Detektionsantikörper je eine optimale Antikörper-Konzentration ermittelt werden, welche die Goldnanopartikel (AuNP) stabilisiert und somit vor Aggregation schützt. Zur anschließenden Etablierung eines LFAs zum Nachweis von CRP wurde zunächst die ermittelte beste Antikörper-Kombination für FA und DA (43 und 39 in beiden Ausrichtungen) verwendet. Gegensätzlich zu den Microarray-Ergebnissen zeigte nur die Kombination aus FA-43/AuNP-39 ein Signal in der Testzone. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse zwischen Microarray und LFA wurden als nächstes Kombinationen aus FA und AuNP-DA untersucht, die zuvor mittels Microarray ausgeschlossen wurden. Die Kombination von FA-39 mit AuNP-05 zeigte die intensivsten Signale in der Testzone und es konnte festgestellt werden, dass der LFA-Aufbau mit diesem Antikörperpärchen sehr sensitiv ist und CRP-Konzentrationen ab  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  detektiert werden können. Jedoch konnte auch der sogenannte *high-dose hook-effect* beobachtet werden. Dieser Effekt beschreibt die Problematik, dass sowohl bei einer niedrigen als auch einer hohen Antigen-Konzentration ein gleich intensives Signal auf der Testlinie erhalten wird. Ab einem bestimmten Verhältnis von AuNP-DA und Antigen binden immer mehr Antigen-Moleküle an den FA ohne an einen AuNP-DA gebunden zu sein, wodurch diese Bindung nicht nachgewiesen werden kann. CRP wird bei gesunden Menschen dauerhaft exprimiert, kann bei erkrankten Menschen aber auf ein Vielfaches ansteigen. Aus diesem Grund wurde für den LFA eine Nachweisgrenze von  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP gesetzt. Um den *high-dose hook-effect* zu umgehen und dennoch eine Entzündungsreaktion in der Testzone eindeutig identifizieren zu können, wurden zwei verschiedene Strategien entwickelt.

In der ersten Strategie sollte ein Signal in der Testzone nur bei einer CRP-Konzentration unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ausgebildet werden. Dazu wurden die Konzentrationen der FAs und DAs so gewählt, dass die Epitope beider Antikörper ab  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP vollständig mit CRP gebunden gesättigt waren und somit kein Sandwich-Komplex mehr ausgebildet werden konnte. Mit zahlreichen Optimierungsschritten dieser Strategie konnte zwar eine weniger intensive Rotfärbung in den Testzonen bei hohen CRP-Konzentrationen erreicht werden, jedoch konnte das Signal in der Testzone bei CRP-Konzentrationen über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nicht eliminiert werden.

In der zweiten Strategie sollte ein Signal in der Testzone nur bei einer CRP-Konzentration über  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ausgebildet werden, bei einer CRP-Konzentration unter  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sollte kein Signal erkennbar sein. Dazu wurde eine ‚versteckte‘ Hilfszone (HZ) eingeführt. Diese wurde so auf die Membran aufgetragen, dass sie für den Anwender später nicht sichtbar war und sollte überschüssiges CRP vor der eigentlichen Testzone binden. Mit der HZ konnten Rotfärbungen in der Testzone bis  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP verhindert werden, bei  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  war diese jedoch gut zu sehen. Aufgrund des *high-dose hook-effects* war jedoch bei  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP im Laufpuffer ebenfalls keine Rotfärbung detektierbar. Durch eine 15-minütige Vorinkubation der Probenflüssigkeit mit einem anderen CRP-spezifischen Antikörper (43) vor Probenaufgabe auf den LFA wurde die Intensität der Rotfärbung in der Testzone weiter gesenkt. Diese Vorinkubation konnte auch durch ein weiteres *Release Pad*, auf dem die CRP-spezifischen Antikörper aufgetragen wurden, ersetzt werden. Die Kombination der HZ und des zusätzlichen *Release Pads* auf dem LFA führten schließlich zu einem deutlichen Signal in der Testzone ab  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , wobei bis mind.  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  eine Rotfärbung in der Testzone ausgebildet wurde. Somit wurde erfolgreich ein LFA zum Nachweis des Entzündungsmarkers CRP mit einer Ja/Nein-Antwort für relevante pathologische CRP-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit realisiert. Zur finalen Testcharakterisierung müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den genauen Detektionsbereich eingrenzen zu können, sodass der LFA reproduzierbar hergestellt werden kann. Außerdem sollte der entwickelte LFA mit Hilfe von Patientenproben validiert werden.

### *Nachweis von sCD25 mit Hilfe eines LFAs*

Als potentieller Biomarker zur Früherkennung einer Nierenabstoßung wurde sCD25 untersucht. Die Analyse dreier unabhängiger Kohorten mittels *Multiplex-Protein-Assays* (Biorad) und ELISA haben gezeigt, dass sCD25 in Urin- und Plasmaproben von Patienten mit einer T-Zell-vermittelten Abstoßung signifikant erhöht ist im Vergleich zu Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (1. Kohorte: Plasma TCMR:  $595,6 \pm 817,4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Plasma Normal:  $149,7 \pm 324,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ; 2. Kohorte: Plasma TCMR:  $217 \pm 124,9 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Plasma Normal:  $76,5 \pm 35,4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ; Urin TCMR:  $158,9 \pm 218,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Urin Normal:  $92,1 \pm 24,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,001$ ; 3. Kohorte: Urin TCMR:  $124,3 \pm 103,3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Urin Normal:  $48,9 \pm 35,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,001$ ). Als Richtwert in dieser Arbeit wurde für Patienten mit einer TCMR eine sCD25-Konzentration von  $141 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  für Urin und  $406 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  für Plasma verwendet.

Mithilfe der Microarray-Studien konnte die affinste und am spezifischsten bindende Antikörper-Kombinationen (FA-AF/DA-BAF) ermittelt werden. Im Flokkulationstest wurde die optimale Antikörper-Konzentrationen für die Herstellung der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate ermittelt ( $9,00 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), damit die AuNP stabilisiert und vor Aggregation geschützt waren. Zur

Etablierung des LFAs wurden FA-AF in der Testzone sowie AuNP-BAF auf dem *Release Pad* aufgegeben; diese Kombination führte zu erfolgreichen Signalen. Um die Nachweisgrenze (Urin:  $141 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Plasma:  $406 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) von sCD25 in Patientenproben zu erreichen, wurde der LFA-Aufbau mit einer zusätzlichen 15-minütigen Vorinkubation der Probenflüssigkeit mit AuNP-BAF sowie der Reduzierung der BAF-Konzentration auf den AuNP erfolgreich optimiert. Die Anwendung von 35 Urinproben von Patienten mit der Diagnose TCMR, zwei Proben von Patienten mit der Diagnose Borderline-Abstoßung, je eine Probe von Patienten mit einem Mix aus AMR/TCMR und AMR/Borderline sowie 13 Urin-Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie und führte zu einer erfolgreichen Ja/Nein-Antwort für relevante pathologische sCD25-Konzentrationen mit einer Sensitivität von 87,5 % und Spezifität von 84,6 % des entwickelten LFAs. Als Goldstandard für die Diagnose einer Nierenabstoßung zählen zurzeit die Biopsie sowie der Serum-Kreatinin-Spiegel. Anhand der geschätzten glomerulären Filtrationsrate, die mit den Serum-Kreatinin-Werten der Patientenproben berechnet wird, konnte für den Diagnose-Goldstandard eine Sensitivität von 85 % und eine im Vergleich zum LFA deutlich geringere Spezifität von 30,8 % berechnet werden. Zusätzlich zeigten jeweils 50 % der LFAs mit Proben von Patienten mit einer Borderline-Abstoßung oder einer Kombination aus Antikörper-vermittelter Abstoßung (AMR) und Borderline-Abstoßung sowie AMR und TCMR eine Abstoßung an. Patienten mit der Diagnose Borderline-Abstoßungen sind verdächtig auf eine Abstoßung, erfüllen jedoch nicht die BANFF-Kriterien einer TCMR. Aus diesem Grund ist es plausibel, dass auch diese Patientenproben teilweise eine Abstoßung im entwickelten LFA anzeigen. Da hier allerdings nur eine geringe Menge an Patientenproben zur Verfügung stand, muss diese Patientengruppe noch in einer größeren Kohorte untersucht werden. Zusätzlich sollten Infektionskrankheiten wie die Polynomavirus-Infektion auf dem in dieser Arbeit entwickelten LFA getestet werden, da Infektionskrankheiten zusammen mit den Abstoßungsreaktionen die Hauptgründe für den Verlust einer transplantierten Niere sind.

#### *Nachweis von CXCL9 mit Hilfe eines LFAs*

Als dritter Biomarker für das Multi-Parameter-LFA-System und zur Detektion einer Nierenabstoßung wurde CXCL9 gewählt. Bei der Untersuchung von Lysaten aus Nierenstanzyllindern der Transplantatbiopsien von Nierentransplantatempfängern konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer AMR oder Borderline-Abstoßung eine signifikant erhöhte CXCL9-Konzentration in der Nierenrinde vorliegt. Eine zusätzliche Untersuchung von Urin- und Plasmaproben konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte CXCL9-Konzentration bei Patienten, bei denen nach BANFF-Kriterien eine AMR oder Borderline-Abstoßung (Urin: AMR,  $145,6 \pm 149,3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,00001$ ; Borderline-Abstoßung,  $128,9 \pm 159,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,002$ ;

Plasma: AMR,  $722,3 \pm 604,9 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $p < 0,001$ ) vorlag, gegenüber Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (Normal; Urin:  $34,9 \pm 30,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Plasma:  $213,6 \pm 160,2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) identifiziert werden.

Zur Generierung von hochaffinen, monoklonalen Antikörpern gegen CXCL9 wurde das Helmholtz Zentrum München beauftragt. Die Validierung der Hybridomaüberstände aus Ratte und Maus wurden in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum Braunschweig mittels ELISA durchgeführt und es wurden schließlich zwei Antikörper aus der Ratte (AKA und AKC) sowie ein Antikörper aus der Maus (AKB) als geeignet ausgewählt und produziert. Für die Microarray-Versuche wurde noch ein weiterer industriell erworbener CXCL9-spezifischer Antikörper (AKD) hinzugezogen.

Mittels Microarray-Studien konnte im Forward-Format gezeigt werden, das AKA, AKC und AKD CXCL9 spezifisch binden. Im Sandwich-Format erwiesen sich die Antikörper AKA und AKC in beiden Ausrichtungen als das affinste Antikörperpärchen. AKC konnte anschließend erfolgreich an AuNPs konjugiert werden. Zur Etablierung des LFAs wurden FA-AKA in der Testzone sowie AuNP-AKC auf dem *Release Pad* aufgegeben und es konnte CXCL9 mit einer Konzentration von  $6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  detektiert werden. Um sich der Nachweisgrenze von  $127,6 \pm 143,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Urin) bzw.  $721 \pm 678 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Plasma) zu nähern, wurden verschiedene Optimierungsstrategien verwendet. Durch eine maschinelle Auftragung der FAs auf die Membran (vom Kooperationspartner Fassisi GmbH) sowie durch die Verwendung eines weiteren zur Signalverstärkung genutzten Konjugats (AuNP-IgG2a), das an den DA des eigentlichen Konjugats gebunden hatte, konnte die Nachweisgrenze für CXCL9 auf  $1562,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  optimiert werden. Der hier entwickelte LFA konnte aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze nicht für Urinproben verwendet werden. Bei der Verwendung von Plasma-Proben wurden Signale in der Testzone erzeugt, wenn die Probe unverdünnt aufgetragen wurde und die zusätzliche Signalverstärkung erfolgte. Insgesamt wurden 17 LFAs mit Proben von Patienten mit einer nach BANFF-Kriterien vorliegenden Nierenabstoßung sowie sieben Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie durchgeführt, welche eine erfolgreiche Ja/Nein-Antwort für relevante pathologische CXCL9-Konzentrationen mit einer Sensitivität von 53 % und einer Spezifität von 71 % lieferten.

Die meisten Nachweisgrenzen für LFAs liegen minimal in einem Bereich von  $0,1 - 50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>125,126</sup>; die Konzentration von CXCL9 bei Patienten mit einer Abstoßungsreaktion liegt jedoch in einem niedrigeren Bereich zwischen  $120 - 750 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Diese niedrigen Nachweisgrenzen erschweren die Detektion des Proteins und erfordern einen optimalen LFA-Aufbau, um ein eindeutiges Testergebnis (Ja/Nein) aufweisen zu können. Um diesen Aufbau zukünftig noch weiter zu optimieren, könnten u.a. die Testzone, das Konjugat sowie die Vorbehandlung des *Release Pads* weiter betrachtet werden. Durch die maschinelle Auftragung der FAs zur Detektion von CXCL9 durch den Kooperationspartner wurde die Menge der Antikörper

im Vergleich zur händischen Auftragung auf der Membran reduziert, da das Standardprotokoll der externen Firma verwendet wurde. Für eine weitere Optimierung des LFAs zum Nachweis von CXCL9 könnte die Menge der FAs bei maschineller Auftragung erhöht werden. Bei der Herstellung der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate wurde mittels Flokkulationstest die minimale Antikörperkonzentration bestimmt, die für die Stabilisierung der AuNPs benötigt wird und anschließend für die Konjugation verwendet. Pro AuNP mit einem Durchmesser von 19,6 nm können theoretisch 30 Antikörper, von denen jeder 40 nm<sup>2</sup> beansprucht<sup>174-176</sup>, auf der Gold-Oberfläche immobilisiert werden. Aufgrund von sterischen Hinderungen durch die ungerichtete Adsorption und eventuelle Anlagerung der Antikörper in mehreren Schichten, kann nicht jeder immobilisierte Antikörper ein Antigen binden. Dadurch werden die Antikörper und ihre Bindestellen ineffizient genutzt und folglich sollten Konjugate mit einer geringeren Antikörperkonzentration untersucht werden.<sup>157</sup> Anstelle des Signalverstärkers AuNP-IgG2a, der an den ersten Detektionsantikörper bindet, könnte ein Antikörper als Signalverstärker eingesetzt werden, der an das zur Stabilisation der AuNPs eingesetzte BSA bindet. Zur weiteren Optimierung des Konjugats sollte der isoelektrische Punkt (pI) der Antikörper bestimmt werden, da für die Konjugation ein pH-Wert, der leicht über dem pI-Wert des Antikörpers liegt, empfohlen wird. Außerdem könnten sowohl AuNPs mit einem größeren Durchmesser sowie andere Nanopartikel (Latex, Karbon Nanopartikel, Platin Nanopartikel, etc.) oder z.B. Fluorophore zur Detektion getestet werden, um ein stärkeres Signal zu erzeugen. Bei der Verwendung von Fluorophoren wird zur Auslese ein zusätzliches Gerät verwendet werden und auf deren Lichtstabilität geachtet werden. Außerdem sollte der LFA mit einer größeren Menge an Patientenproben weiter validiert werden. Zudem muss überprüft werden, ob der LFA z.B. auch eine BK Virus-Infektion, bei der laut Jackson et al. auch ein erhöhtes CXCL9-Level vorliegt, detektieren kann.<sup>167</sup>

Zudem sollte ihre Langzeitstabilität geprüft werden, um Lagerungszeiten und Bedingungen festlegen zu können. Bei den entwickelten LFAs ergeben sich noch einige Limitierungen für die Anwender. Die 15-minütige Vorinkubation zur Detektion von sCD25, das Verwenden von Plasma zur Detektion von CXCL9 sowie die nicht immer eindeutige Auswertung (z.B. geringer Signalkontrast, unzureichende Schulung oder Vorurteile des Benutzers) sollten künftig hinsichtlich größtmöglicher Benutzerfreundlichkeit bei der Anwendung weiter betrachtet werden. Dazu könnten eventuell weitere Pads verwendet werden, sodass die Probe langsamer den Streifen entlangwandert. Die nicht immer eindeutige Auswertung könnte mit Hilfe eines Fotos von dem LFA-Ergebnis, das von einem elektronischen Gerät (z.B. Smartphone) ausgewertet wird, umgangen werden.

In dieser Arbeit konnten erfolgreich drei LFAs zur Detektion von CRP, sCD25 und CXCL9 entwickelt werden. Unter Verwendung von Patientenproben konnte für den LFA zur Detektion

von sCD25 eine Sensitivität von 87,5% und Spezifität von 84,6% erreicht werden. Der LFA zur Detektion von CXCL9 erzielte eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 71%. Diese drei LFAs bieten künftig vereint in einem Multi-Parameter-LFA-System die Möglichkeit eine Transplantatabstoßung nach vorangegangener Nierentransplantation frühzeitig, einfach, vor Ort und nicht-invasiv erkennen zu können und somit Kontroll-Biopsien mit hohen Risikofaktoren, Kosten und Zeitaufwand auf ein Minimum zu reduzieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), Grafiken zum Tätigkeitsbericht 2019. 2020. <https://dso.de/BerichteTransplantationszentren/Grafiken%20D%202019%20Niere.pdf>, (last accessed March 2021).
2. Segerer K., Wanner C. und Steffel J. et al., Niere und Ableitende Harnwege, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2014.
3. Tan S. Y. und Merchant J., Joseph Murray (1919-2012): First transplant surgeon, *Singapore medical journal*, 2019, 60, 162. 10.11622/smedj.2019032.
4. Rink L., Kruse A. und Haase H., Immunologie für Einsteiger, 2nd edn., Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2015.
5. Murphy, Janeway Immunologie, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2018.
6. Coico R. und Sunshine G., Immunology. A short course, Chichester, Wiley-Blackwell, 2015.
7. Pfitzmann R., Neuhaus P. und Hetzer R., eds., Organtransplantation. Transplantation thorakaler und abdomineller Organe, Berlin, De Gruyter, 2001.
8. Genberg H., Kumlien G. und Wennberg L. et al., ABO-incompatible kidney transplantation using antigen-specific immunoabsorption and rituximab: a 3-year follow-up, *Transplantation*, 2008, 85, 1745. 10.1097/TP.0b013e3181726849.
9. Montgomery R. A., Lonze B. E. und King K. E. et al., Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival, *The New England journal of medicine*, 2011, 365, 318. 10.1056/NEJMoa1012376.
10. Montgomery J. R., Berger J. C. und Warren D. S. et al., Outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation in the United States, *Transplantation*, 2012, 93, 603. 10.1097/TP.0b013e318245b2af.
11. Hillebrand G. F., Nierentransplantation nachgefragt, 1st edn., s.l., THIEME, 2005.
12. Voiculescu A., Schlieper G. und Hetzel G.-R. et al., Kidney transplantation in the elderly: age-matching as compared to HLA-matching: a single center experience, *Transplantation*, 2002, 73, 1356. 10.1097/00007890-200204270-00032.
13. Mizutani K. und Terasaki P., Trends in serum creatinine levels and transplant year, *Clinical transplants*, 2005, 355.
14. Serón D., Anaya F. und Marcén R. et al., Recomendaciones para la indicación, obtención, procesamiento y evaluación de biopsias en el trasplante renal, *Nefrologia publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, 2008, 28, 385.
15. Mühlfeld A., Lehnert (Hg.) 2019 – DGIM Innere Medizin. In: p 1. 10.1007/978-3-642-54676-1\_288-1.
16. Colvin R. B., Cohen A. H. und Saiontz C. et al., Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation, *Journal of the American Society of Nephrology JASN*, 1997, 8, 1930.
17. Mengel M., Protokollbiopsie nach Nierentransplantation, *Nephrologe*, 2008, 3, 216. 10.1007/s11560-008-0148-9.
18. Schwarz A., Mengel M. und Gwinner W. et al., Protocol biopsy program after renal transplantation: structure and first results, *Transplantation proceedings*, 2002, 34, 2238. 10.1016/S0041-1345(02)03286-4.
19. Schwarz A., Gwinner W. und Hiss M. et al., Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2005, 5, 1992. 10.1111/j.1600-6143.2005.00988.x.
20. Wilczek H. E., Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies, *Transplantation*, 1990, 50, 790. 10.1097/00007890-199011000-00010.
21. Halloran P. F., Immunosuppressive drugs for kidney transplantation, *The New England journal of medicine*, 2004, 351, 2715. 10.1056/NEJMra033540.
22. Lucena D. D. de, Sá J. R. de und Medina-Pestana J. O. et al., Modifiable Variables Are Major Risk Factors for Posttransplant Diabetes Mellitus in a Time-Dependent Manner in Kidney

- Transplant: An Observational Cohort Study, *Journal of diabetes research*, 2020, 2020, 1938703. 10.1155/2020/1938703.
23. Golgert W. A., Appel G. B. und Hariharan S., Recurrent glomerulonephritis after renal transplantation: an unsolved problem, *Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN*, 2008, 3, 800. 10.2215/CJN.04050907.
  24. Kasiske B. L., Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients, *The American journal of medicine*, 1988, 84, 985. 10.1016/0002-9343(88)90302-6.
  25. Au E., Wong G. und Chapman J. R., Cancer in kidney transplant recipients, *Nature reviews. Nephrology*, 2018, 14, 508. 10.1038/s41581-018-0022-6.
  26. Joosten S. A., Sijpkens Y. W. J. und van Kooten C. et al., Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations, *Kidney international*, 2005, 68, 1. 10.1111/j.1523-1755.2005.00376.x.
  27. Delmas S., Picot M. C. und Vergnes C. et al., Facteurs de risque de rejet chronique en transplantation rénale, résultats d'une étude monocentrique, *Nephrologie*, 1999, 20, 153.
  28. Mikhalski D., Wissing K. M. und Ghisdal L. et al., Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression, *Transplantation*, 2008, 85, S3-9. 10.1097/TP.0b013e318169c29e.
  29. Debout A., Foucher Y. und Trébern-Launay K. et al., Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation, *Kidney international*, 2015, 87, 343. 10.1038/ki.2014.304.
  30. Kuhlmann U., Böhler J. und Luft F. et al., eds., *Nephrologie*, 5th edn., THIEME, 2008.
  31. Solez K., Axelsen R. A. und Benediktsson H. et al., International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology, *Kidney international*, 1993, 44, 411. 10.1038/ki.1993.259.
  32. Halloran P. F., Wadgymar A. und Ritchie S. et al., The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection, *Transplantation*, 1990, 49, 85. 10.1097/00007890-199001000-00019.
  33. Loupy A., Haas M. und Roufosse C. et al., The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2020, 20, 2318. 10.1111/ajt.15898.
  34. Joosten S. A., Kooten C. und Paul L. C., Pathogenesis of chronic allograft rejection, *Transplant Int*, 2003, 16, 137. 10.1111/j.1432-2277.2003.tb00277.x.
  35. Suchin E. J., Langmuir P. B. und Palmer E. et al., Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 2001, 166, 973. 10.4049/jimmunol.166.2.973.
  36. Sherman L. A. und Chattopadhyay S., The molecular basis of allorecognition, *Annual review of immunology*, 1993, 11, 385. 10.1146/annurev.iy.11.040193.002125.
  37. Nankivell B. J. und Alexander S. I., Rejection of the kidney allograft, *The New England journal of medicine*, 2010, 363, 1451. 10.1056/NEJMra0902927.
  38. Womer K. L., Sayegh M. H. und Auchincloss H., Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2001, 356, 639. 10.1098/rstb.2001.0843.
  39. Colvin R. B., Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis, *Journal of the American Society of Nephrology JASN*, 2007, 18, 1046. 10.1681/ASN.2007010073.
  40. Naik R. H. und Shawar S. H., StatPearls. Renal Transplantation Rejection, Treasure Island (FL), 2021.
  41. Patel R. und Terasaki P. I., Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation, *The New England journal of medicine*, 1969, 280, 735. 10.1056/NEJM196904032801401.
  42. Einecke G., Sis B. und Reeve J. et al., Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2009, 9, 2520. 10.1111/j.1600-6143.2009.02799.x.

43. Cohen D., Colvin R. B. und Daha M. R. et al., Pros and cons for C4d as a biomarker, *Kidney international*, 2012, 81, 628. 10.1038/ki.2011.497.
44. Gosset C., Lefaucheur C. und Glotz D., New insights in antibody-mediated rejection, *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2014, 23, 597. 10.1097/MNH.0000000000000069.
45. Puttarajappa C., Shapiro R. und Tan H. P., Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review, *Journal of transplantation*, 2012, 2012, 193724. 10.1155/2012/193724.
46. Haas M., The significance of C4d staining with minimal histologic abnormalities, *Current opinion in organ transplantation*, 2010, 15, 21. 10.1097/MOT.0b013e3283342ebd.
47. Frei U., Klempnauer J. und Ringe B. et al., eds., Langzeitüberleben nach Nierentransplantation sichern, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2001.
48. Rotman S., Collins A. B. und Colvin R. B., C4d deposition in allografts: current concepts and interpretation, *Transplantation Reviews*, 2005, 19, 65. 10.1016/j.trre.2005.05.001.
49. Mauyyedi S., Crespo M. und Collins A. B. et al., Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification, *Journal of the American Society of Nephrology JASN*, 2002, 13, 779.
50. Weidemann A., Büttner M. und Amann K. et al., BANFF-Klassifikation der Histologie von Nierentransplantaten und therapeutische Konsequenzen, *Nephrologe*, 2015, 10, 113. 10.1007/s11560-014-0912-y.
51. Singh N., Samant H. und Hawxby A. et al., Biomarkers of rejection in kidney transplantation, *Current opinion in organ transplantation*, 2019, 24, 103. 10.1097/MOT.0000000000000606.
52. Eikmans M., Gielis E. M. und Ledeganck K. J. et al., Non-invasive Biomarkers of Acute Rejection in Kidney Transplantation: Novel Targets and Strategies, *Frontiers in medicine*, 2018, 5, 358. 10.3389/fmed.2018.00358.
53. Tillett W. S. und Francis T., Serological Reactions In Pneumonia With A Non-Protein Somatic Fraction Of Pneumococcus, *The Journal of experimental medicine*, 1930, 52, 561. 10.1084/jem.52.4.561.
54. Pepys M. B. und Hirschfield G. M., C-reactive protein: a critical update, *The Journal of clinical investigation*, 2003, 111, 1805. 10.1172/JCI18921.
55. Roux K. H., Kilpatrick J. M. und Volanakis J. E. et al., Localization of the phosphocholine-binding sites on C-reactive protein by immunoelectron microscopy, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 1983, 131, 2411.
56. Shrive A. K., Gheetham G. M. und Holden D. et al., Three dimensional structure of human C-reactive protein, *Nat Struct Mol Biol*, 1996, 3, 346. 10.1038/nsb0496-346.
57. Narkates A. J. und Volanakis J. E., C-reactive protein binding specificities: artificial and natural phospholipid bilayers, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, 389, 172. 10.1111/j.1749-6632.1982.tb22135.x.
58. KUSHNER I. und Kaplan M. H., Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions, *The Journal of experimental medicine*, 1961, 114, 961. 10.1084/jem.114.6.961.
59. Kaplan M. H. und Volanakis J. E., Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 1974, 112, 2135.
60. Siegel J., Rent R. und Gewurz H., Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera, *The Journal of experimental medicine*, 1974, 140, 631. 10.1084/jem.140.3.631.
61. DiCamelli R., Potempa L. A. und Siegel J. et al., Binding reactivity of C-reactive protein for polycations, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 1980, 125, 1933.
62. Potempa L. A., Siegel J. N. und Gewurz H., Binding reactivity of C-reactive protein for polycations. II. Modulatory effects of calcium and phosphocholine, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 1981, 127, 1509.

63. Black S., Agrawal A. und Samols D., The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct, *Molecular Immunology*, 2003, 39, 1045. 10.1016/s0161-5890(03)00031-2.
64. Lee R. T., Takagahara I. und Lee Y. C., Mapping the binding areas of human C-reactive protein for phosphorylcholine and polycationic compounds. Relationship between the two types of binding sites, *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277, 225. 10.1074/jbc.M106039200.
65. Abrams S. T., Zhang N. und Dart C. et al., Human CRP defends against the toxicity of circulating histones, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 2013, 191, 2495. 10.4049/jimmunol.1203181.
66. Gershov D., Kim S. und Brot N. et al., C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response: Implications for Systemic Autoimmunity, *The Journal of experimental medicine*, 2000, 192, 1353.
67. Shih H. H., Zhang S. und Cao W. et al., CRP is a novel ligand for the oxidized LDL receptor LOX-1, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2009, 296, H1643-50. 10.1152/ajpheart.00938.2008.
68. Robey F. A., Jones K. D. und Tanaka T. et al., Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein, *The Journal of biological chemistry*, 1984, 259, 7311.
69. Du Clos T. W., Zlock L. T. und Rubin R. L., Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 1988, 141, 4266.
70. Pepys M. B., C-Reactive Protein Fifty Years On, 1981. 10.1016/S0140-6736(81)91565-8.
71. Kolb-Bachofen V., A Review on the Biological Properties of C-Reactive Protein, *Immunobiology*, 1991, 183, 133. 10.1016/S0171-2985(11)80193-2.
72. Palosuo T., Husman T. und Koistinen J. et al., C-reactive protein in population samples, *Acta medica Scandinavica*, 1986, 220, 175. 10.1111/j.0954-6820.1986.tb02746.x.
73. Salazar J., Martínez M. S. und Chávez-Castillo M. et al., C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation, *International scholarly research notices*, 2014, 2014, 653045. 10.1155/2014/653045.
74. Abedini S., Holme I. und März W. et al., Inflammation in renal transplantation, *Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN*, 2009, 4, 1246. 10.2215/CJN.00930209.
75. Roshdy A., El-Khatib M. M. und Rizk M. N. et al., CRP and acute renal rejection: a marker to the point, *International urology and nephrology*, 2012, 44, 1251. 10.1007/s11255-011-0098-4.
76. Ozdemir N. F., Elsurer R. und Ibis A. et al., Serum C-reactive protein surge in renal transplant recipients: link with allograft survival, *Transplantation proceedings*, 2007, 39, 934. 10.1016/j.transproceed.2007.02.023.
77. Robb R. J., Rusk C. M. und Yodoi J. et al., Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: analysis of its role in formation of high-affinity receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84, 2002. 10.1073/pnas.84.7.2002.
78. Nakarai T., Robertson M. J. und Streuli M. et al., Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells, *The Journal of experimental medicine*, 1994, 180, 241. 10.1084/jem.180.1.241.
79. Robb R. J., Greene W. C. und Rusk C. M., Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen, *The Journal of experimental medicine*, 1984, 160, 1126. 10.1084/jem.160.4.1126.
80. Asao H., Reference module in biomedical sciences. In: Caplan, M. J. (ed.), [Amsterdam?], Elsevier, 2014-. 10.1016/B978-0-12-801238-3.04058-7.
81. Hemler M. E., Brenner M. B. und McLean J. M. et al., Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81, 2172. 10.1073/pnas.81.7.2172.
82. Liao W., Lin J.-X. und Leonard W. J., Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy, *Immunity*, 2013, 38, 13. 10.1016/j.immuni.2013.01.004.

83. Rubin L. A. und Nelson D. L., The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application, *Annals of internal medicine*, 1990, 113, 619. 10.7326/0003-4819-113-8-619.
84. Uchiyama T., Hori T. und Tsudo M. et al., Interleukin-2 receptor (Tac antigen) expressed on adult T cell leukemia cells, *The Journal of clinical investigation*, 1985, 76, 446. 10.1172/JCI111992.
85. Church A. C., Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor, *QJM monthly journal of the Association of Physicians*, 2003, 96, 91. 10.1093/qjmed/hcg014.
86. Rasool R., Yousuf Q. und Masoodi K. Z. et al., Relationship between Serum Soluble Interleukin-2 Receptor and Renal Allograft Rejection: A Hospital-Based Study in Kashmir Valley, *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 2015, 6, 8.
87. Hagraas A. M., Salah D. M. und Ahmed D. H. et al., Serum Soluble Interleukin 2 Receptor Level as a Marker of Acute Rejection in Pediatric Kidney Transplant Recipients, *Nephron*, 2018, 139, 30. 10.1159/000486402.
88. Gupta R. K., Jain M. und Sharma R. K., Serum & urinary interleukin-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection, *The Indian journal of medical research*, 2004, 119, 24.
89. Zucchelli G. C., Clerico A. und Maria R. de et al., Increased circulating concentrations of interleukin 2 receptor during rejection episodes in heart- or kidney-transplant recipients, *Clinical Chemistry*, 1990, 36, 2106.
90. Database G. H. G., CXCL9 Gene - GeneCards | CXCL9 Protein | CXCL9 Antibody. 2020. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL9>, (last accessed April 2020).
91. Liu L., Callahan M. K. und Huang D. et al., Chemokine Receptor CXCR3: An Unexpected Enigma, *Current topics in developmental biology*, 2005, 68, 149. 10.1016/S0070-2153(05)68006-4.
92. Plewig G. und Prinz J. C., Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. Vorträge und Dia-Klinik der 18. Fortbildungswoche 2002. Fortbildungswoche für Praktische Dermatologie und Venerologie e.V. c/o Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Ludwig-Maximilians-Universität München in Verbindung mit dem Berufsverband der Deutschen Dermatologen e.V, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2003.
93. Liao F., Rabin R. L. und Yannelli J. R. et al., Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization, *The Journal of experimental medicine*, 1995, 182, 1301. 10.1084/jem.182.5.1301.
94. Nakajima C., Mukai T. und Yamaguchi N. et al., Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN- $\gamma$  stimulation, *Eur. J. Immunol.*, 2002, 32, 1792. 10.1002/1521-4141(200206)32:6<1792:AID-IMMU1792>3.0.CO;2-0.
95. Loetscher M., Gerber B. und Loetscher P. et al., Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes, *The Journal of experimental medicine*, 1996, 184, 963. 10.1084/jem.184.3.963.
96. Mendel I., Kerlero de Rosbo N. und Ben-Nun A., A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells, *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 1951. 10.1002/eji.1830250723.
97. Rabin R. L., Alston M. A. und Sircus J. C. et al., CXCR3 is induced early on the pathway of CD4+ T cell differentiation and bridges central and peripheral functions, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 2003, 171, 2812. 10.4049/jimmunol.171.6.2812.
98. Janatpour M. J., Hudak S. und Sathe M. et al., Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment, *The Journal of experimental medicine*, 2001, 194, 1375. 10.1084/jem.194.9.1375.
99. García-López M. A., Sánchez-Madrid F. und Rodríguez-Frade J. M. et al., CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 2001, 81, 409. 10.1038/labinvest.3780248.

100. Hu H., Kwun J. und Aizenstein B. D. et al., Noninvasive detection of acute and chronic injuries in human renal transplant by elevation of multiple cytokines/chemokines in urine, *Transplantation*, 2009, 87, 1814. 10.1097/TP.0b013e3181a66b3e.
101. Ciftci H. S., Tefik T. und Savran M. K. et al., Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Acute Renal Graft Rejection, *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 2019, 10, 53.
102. King L. B. und Corley R. B., Characterization of a presecretory phase in B-cell differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86, 2814. 10.1073/pnas.86.8.2814.
103. Slifka M. K., Antia R. und Whitmire J. K. et al., Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells, *Immunity*, 1998, 8, 363. 10.1016/S1074-7613(00)80541-5.
104. Lipman N. S., Jackson L. R. und Trudel L. J. et al., Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources, *ILAR journal*, 2005, 46, 258. 10.1093/ilar.46.3.258.
105. Maddison S. E. und Reimer C. B., Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion: a review, *Clinical Chemistry*, 1976, 22, 594.
106. Cohen S. und Milstein C., Structure and biological properties of immunoglobulins, *Advances in immunology*, 1967, 7, 1. 10.1016/s0065-2776(08)60126-1.
107. Hufnagel A. und Brettschneider K., Rekombinante Antikörper - Eine vollkommen neue Ära für Therapie und Diagnostik, *Die Aktuelle-Wochenschau der GDCh-Fachgruppe Biochemie*, 2013.
108. Leenaars M. und Hendriksen C. F. M., Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations, *ILAR journal*, 2005, 46, 269. 10.1093/ilar.46.3.269.
109. Burnette W. N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical biochemistry*, 1981, 112, 195. 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
110. Schubert-Ullrich P., Rudolf J. und Ansari P. et al., Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009, 395, 69. 10.1007/s00216-009-2715-y.
111. Highton J. und Hessian P., A solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein: clinical value and the effect of rheumatoid factor, *Journal of immunological methods*, 1984, 68, 185. 10.1016/0022-1759(84)90149-2.
112. Köhler G. und Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 1975, 256, 495. 10.1038/256495a0.
113. Nelson P. N., Reynolds G. M. und Waldron E. E. et al., Monoclonal antibodies, *Molecular pathology MP*, 2000, 53, 111. 10.1136/mp.53.3.111.
114. Bordeaux J., Welsh A. und Agarwal S. et al., Antibody validation, *BioTechniques*, 2010, 48, 197. 10.2144/000113382.
115. Liu H. F., Ma J. und Winter C. et al., Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, *mAbs*, 2010, 2, 480. 10.4161/mabs.2.5.12645.
116. Gonzalez J. M., Francis B. und Burda S. et al., Development of a POC test for TB based on multiple immunodominant epitopes of M. tuberculosis specific cell-wall proteins, *PloS one*, 2014, 9, e106279. 10.1371/journal.pone.0106279.
117. Hnasko R., Lin A. V. und McGarvey J. A., Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxin-B by Lateral Flow Assay, *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 2019, 38, 209. 10.1089/mab.2019.0028.
118. Shome R., Filia G. und Padmashree B. S. et al., Evaluation of lateral flow assay as a field test for investigation of brucellosis outbreak in an organized buffalo farm: A pilot study, *Veterinary world*, 2015, 8, 492. 10.14202/vetworld.2015.492-496.
119. Phan J. C., Pettitt J. und George J. S. et al., Lateral Flow Immunoassays for Ebola Virus Disease Detection in Liberia, *The Journal of infectious diseases*, 2016, 214, S222-S228. 10.1093/infdis/jiw251.

120. Parolo C., Sena-Torralla A. und Bergua J. F. et al., Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays, *Nature protocols*, 2020, 15, 3788. 10.1038/s41596-020-0357-x.
121. Wong R. und Tse H., Lateral Flow Immunoassay, Totowa, NJ, Humana Press a part of Springer Science+Business Media LLC, 2009.
122. Jiang X. und Lillehoj P. B., Lateral flow immunochromatographic assay on a single piece of paper, *The Analyst*, 2021, 146, 1084. 10.1039/d0an02073g.
123. Posthuma-Trumpie G. A., Korf J. und van Amerongen A., Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009, 393, 569. 10.1007/s00216-008-2287-2.
124. Posthuma-Trumpie G. A. und van Amerongen A., Lateral Flow Assay, *Antibodies Applications and NEw Developments*, 2012, 175. 10.1007/978-1-59259-951-6\_6.
125. Bahadır E. B. und Sezgintürk M. K., Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 82, 286. 10.1016/j.trac.2016.06.006.
126. Sajid M., Kawde A.-N. und Daud M., Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, 19, 689. 10.1016/j.jscs.2014.09.001.
127. Mansfield M. A., Drugs of abuse: Body fluid testing. In: Wong, R. C., Tse, H. Y. (eds.), Totowa, NJ, Humana Press, 2005, p 71. 10.1007/978-1-59259-951-6\_4.
128. van Rossum D., UniSart nitrocellulose membranes in lateral flow immunoassay, 2016.
129. O'Farrell B., Lateral Flow Immunoassay. In: Wong, R., Tse, H. (eds.), Totowa, NJ, Humana Press, 2009, p 1. 10.1007/978-1-59745-240-3\_1.
130. Ross G. M. S., Salentijn G. I. und Nielen M. W. F., A Critical Comparison between Flow-through and Lateral Flow Immunoassay Formats for Visual and Smartphone-Based Multiplex Allergen Detection, *Biosensors*, 2019, 9. 10.3390/bios9040143.
131. Wang S., Zhang C. und Zhang Y., Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2009, 504, 237. 10.1007/978-1-60327-569-9\_15.
132. Qian S. und Bau H. H., Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format, *Analytical biochemistry*, 2004, 326, 211. 10.1016/j.ab.2003.12.019.
133. Koczula K. M. und Gallotta A., Lateral flow assays, *Essays in biochemistry*, 2016, 60, 111. 10.1042/EBC20150012.
134. nanoComposix, Lateral Flow Test Strip Assembly. 2021. <https://nanocomposix.com/pages/lateral-flow-test-strip-assembly>, (last accessed March 2021).
135. Cao E., Chen Y. und Cui Z. et al., Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions, *Biotechnology and bioengineering*, 2003, 82, 684. 10.1002/bit.10612.
136. Delanaye P., Cavalier E. und Pottel H., Serum Creatinine: Not So Simple!, *Nephron*, 2017, 136, 302. 10.1159/000469669.
137. Hornum M. und Feldt-Rasmussen B., Glomerular Filtration Rate Estimation in Renal and Non-Renal Solid Organ Transplantation, *Nephron*, 2017, 136, 298. 10.1159/000447673.
138. Seiler L. K., Jonczyk R. und Lindner P. et al., A New Lateral Flow Assay to Detect sIL-2R during T-Cell Mediated Rejection After Kidney Transplantation, *Analyst*, eingereicht.
139. Haiss W., Thanh N. T. K. und Aveyard J. et al., Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra, *Analytical chemistry*, 2007, 79, 4215. 10.1021/ac0702084.
140. Sánchez-Rico C., Voith von Voithenberg L. und Warner L. et al., Effects of Fluorophore Attachment on Protein Conformation and Dynamics Studied by spFRET and NMR Spectroscopy, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2017, 23, 14267. 10.1002/chem.201702423.
141. Borrebaeck C. A. K. und Wingren C., High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update, *Expert review of molecular diagnostics*, 2007, 7, 673. 10.1586/14737159.7.5.673.

142. Mihlan M., Blom A. M. und Kupreishvili K. et al., Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011, 25, 4198. 10.1096/fj.11-186460.
143. Alnaas A. A., Moon C. L. und Alton M. et al., Conformational Changes in C-Reactive Protein Affect Binding to Curved Membranes in a Lipid Bilayer Model of the Apoptotic Cell Surface, *The journal of physical chemistry. B*, 2017, 121, 2631. 10.1021/acs.jpcc.6b11505.
144. Black S., Kushner I. und Samols D., C-reactive Protein, *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279, 48487. 10.1074/jbc.R400025200.
145. Heidelberger M. und Kendall F. E., A Quantitative Theory Of The Precipitin Reaction: II. A Study Of An Azoprotein-Antibody System, *The Journal of experimental medicine*, 1935, 62, 467. 10.1084/jem.62.4.467.
146. Fanali G., Di Masi A. und Trezza V. et al., Human serum albumin: from bench to bedside, *Molecular aspects of medicine*, 2012, 33, 209. 10.1016/j.mam.2011.12.002.
147. Hermanson G. T., Bioconjugate techniques. In: San Diego, Academic Press, 1996, p 593. 10.1016/B978-012342335-1/50015-4.
148. Geoghegan W. D., The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold, *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 1988, 36, 401. 10.1177/36.4.3346540.
149. Geoghegan W. D. und Ackerman G. A., Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application, *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 1977, 25, 1187. 10.1177/25.11.21217.
150. Roth J. und Binder M., Colloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques, *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 1978, 26, 163. 10.1177/26.3.632554.
151. Das T., Sen A. K. und Kempf T. et al., Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions, *The Biochemical journal*, 2003, 373, 345. 10.1042/BJ20021701.
152. Ansar W. und Ghosh S., C-reactive protein and the biology of disease, *Immunologic research*, 2013, 56, 131. 10.1007/s12026-013-8384-0.
153. Rey E. G., O'Dell D. und Mehta S. et al., Mitigating the Hook Effect in Lateral Flow Sandwich Immunoassays Using Real-Time Reaction Kinetics, *Analytical chemistry*, 2017, 89, 5095. 10.1021/acs.analchem.7b00638.
154. Hsieh H. V., Dantzler J. L. und Weigl B. H., Analytical Tools to Improve Optimization Procedures for Lateral Flow Assays, *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 2017, 7. 10.3390/diagnostics7020029.
155. Hoofnagle A. N. und Wener M. H., The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry, *Journal of immunological methods*, 2009, 347, 3. 10.1016/j.jim.2009.06.003.
156. Schiettecatte J., Anckaert E. und Smits J., Advances in Immunoassay Technology. In: Chiu, N. (ed.), InTech, 2012. 10.5772/35797.
157. Byzova N. A., Safenkova I. V. und Slutskaya E. S. et al., Less is More: A Comparison of Antibody-Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios, *Bioconjugate chemistry*, 2017, 28, 2737. 10.1021/acs.bioconjchem.7b00489.
158. Mergel Y., Entwicklung antikörperbasierter Systeme zur Detektion von sCD25. Bachelorarbeit, Hannover, 2019.
159. Fernández-Sánchez C., Gallardo-Soto A. M. und Rawson K. et al., Quantitative impedimetric immunosensor for free and total prostate specific antigen based on a lateral flow assay format, *Electrochemistry Communications*, 2004, 6, 138. 10.1016/j.elecom.2003.11.002.

160. Ahn-Yoon S., DeCory T. R. und Durst R. A., Ganglioside-liposome immunoassay for the detection of botulinum toxin, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004, 378, 68. 10.1007/s00216-003-2365-4.
161. Bogdanovic J., Koets M. und Sander I. et al., Rapid detection of fungal alpha-amylase in the work environment with a lateral flow immunoassay, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2006, 118, 1157. 10.1016/j.jaci.2006.07.004.
162. van Dam G. J., Wichers J. H. und Ferreira T. M. F. et al., Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen, *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 5458. 10.1128/JCM.42.12.5458-5461.2004.
163. Marx V., Finding the right antibody for the job, *Nature methods*, 2013, 10, 703. 10.1038/nmeth.2570.
164. Aydin S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*, 2015, 72, 4. 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
165. Kharrazian D., Herbert M. und Vojdani A., Cross-Reactivity between Chemical Antibodies Formed to Serum Proteins and Thyroid Axis Target Sites, *International journal of molecular sciences*, 2020, 21. 10.3390/ijms21197324.
166. Levey A. S., Stevens L. A. und Schmid C. H. et al., A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Annals of internal medicine*, 2009, 150, 604. 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
167. Jackson J. A., Kim E. J. und Begley B. et al., Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2011, 11, 2228. 10.1111/j.1600-6143.2011.03680.x.
168. Schaub S., Nickerson P. und Rush D. et al., Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2009, 9, 1347. 10.1111/j.1600-6143.2009.02645.x.
169. Tatapudi R. R., Muthukumar T. und Dadhania D. et al., Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine, *Kidney international*, 2004, 65, 2390. 10.1111/j.1523-1755.2004.00663.x.
170. Egelkamp J., Chichelnitskiy E. und Kühne J. F. et al., Back signaling of HLA class I molecules and T/NK cell receptor ligands in epithelial cells reflects the rejection-specific microenvironment in renal allograft biopsies, *American journal of transplantation official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2019, 19, 2692. 10.1111/ajt.15417.
171. Sudan K., Vijayan V. und Madyaningrana K. et al., TLR4 activation alters labile heme levels to regulate BACH1 and heme oxygenase-1 expression in macrophages, *Free radical biology & medicine*, 2019, 137, 131. 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.024.
172. Hauschildt C., Entwicklung eines antikörperbasierten Systems zur Detektion von CXCL9. Bachelorarbeit, Hannover, 2019.
173. Choi D. H., Lee S. K. und Oh Y. K. et al., A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I, *Biosensors & bioelectronics*, 2010, 25, 1999. 10.1016/j.bios.2010.01.019.
174. Sarma V. R., Silvertown E. W. und Davies D. R. et al., The three-dimensional structure at 6 Å resolution of a human gamma G1 immunoglobulin molecule, *The Journal of biological chemistry*, 1971, 246, 3753.
175. Safenkova I. V., Zherdev A. V. und Dzantiev B. B., Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity, *Journal of immunological methods*, 2010, 357, 17. 10.1016/j.jim.2010.03.010.
176. Harris L. J., Skaletsky E. und McPherson A., Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody, *Journal of molecular biology*, 1998, 275, 861. 10.1006/jmbi.1997.1508.
177. Sartorius, UniSart® Nitrocellulose Membranes - The Substrate of Choice for Protein Assays.
178. Verdnick D. H. und Pickett S., DNA array image analysis: Nuts & bolts. In: Kamberova, G. L., Shah, S. K. (eds.), Skippack, PA, DNA Press, 2002, p 83.

## 7 Anhang

### 7.1 Zusätzliche experimentelle Daten

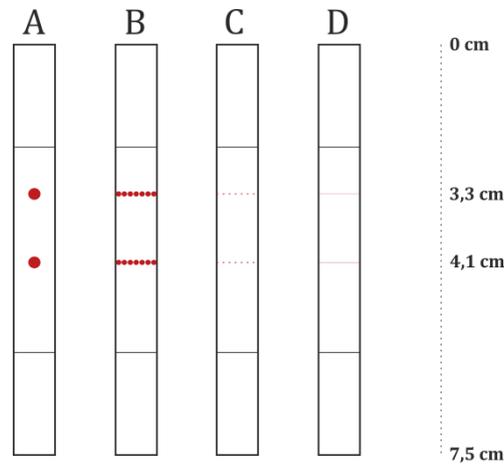


Abbildung 7-1: Spotschema der Fängerantikörper auf die Nitrozellulosemembran mit Höhenangaben. A) händisch mit der Pipette 1 Tropfen à 0,3  $\mu\text{L}$ , B) händisch mit der Pipette 5-7 Tropfen à 0,1  $\mu\text{L}$ , C) mit den Nano-Plotter gespottete Linie, D) von Fassisi beschichteter Streifen.

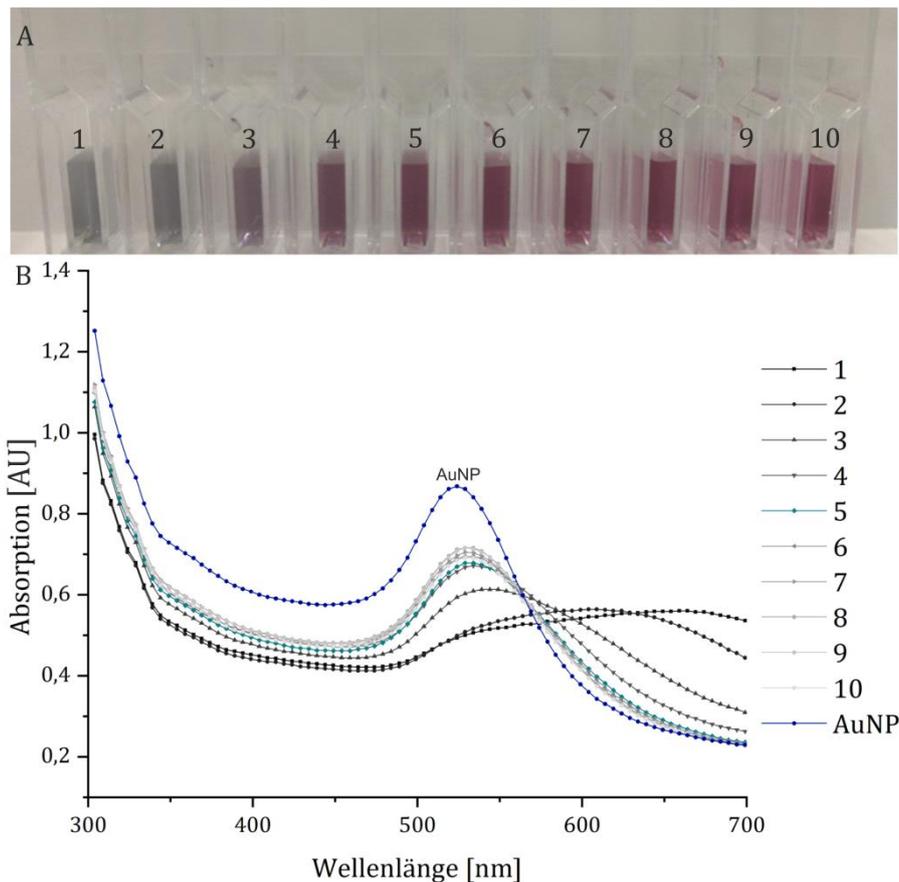


Abbildung 7-2: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit 43 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2=1,74  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 3=2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4=3,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 5=4,35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6=5,22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 7=6,09  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 8=6,96  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 9=7,83  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10=8,7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , AuNP=0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.5).

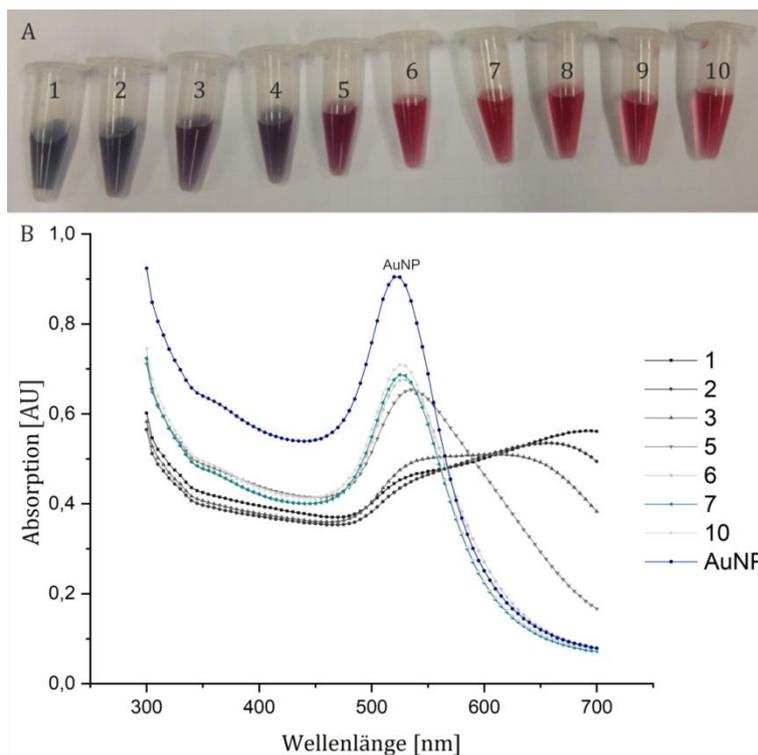


Abbildung 7-3: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit 05 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2=1,74  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 3=2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4=3,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 5=4,35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6=5,22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 7=6,09  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 8=6,96  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 9=7,83  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10=8,7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , AuNP=0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Zur besseren Übersicht sind in B) nicht alle Konjugationsansätze dargestellt. Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.7).

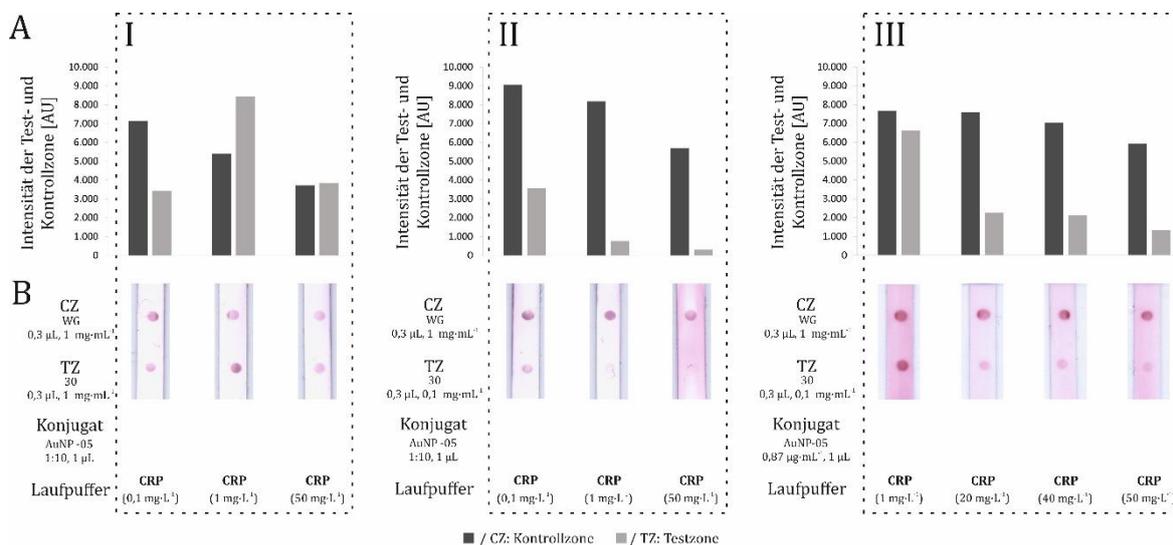
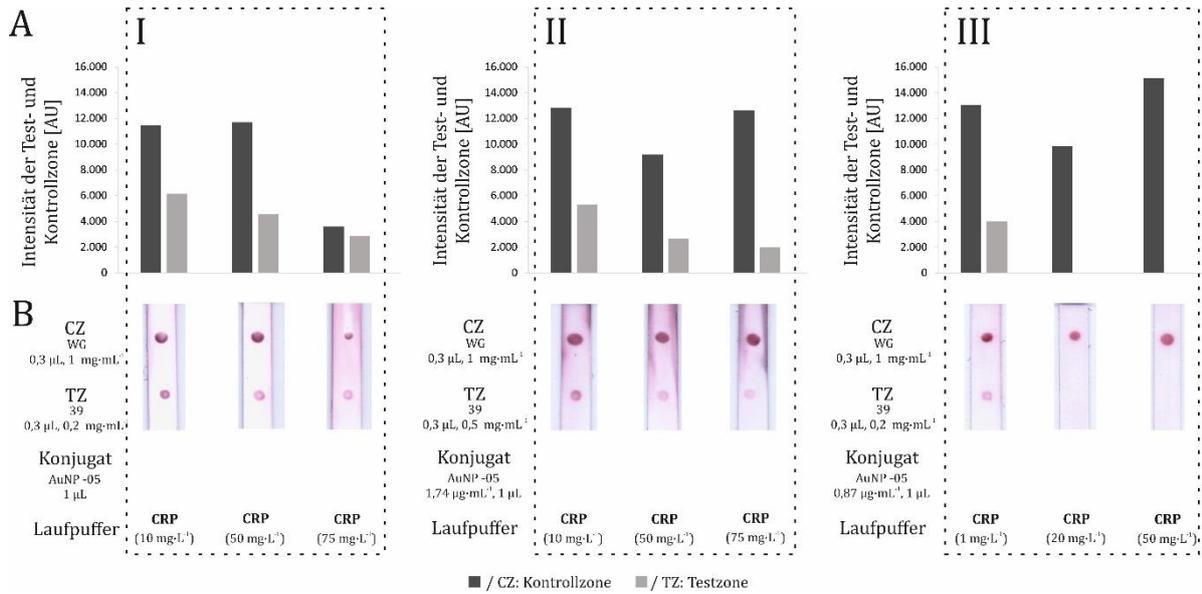
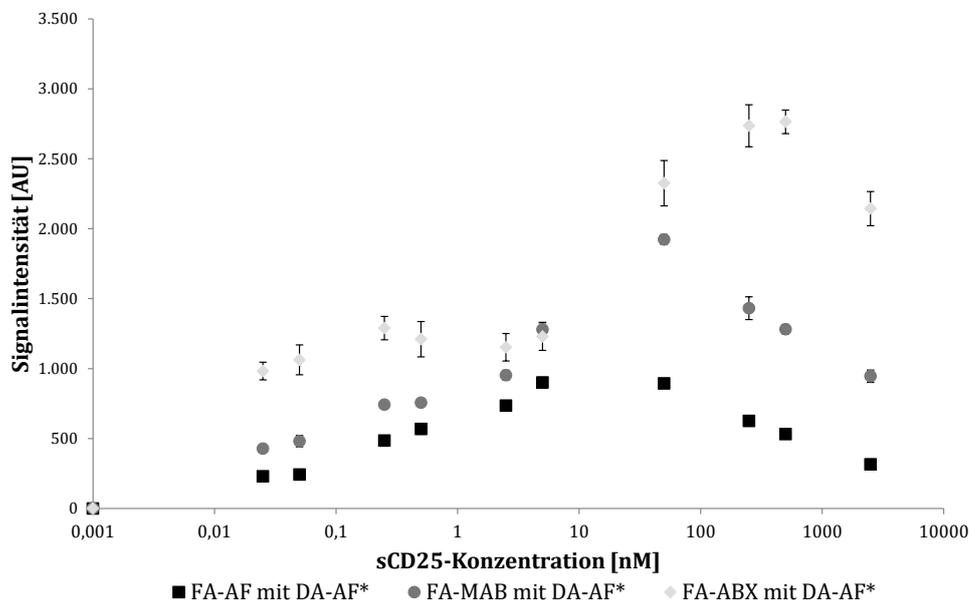


Abbildung 7-4: LFAs zur Etablierung einer Rotfärbung der Testzone bei CRP-Konzentrationen kleiner als 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mit verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer (0,1 – 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1  $\mu\text{L}$  AuNP-05 auf dem Release Pad sowie Antikörper WG als FA für DA-05 (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. I: Fängerantikörper 30 (FA-30; 0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mit verdünntem Konjugat (AuNP-05, 1  $\mu\text{L}$ , 1:10) und verdünntem Konjugat (AuNP-05, 1  $\mu\text{L}$ , 1:10). II: FA-30 (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mit verdünntem Konjugat (AuNP-05, 1  $\mu\text{L}$ , 1:10) und geringerer Konzentration des FA-30 (0,3  $\mu\text{L}$ ; 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). III: reduzierte Konzentration des FA-30 (0,3  $\mu\text{L}$ ; 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und verringerte Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1  $\mu\text{L}$ ; 0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Nr.1).



**Abbildung 7-5:** LFAs zur Etablierung einer Rotfärbung der Testzone bei CRP-Konzentrationen kleiner als 10 mg·L<sup>-1</sup> mit verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer (1 – 75 mg·L<sup>-1</sup>). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem *Release Pad* sowie Antikörper WG als FA für DA-05 (0,3 µL, 1 mg·L<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: verringerte Konzentration des Fängerantikörpers 39 (FA-39; 0,3 µL; 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>) mit AuNP-05 (1 µL). II: erhöhte Konzentration FA-39 (0,3 µL; 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verringerter Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1 µL; 1,74 µg·mL<sup>-1</sup>, Nr.2). III: verringerte Konzentration FA-30 (0,3 µL; 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verringerter Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1 µL; 0,87 µg·mL<sup>-1</sup>, Nr.1).



**Abbildung 7-6:** Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5 µM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AF, MAB und ABX; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) sowie des Detektionsantikörpers (AF\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AF\* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel<sup>158</sup>).

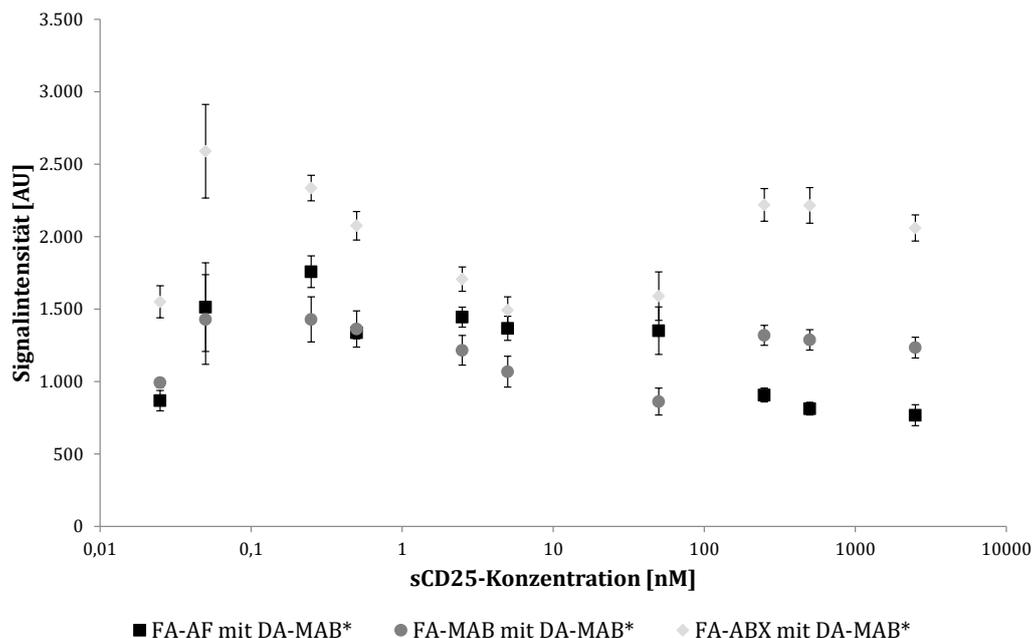


Abbildung 7-7: Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AF, MAB und ABX;  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (MAB\*,  $50 \text{ nM}$ ) im Sandwich-Format. MAB\* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>).

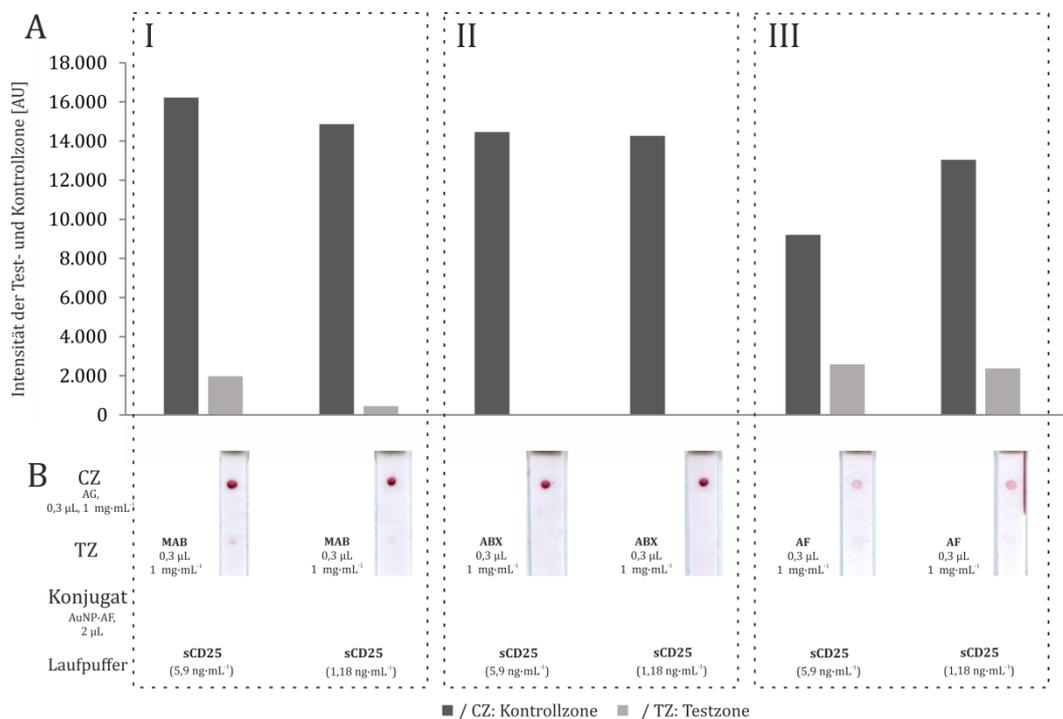
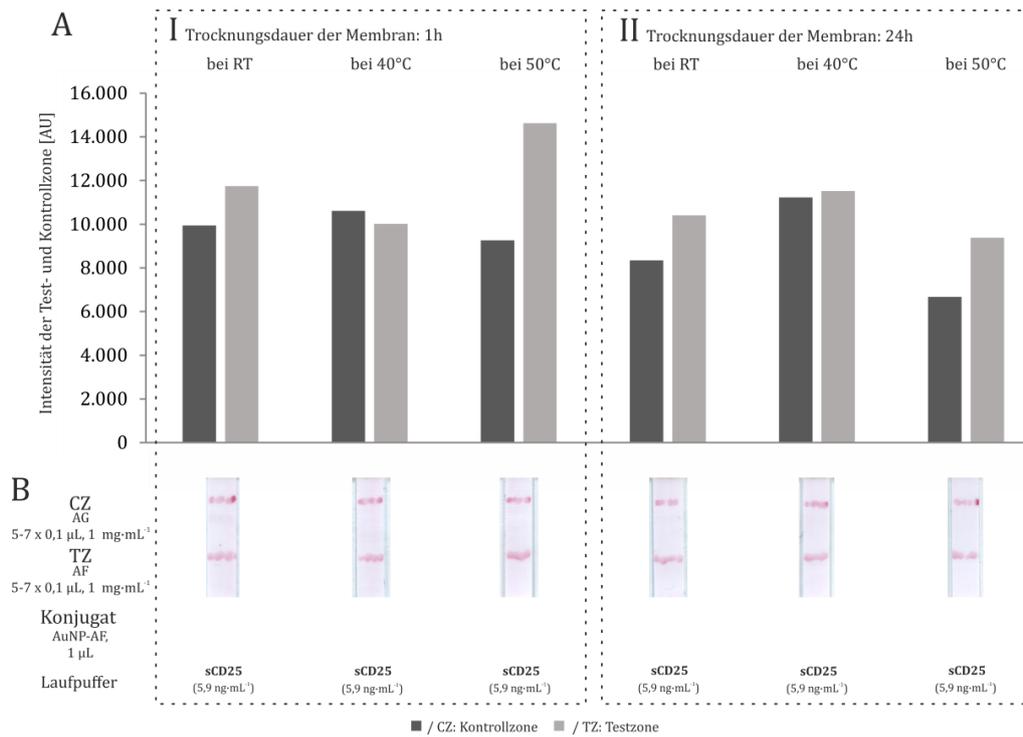
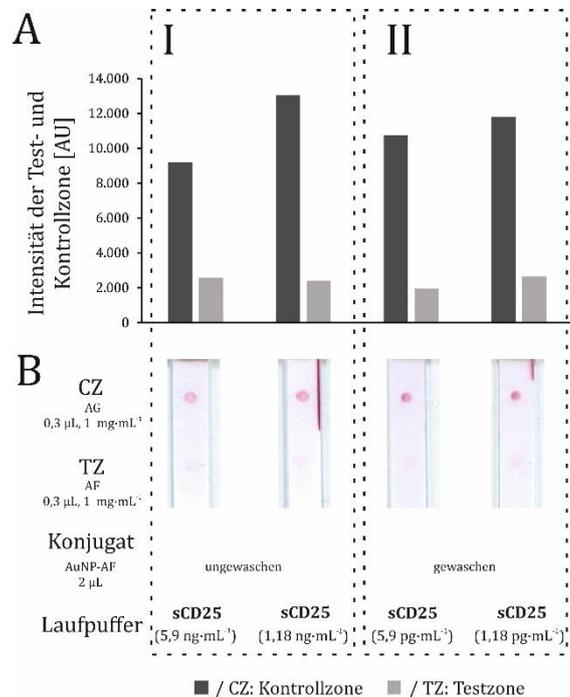


Abbildung 7-8: LFAs zu Bindungsstudien von AuNP-AF zu den Fängerantikörpern (FA) MAB, ABX und AF mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen im Laufpuffer ( $5,9$  und  $1,18 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurden  $2 \mu\text{L}$  AuNP-AF auf dem Release Pad sowie Antikörper AG als FA für DA-BAF ( $0,3 \mu\text{L}$ ,  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. I: Einsatz von FA-MAB ( $0,3 \mu\text{L}$ ;  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). II: Einsatz von FA-ABX ( $0,3 \mu\text{L}$ ;  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). III: Einsatz von FA-AF ( $0,3 \mu\text{L}$ ;  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



**Abbildung 7-9: Studie zu verschiedenen Trocknungszeiten und -methoden der Membran. Die Membranen wurden entweder bei Raumtemperatur, bei 40°C oder bei 50°C getrocknet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Für die Durchführung der LFAs wurden AF als Fängerantikörper (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·L<sup>-1</sup>), AuNP-AF (1 µL) und 5,9 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 im Laufpuffer verwendet. I: Trocknungsdauer der Membran: 1h. II: Trocknungsdauer der Membran: 24 h.**



**Abbildung 7-10: Vergleich von gewaschen und ungewaschen Konjugat (AuNP-AF, 2 µL) auf LFA-Streifen (Fängerantikörper AF; 0,3 µL; 1 mg·L<sup>-1</sup>) mit 5,9 und 1,18 ng·mL<sup>-1</sup> sCD25 im Laufpuffer. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. I: ungewaschene AuNP-AF. II: gewaschene AuNP-AF.**

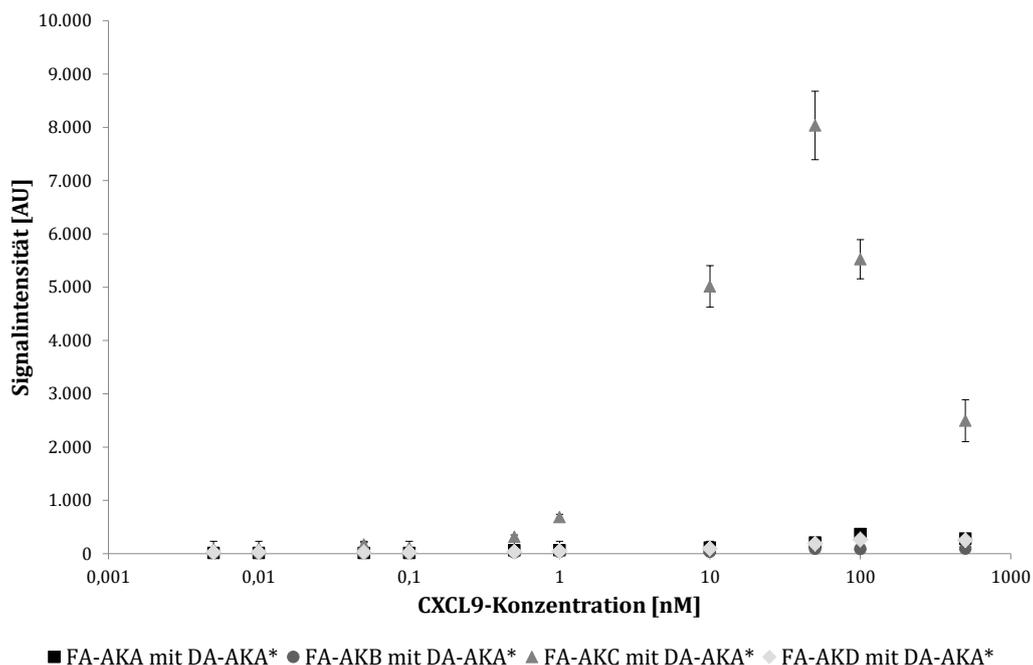


Abbildung 7-11: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 - 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD;  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKA\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKA\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>).

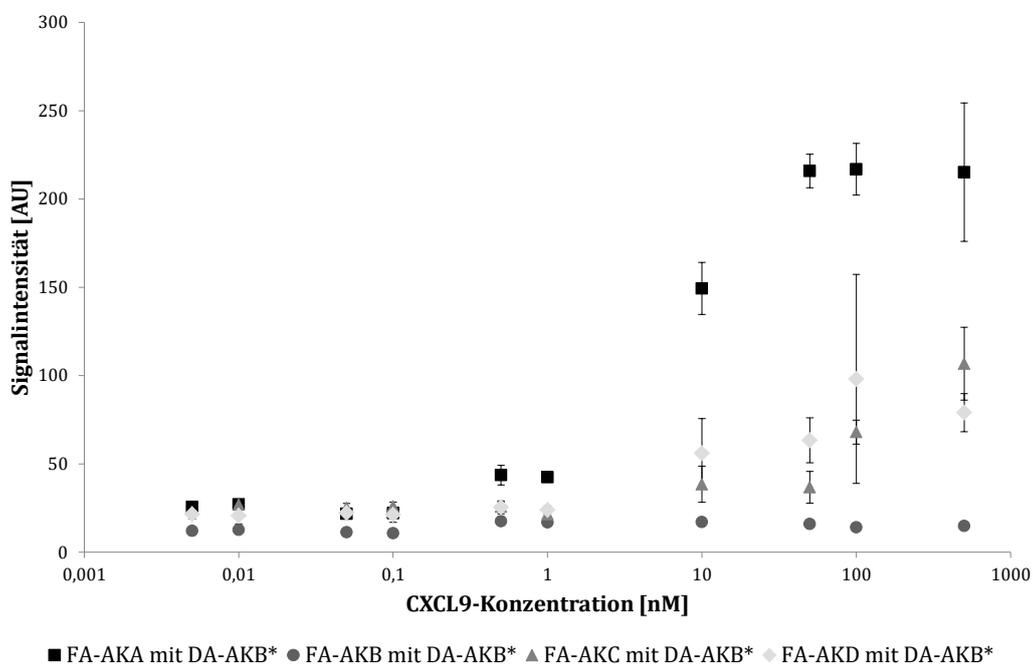


Abbildung 7-12: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 - 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD;  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKB\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKB\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>).

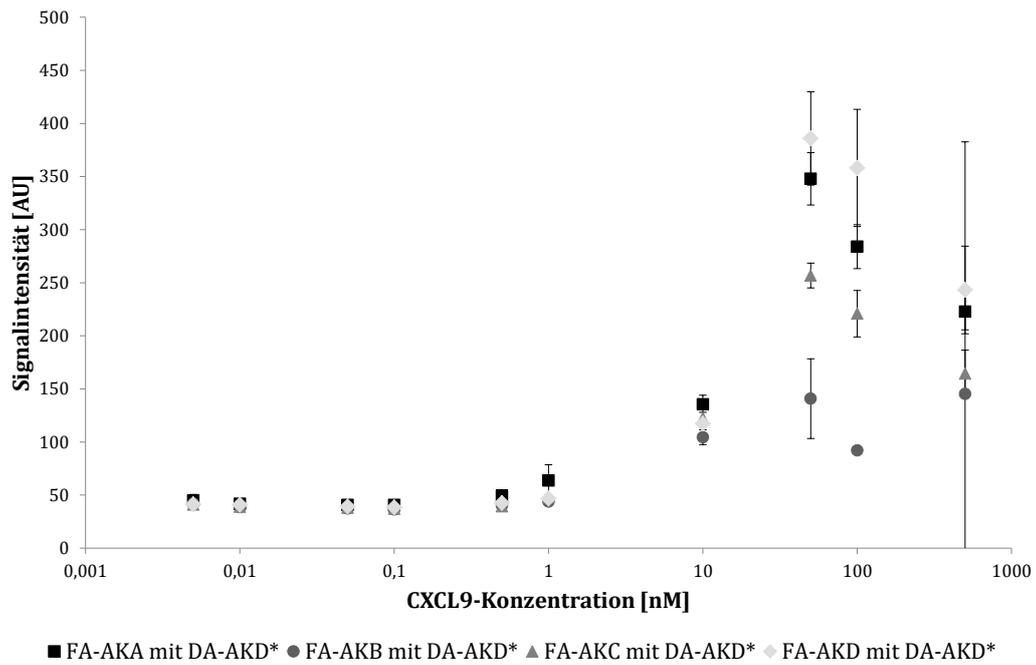
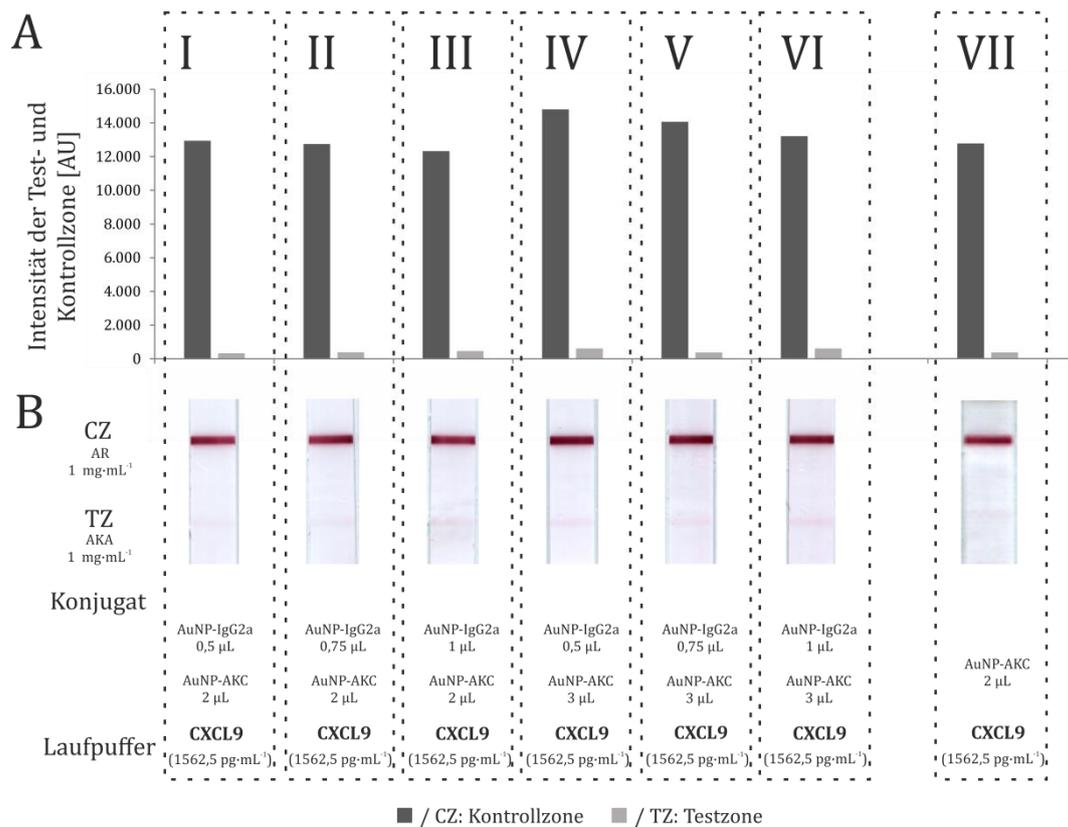
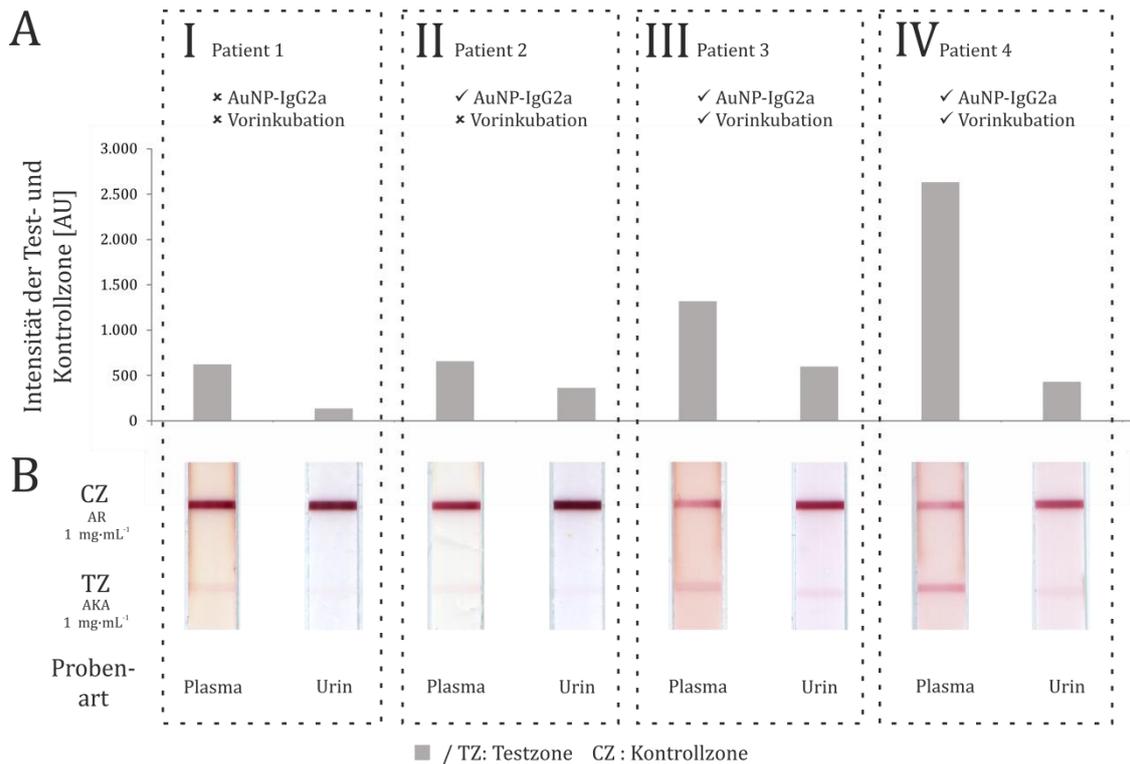


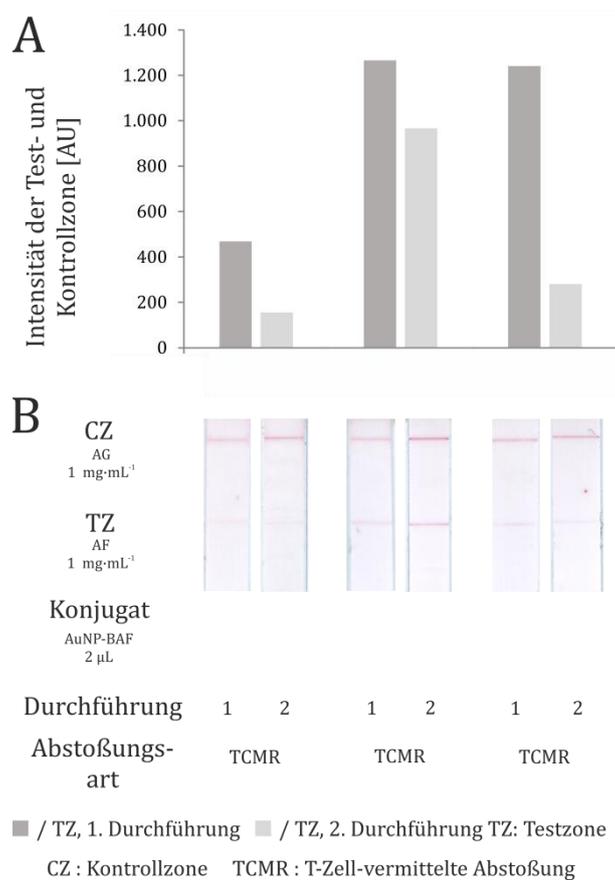
Abbildung 7-13: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 - 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD;  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKC\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKC\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>).



**Abbildung 7-14:** Ermittlung des besten Volumen-Verhältnis von AuNP-AKC zu AuNP-IgG2a zur Ausbildung der stärksten Rotfärbung in der Testzone. Für die Durchführung wurde Fängerantikörper AKA als CXCL9-FA (1 mg·L<sup>-1</sup>) auf der Testzone (TZ), Antikörper AR als AKC-FA (1 mg·L<sup>-1</sup>) auf der Kontrollzone (CZ) und 1562,5 pg·mL<sup>-1</sup> CXCL9 im Laufpuffer verwendet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: AuNP-AKC (2 µL) und AuNP-IgG2a (0,5 µL). II: AuNP-AKC (2 µL) und AuNP-IgG2a (0,75 µL). III: AuNP-AKC (2 µL) und AuNP-IgG2a (1 µL). IV: AuNP-AKC (3 µL) und AuNP-IgG2a (0,5 µL). V: AuNP-AKC (3 µL) und AuNP-IgG2a (0,75 µL). VI: AuNP-AKC (3 µL) und AuNP-IgG2a (1 µL). VII: Referenz-LFA zum Vergleich der Veränderung der Signalintensität mit AuNP-AKA (2 µL).



**Abbildung 7-15: Vergleich von unverdünnten Plasma- und Urin-Patientenproben von vier verschiedenen Patienten. LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-AKC (3 µL) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: Plasma- und Urinproben von Patient 1 als Laufpuffer. II: Plasma- und Urinproben von Patient 2 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a (1 µL). III: Plasma- und Urinproben von Patient 3 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a (1 µL) und einer Vorinkubation (15 Minuten) Laufprobe mit AuNP-AKC. IV: Plasma- und Urinproben von Patient 4 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a (1 µL) und einer Vorinkubation (15 Minuten) Laufprobe mit AuNP-AKC.**



**Abbildung 7-16: Vergleich von jeweils zwei sCD25-LFAs unter gleichen Bedingungen, die an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Material-Chargen durchgeführt wurden. LFAs wurden mit Antikörper AF als CXCL9-FA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Testzone (TZ), Antikörper AG als FA für DA-BAF (1 mg·mL<sup>-1</sup>) auf der Kontrollzone, AuNP-BAF (2 µL) und drei Urin-Patientenproben mit Laufpuffer verdünnt (1:2) verwendet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (dunkelgrau, LFA1 und hellgrau, LFA2) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe.**

Tabelle 7-1: Verschiedene Nitrozellulosemembranen von Sartorius (UniSart®) mit ihren Eigenschaften.<sup>128,177</sup>

|                                 | <b>95<br/>mit backing</b> | <b>140<br/>ohne backing</b> | <b>140<br/>mit backing</b> | <b>180<br/>mit backing</b> |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Wicking rate [sec/40 mm]</b> | 65-115                    | 90-150                      | 95-155                     | 135-175                    |
| <b>Stärke [µm]</b>              | 240-270                   | 120-160                     | 225-255                    | 225-255                    |
| <b>Time-to-Signal [sec]</b>     | 60-90                     | 90-120                      | 90-120                     | n.a.                       |
| <b>Sensitivität</b>             | Hoch                      | Höher                       | Höher                      | Sehr hoch                  |
| <b>Viskose Proben</b>           | Sehr gut                  | gut                         | gut                        | mittel                     |

Tabelle 7-2: Eigenschaften der Urin-Patientenproben, die für die LFA-Durchführungen verwendet wurden, nach Abstoßungsart sortiert. CyA\*: Standard-Triple-Therapie bestehend aus Cyclosporin, Mycophenolat und Steroiden; Tac\*:Standard-Triple-Therapie bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolat und Steroiden; mTOR\*: Standard-Triple-Therapie bestehend aus mTOR-Inhibitor, Mycophenolat und Steroiden.

|                                       | <b>Normal</b>   | <b>TCMR</b>  | <b>Borderline</b>  | <b>AMR/TCMR,<br/>AMR/Borderline</b> |
|---------------------------------------|---|--|--------------------|-------------------------------------|
| <b>Weiblich</b>                       | 7/13  | 14/35  | 2/3                | 1/2                                 |
| <b>aus 2<sup>nd</sup> Kohorte</b>     | 3/13  | 4/35   | 2/3                | 2/2                                 |
| <b>aus 3<sup>rd</sup> Kohorte</b>     | 10/13   | 31/35  | 1/3                | 0/2                                 |
| <b>Alter [Jahre]</b>                  | 54,9 ± 14,4   | 51,1 ± 13,9  | 16,3 ± 16,3        | 12,5 ± 0,7                          |
| <b>Alter des Transplants [Monate]</b> | 33,9 ± 64,8   | 22,6 ± 54,2  | 14,2 ± 14,2        | 34,4 ± 10,3                         |
| <b>Primary non function</b>           | 2/13  | 7/35   | 0/3                | 1/2                                 |
| <b>Immunosuppressive drug regimen</b> | 1 CyA*,<br>10 Tac*,<br>1 mTOR*<br>1 Tac/mTOR/<br>Steroide | 16 CyA*,<br>13 Tac*,<br>2 mTOR*<br>2 Mycophenolate und<br>Steroide<br>1 Tac/mTOR<br>1 CyA dual | 1 CyA*,<br>2 mTOR* | 2 mTOR*                             |
| <b>Lebendspende</b>                   | 4/13  | 8/35   | 2/3                | 0/2                                 |
| <b>Vorherige Abstoßung</b>            | 7/13  | 13/35  | 1/3                | 1/2                                 |
| <b>Re-graft</b>                       | 2/13  | 4/35   | 0/3                | 0/2                                 |
| <b>eGFR [mL·min<sup>-1</sup>]</b>     | 37 ± 15,9   | 39,1 ± 14,9  | 57,9 ± 13,1        | 88,6 ± 46,2                         |

## 7.2 Material

Verwendetes Doppel-deionisiertes Wasser stammt aus dem Reinstwassersystem arium ® 611 und wird im folgenden ddH<sub>2</sub>O abgekürzt. Die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

### 7.2.1 Geräte und Materialien

Tabelle 7-3: Verwendete Geräte und Materialien.

| Gerät   | Hersteller                                    |
|---|---|
| Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer                             | BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA        |
| Feinwaage   | Phoenix Instruments                           |
| Field Emission Scanning Electron Microscope (JSM-6700F)           | JEOL LTD., Tokyo, Japan                       |
| GenePix 4000B Microarray-Scanner                                  | Molecular Devices, Kalifornien, USA           |
| Guillotine Dahle 562  | Novus Dahle GmbH&Co. KG, Lingen, DE           |
| Glaskammer  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE        |
| microplate BRANDplates, pureGrade                                 | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE              |
| Nexterion 16-wells  | Schott AG, Mainz, DE                          |
| Nanodrop-ND 1000  | peqLab Biotechnologie GmbH                    |
| Nano-Plotter™ NP 2.1  | GeSim Bioinstruments                          |
| NanoSight LM 10   | Malvern Panalytical                           |
| Orbital Shaker  | neoLab Dos-20S                                |
| pH-meter  | Metrohm, Filderstadt, DE                      |
| Pipetten (0,1-1 µL, 0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) | Eppendorf AG, Hamburg, DE                     |
| Scanner für LFAs  | Epson Perfection V370 Photo                   |
| Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise                           | Tecan, Männedorf, Schweiz                     |
| Tischzentrifuge   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE                 |
| Ultraschallbad Sonorex Super R4 510 H                             | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE |
| Vortexmischer   | VWR, Pennsylvania, USA                        |
| Zentrifuge  |   |
| - MicroStar 17R   | VWR International GmbH, Darmstadt, DE         |
| - Mini-Zentrifuge   | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE         |

## 7.2.2 Software

Tabelle 7-4: Verwendete Software.

| Anwendung           | Software   | Hersteller                                  |
|---------------------|--|---|
| Bildverarbeitung    | CorelDRAW  | CorelDRAW®, Ottawa, Kanada                  |
| Bildverarbeitung    | ImageJ   |   |
| Datenanalyse        | MS Excel   | Microsoft Corporation, Redmond, USA         |
| Datenanalyse        | MS Excel XLSTAT 2020   | Addinsoft Inc, New York, USA                |
| Datenverarbeitung   | GenePix Pro 7  | Axon Instruments, CA, USA                   |
| Literaturverwaltung | Citavi 6   | Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH |
| Nano-Plotter NP 2.1 | NPC16-Software 2.15.46   | Gesim, Großberkmannsdorf                    |
| Datenanalyse        | NanoSight Nanoparticle Tracking Analysis, Version 2.3 Build 0033 | Malvern Panalytical                         |

## 7.2.3 Verwendete Chemikalien und Kits

Tabelle 7-5: Verwendete Chemikalien.

| Chemikalie                                | Hersteller                             |
|---|--|
| Chlorwasserstoff                          | Sigma-Aldrich GmbH, München, DE        |
| Cy <sup>TM</sup> 5 Mono-Reactive Dye Pack | GE Healthcare, Buckinghamshire, UK     |
| Calciumchlorid                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| Calciumdihydrogenphosphat                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| Dinatriumhydrogenphosphat                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| Kalibrierlösungen (pH-Meter)              | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE          |
| Natriumtetraborat                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| Natriumchlorid                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| Natriumhydroxid                           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE |
| 3,3',5,5'-Trimethylbenzidin               | Kem-En-Tec, Taastrup, Dänemark         |
| Trehalose                                 | Fluka BioChemika, Steinheim, DE        |
| Tris                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE          |
| Tween20                                   | PanReac AppliChem, Darmstadt, DE       |

Tabelle 7-6: Verwendete Kits.

| Kit   | Zweck  | Hersteller                                |
|---|--|---|
| Human CXCL9/MIG DuoSet ELISA (Cy392-05)                               | Konzentrationsbestimmung von CXCL9                         | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA       |
| Human Interleukin 2 Receptor, ELISA Kit (DEIA171)                     | Konzentrationsbestimmung von sCD25                         | Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, DE |
| Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation (Amine Reactive) | Fluoreszenzmarkierung der Proteine für Microarray-Versuche | NanoTemper, München, DE                   |

#### 7.2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7-7: Verwendete Puffer und Lösungen.

| Puffer  | Menge/Konzentration            | Zusammensetzung  |
|---|--------------------------------|--|
| Boraxpuffer                                     | 2 mM                           | Borax  |
| Bovines Serumalbumin-Lösung                     | 10%                            | Bovines Serumalbumin   |
| Natriumchlorid-Lösung                           | 10%                            | Natriumchlorid   |
| PBS-Puffer, 10x (1 L)                           | 80 g<br>2 g<br>14,4 g<br>2,4 g | Natriumchlorid<br>Kaliumchlorid<br>Dinatriumhydrogenphosphat<br>Kaliumhydrogenphosphat |
| PBST  | 0,05%<br>1x                    | Tween 20<br>PBS  |
| Saure Stopplösung (ELISA)                       | 60 mL<br>20 mL<br>120 mL       | Wasser<br>HCl (10 M)<br>Schwefelsäure (5 M)  |
| Lösung für Vorbehandlung des <i>Release Pad</i> | 1%<br>0,05%<br>100 mM          | BSA<br>Tween 20<br>Tris Buffer (pH 8,0)  |

## 7.2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7-8: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterial   | Hersteller                              |
|--|---|
| Absorbent Pad, Grade 222   | Ahlstrom-Munsjö, Helsinki, Finnland     |
| Conjugate Pad, Grade 6615  | Ahlstrom-Munsjö, Helsinki, Finnland     |
| Falcon Tubes 15 mL   | Sarstedt, Nümbrecht, DE                 |
| Falcon Tubes 50 mL   | Sarstedt, Nümbrecht, DE                 |
| Goldnanopartikel   | Fassisi GmbH, Göttingen, DE             |
| Mikrotiterplatten BRANDplates® pureGrade™  | BRAND GMBH+ CO KG, Wertheim, DE         |
| 96 Fast PCR-Platte Vollrand  | SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE     |
| Mikrotiterplatten (DY990)  | R&D Systems, Minneapolis, USA           |
| Mikrotiterplatten (MaxiSorp Nunc)  | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA |
| Nitrozellulosemembran Unisart ® <ul style="list-style-type: none"> <li>- 180 mit <i>backing</i></li> <li>- 140 mit <i>backing</i></li> <li>- 140 ohne <i>backing</i></li> <li>- 95 mit <i>backing</i></li> </ul> | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Reaktionsgefäß (0,5; 1,5 2 und 5 mL)   | Eppendorf                               |
| Sartorius Unisart ® 3D Microarray Slide  | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Sterilfilter für Spritzen: Minisart High-Flow, Single use syringe filter (0,2 µm)  | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Vivaspin™ 500 Zentrifugalkonzentratoren (10-30 kDA MWCO)   | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |

## 7.2.6 Antikörper und andere Proteine

Tabelle 7-9: Verwendete Antikörper und andere Proteine.

| Protein                                | Hersteller                              |
|--|---|
| Biotin Anti-LC-kappa (human) Conjugate | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA |
| Bovines Serumalbumin                   | Sigma-Aldrich GmbH, München, DE         |
| C-reaktives Protein                    | BioRad, Hercules, USA                   |
| CXCL9                                  | Acris Antibodies GmbH, Herford, DE      |

|  |   |
|--|---|
| CXCL9 Monoclonal Antibody (49106)                      | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA                                     |
| Esel anti-Ratte IgG                                    | Dianova, Hamburg, DE  |
| Fötales Kälberserum                                    | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA                                     |
| Goat anti-mouse Antibody (W41502G)                     | Meridian Life Science, Tennessee, USA                                       |
| Human CD25/IL-2 R alpha Antibody (AF-233-NA)           | R&D Systems, Minneapolis, USA   |
| Human CD25/IL-2 R alpha Antibody (MAB623-100)          | R&D Systems, Minneapolis, USA   |
| Human CD25/IL-2 R alpha Biotinylated Antibody (BAF233) | R&D Systems, Minneapolis, USA   |
| Humanes Serumalbumin                                   | Sigma-Aldrich GmbH, München, DE   |
| Interleukin 2 Receptor Alpha Antibody (abx015891)      | Abxexa, Cambridge, UK   |
| Maus anti-CXCL9 (26B12)                                | Monoclonal Antibody Core Facility<br>Helmholtz Zentrum München, München, DE |
| Mab to CRP (M01243M)                                   | Meridian Life Science, Tennessee, USA                                       |
| Mab to CRP (M86005M)                                   | Meridian Life Science, Tennessee, USA                                       |
| Mab to CRP (M01239M)                                   | Meridian Life Science, Tennessee, USA                                       |
| Mab to CRP (M01330M)                                   | Meridian Life Science, Tennessee, USA                                       |
| Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG              | Jackson ImmunoResearch, Ely, UK   |
| Rabbit anti-goat Secondary Antibody (31105)            | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA                                     |
| Rabbit anti-rat Secondary Antibody (31218)             | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA                                     |
| Ratte anti-CXCL9 (15A5)                                | Monoclonal Antibody Core Facility<br>Helmholtz Zentrum München, München, DE |
| Ratte anti-CXCL9 (17C5)                                | Monoclonal Antibody Core Facility<br>Helmholtz Zentrum München, München, DE |
| sCD25  | Abxexa Ltd, Cambridge, UK   |
| Streptavidin-HRP Conjugate                             | Invitrogen, Kalifornien, USA  |
| Streptavidin-HRP Conjugate                             | MyBiosource, Kalifornien, USA   |

## 7.3 Methoden

### 7.3.1 Bestimmung der Goldnanopartikelgröße und -konzentration

Die Bestimmung der Goldnanopartikel (AuNP)- Größe wurde mittels Rasterelektronenmikroskop (REM), UV-Vis-Spektroskopie und Nanoparticle Tracking Analysis durchgeführt.

#### 7.3.1.1 Rasterelektronenmikroskop

Für die Charakterisierung der AuNPs mittels REM wurden 100  $\mu\text{L}$  AuNP-Lösung zunächst in einem Ultraschallbad behandelt und anschließend auf einen Graphitblock gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden Aufnahmen der Probe mittels JEOL JSM-6700F (Feldemissions-REM, Institut für Physikalische Chemie, AG Caro/Feldhoff) mit einer Beschleunigungsspannung von 2,0 kV von Alahmad Abdalrahim erhalten. Die Größe der einzelnen AuNP wurde anschließend mit CorelDraw (Tool: parallele Bemaßung) ausgewertet. Dazu wurden die Durchmesser der Goldnanopartikel auf mehreren REM-Bildern mittels CorelDraw vermessen und über die auf den Bildern angegebene Skala auf ihre Größe umgerechnet.

#### 7.3.1.2 UV-Vis Spektroskopie

Zur Bestimmung der AuNP-Größe mittels UV-Vis-Spektroskopie wurden 150  $\mu\text{L}$  Gold-Lösung (2:3 mit Borax-Puffer) in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und im Mikroplatten-Spektralphotometer (Epoch) vermessen (Spektrum: 300-750 nm, 3-fach Bestimmung). Anschließend wurde nach Haiss et al.<sup>139</sup> das Verhältnis vom Absorptionsmaximum ( $A_{\text{Spr}}$ ) zur Absorption des lokalen Minimums bei 450 ( $A_{450}$ ) berechnet und anhand der Tabelle 7-10 der Durchmesser eines Goldnanopartikel abgelesen.

**Tabelle 7-10: Verhältnis des Absorptionsmaximums ( $A_{\text{Spr}}$ ) zum lokalen Minimum bei 460 ( $A_{450}$ ) in Abhängigkeit zum Durchmesser (d) eines Goldnanopartikels (aus Haiss et al.<sup>139</sup>).**

| $A_{\text{Spr}}/A_{450}$ | d [nm] | $A_{\text{Spr}}/A_{450}$ | d [nm] | $A_{\text{Spr}}/A_{450}$ | d [nm] |
|--------------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1,10                     | 3      | 1,56                     | 12     | 1,96                     | 40     |
| 1,19                     | 4      | 1,61                     | 14     | 2,00                     | 45     |
| 1,27                     | 5      | 1,65                     | 16     | 2,03                     | 50     |
| 1,33                     | 6      | 1,69                     | 18     | 2,07                     | 55     |
| 1,38                     | 7      | 1,73                     | 20     | 2,10                     | 60     |
| 1,42                     | 8      | 1,80                     | 25     | 2,12                     | 65     |
| 1,46                     | 9      | 1,86                     | 30     | 2,15                     | 70     |
| 1,50                     | 10     | 1,92                     | 35     | 2,17                     | 75     |

### 7.3.1.3 Nanoparticle Tracking Analysis

Für die Bestimmung der AuNP-Konzentration wurde die Lösung mit den AuNP 50-fach verdünnt und über 90 Sekunden mittels Nanoparticle Tracking Analysis (Nanoparticle Analysis System, Firefly Camera, NanoSight, Modul LM10) analysiert. Das Ergebnis wurde mit NanoSight Nanoparticle Tracking Analysis, Version 2.3 Build 0033 ausgewertet.

### 7.3.2 Validierung der Hybridomaüberstände mittels ELISA

Für die Validierung der Affinität der Antikörper aus Ratte und Mäusen wurden zwei verschiedene ELISA-Konstrukte verwendet. Zur Überprüfung der Affinität der Antikörper wurde CXCL9, das in Makrophagen produziert wurde, von Christoph Nikolin (Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering, MHH) bereitgestellt.

#### 7.3.2.1 Untersuchung der Antikörper aus den Ratten-Hybridomaüberständen

##### *Fähigkeit als Fängerantikörper*

Zur Untersuchung der Antikörper in ihren Hybridoma-Überstände auf ihre Fähigkeit als Fängerantikörper wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit fötalem Kälberserum (50  $\mu\text{L}$ , 10% in PBS, 60 min) beschichtet und anschließend über Nacht mit einem Antikörper, der gegen den zu untersuchenden Antikörper gerichtet ist (Esel anti-Ratte IgG, Dianova), inkubiert. Der zu untersuchende Hybridoma-Überstand (unverdünnt, 100  $\mu\text{L}$ ) wird für am nächsten Tag für 1 h in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Die Inkubation mit CXCL9 erfolgte für 1h (100  $\mu\text{L}$ , 35  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Als nächstes wurde ein Antikörper, der gegen CXCL9 gerichtet ist (aus KIT: Human CXCL9/MIG DuoSet ELSIA (Cy392-05, R&D Systems), für 1 h in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  eines biotinylierten Antikörpers (Biotin Anti-LC-kappa Conjugate, Thermo Fisher) dazugegeben und für 30 min inkubiert, für weitere 30 min wurden 100  $\mu\text{L}$  Peroxidase mit Streptavidin dazugegeben. Vor jeder Zugabe eines Reaktanten wurde der vorherige entfernt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen. Für die Signalgebund wurde 3,3',5,5'-Trimethylbenzidin (5 min, 50  $\mu\text{L}$ ) eingesetzt und Schwefelsäure (1 M, 100  $\mu\text{L}$ ) zum Abstoppen der Reaktion verwendet. Die Absorption in den einzelnen Vertiefungen der Platte wurde bei 450 nm im Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise gemessen. Die Inkubationszeiten haben bei Raumtemperatur auf einem Schüttler stattgefunden

Zur Überprüfung der Affinität der (aufgereinigten) Antikörper wurde der gerade beschriebene Versuchsaufbau verwendet, wobei das CXCL9 in verschiedenen Konzentrationen (19 bzw. 35  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) eingesetzt wurde.

#### *Fähigkeit als Detektionsantikörper*

Zur Untersuchung der Antikörper in den Hybridomaüberständen aus den Ratten auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit fötalem Kälberserum (50 µL, 10% in PBA, 60 min) beschichtet und anschließend mit einem Antikörper gegen CXCL9 (aus KIT: Human CXCL9MIG DuoSet ELISA (Cy392-05), R&D Systems) inkubiert. Als Antigen wurde CXCL9 für 1h (100 µL, 35 ng·mL<sup>-1</sup>) inkubiert. Anschließend wurden die Hybridomaüberstände in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben (100 µL, 1h, unverdünnt). Schließlich wurde ein Esel anti-Ratte Antikörper (Dianova, 100 µL, 1h) in die Vertiefungen gegeben. Vor jeder Zugabe eines Reaktanten wurde der vorherige entfernt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen. Für die Signalgebung wurde 3,3',5,5'-Trimethylbenzidin (5 min, 50 µL) eingesetzt und Schwefelsäure (1 M, 100 µL) zum Abstoppen der Reaktion verwendet. Die Absorption in den einzelnen Vertiefungen der Platte wurde bei 450 nm im Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise gemessen. Die Inkubationszeiten haben bei Raumtemperatur auf einem Schüttler stattgefunden

#### **7.3.2.2 Untersuchung der Antikörper aus den Maus-Hybridomaüberständen**

##### *Fähigkeit als Detektionsantikörper*

Zur Untersuchung der Antikörper in den Hybridomaüberständen aus Mäusen auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper wurde der gleiche Versuchsaufbau wie bei den Untersuchungen der Ratten-Antikörper verwendet. Als Fängerantikörper wurde der aufgereinigte Antikörper AKA aus der Ratte verwendet. Die Antikörperüberstände aus der Maus wurden mit einem Biotin-markiertem Anti-kappa-LC-Antikörper (Biotin Anti-LC-kappa Conjugate, ThermoFischer) gebunden. Vor jeder Zugabe eines Reaktanten wurde der vorherige entfernt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen. Für die Signalgebung wurde 3,3',5,5'-Trimethylbenzidin (5 min, 50 µL) eingesetzt und Schwefelsäure (1 M, 100 µL) zum Abstoppen der Reaktion verwendet. Die Absorption in den einzelnen Vertiefungen der Platte wurde bei 450 nm im Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise gemessen. Die Inkubationszeiten haben bei Raumtemperatur auf einem Schüttler stattgefunden.

#### **7.3.3 Bestimmung der sCD25- und CXCL9-Konzentrationen in Patientenproben mittels ELISA**

Für die Bestimmung der sCD25-Konzentration in Patientenproben mittels ELISA wurde das Kit ‚Human Interleukin 2 Receptor‘ von Hölzel Diagnostika verwendet und gemäß dem angegebenen ELISA-Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und unverdünnt eingesetzt.

Für die Bestimmung der CXCL9-Konzentrationen in Patientenproben mittels ELISA wurde das Kit ‚Human CXCL9/MIG DuoSet ELISA‘ von R&D Systems verwendet und gemäß dem angegebenen

ELISA-Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und unverdünnt eingesetzt. Es wurden Mikrotiterplatten (MaxiSorp Nunc) von Thermo Fisher Scientific verwendet. Als Substratlösung wurde TMB ONE™ von Kem-En-Tec Diagnostics eingesetzt. Die Zusammensetzung der Stop-Lösung ist in Tabelle 7-7 angegeben.

Die sCD25/CXCL9-Konzentrationen der eingesetzten Patientenproben wurden anschließend über eine Kalibriergerade in Excel ausgerechnet.

#### **7.3.4 Untersuchung der Bindungseigenschaften der Antikörper mittels Microarray**

Zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten der Antikörper gegen das jeweilige spezifische Antigen wurde das Microarray-Format gewählt. Dazu wurden sowohl Versuche im Forward-als auch im Sandwich-Format durchgeführt. Für die Signalgebung wurden die Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dafür wurden Cyanin5 (Cy5) sowie das Monolith Protein Labelling Kit RED-NHS 2nd Generation (GE Healthcare) verwendet.

##### **7.3.4.1 Fluoreszenzmarkierung**

###### *Fluoreszenzmarkierung mittels Cy5 Mono-Reactive Dye*

Farbstoff (Cy5 Mono-Reactive Dye, GE Healthcare) und zu fluoreszenzmarkierendes Protein wurden inkubiert (1 h, unter Lichtausschluss, RT) und anschließend wurde überschüssiger Farbstoff abgetrennt (MWCO: 10-30 kDA, 10.000xg, 3-10 min, 5°C). Für die Waschschritte wurden 500 µL auf den Zentrifugenfilter gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Die Waschschritte wurden 18-23 wiederholt, bis der Durchlauf keine Blaufärbung mehr aufzeigte. Die Proteinkonzentration wurde anschließend am NanoDrop ND-100 (PEQLAB) vermessen.

###### *Fluoreszenzmarkierung mittels Monolith Protein Labeling Kit*

Aufgrund von Komplikationen bei der Färbung einiger Proteine mittels Cy5 Mono-Reactive Dye wurde das Monolith Protein Labelling Kit RED-NHS2nd Generation (Nanotemper) bei der Fluoreszenzmarkierung der Proteine in Kapitel 4.4.3 verwendet. Dazu wurde wie vom Hersteller angegeben der Farbstoff gelöst (30 µL DMSO, 100%) und mittels Labelling Puffer auf die 3-fache Konzentration des zu markierenden Proteins verdünnt (Farbstoffkonzentration: 470 µM) und zusammen für 30 min (1:1, RT) unter Lichtausschluss inkubiert. Mittels Durchlaufsäule wurde überschüssiges Protein entfernt. Dazu wurde das Eluat in 100 µL-Fractionen aufgefangen und am NanoDrop ND-100 (PEQLAB) die enthaltenen Proteinkonzentrationen vermessen.

#### **7.3.4.2 Immobilisierung der Antikörper auf 3D-Nitrozellulose Objektträgern mittels Nano-Plotter**

Die Antikörper ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in PBS) wurden mittels Nano-Plotter 2.1 (GeSim) für die Microarray-Versuche auf Microarray Slide (Sartorius Unisart ® 3D Microarray Slide) immobilisiert. Dabei wurden die verschiedenen Antikörper vertikal und die dazugehörigen Replikate (8-9 Replikate, 6-8 Tropfen pro Replikat) horizontal untereinander aufgetragen (Abbildung 4-4). Der Slide wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die anschließende Weiterbehandlung des Slide folgte immer dem gleichen Grundprinzip, wobei je nach Versuch der Inkubationsschritt (unterstrichen) angepasst wurde. Die Anpassungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

#### **Versuchsdurchführung**

##### **Auftragung der Fängerantikörper mittels Nano-Plotter**

- Trocknen, über Nacht, RT

##### **Blocken**

- 1 h (50 mL, 1% BSA in PBS)

##### **Waschen**

- 3 x 5 min mit PBST in Inkubationskammer (150  $\mu\text{L}$ , 0,05% Tween 20 in PBS, Schüttler, 30-50 RPM)
- Einspannen des Microarray-Slides in Inkubationskammer

##### **Inkubation**

- 100  $\mu\text{L}$  Lösung pro Vertiefung
- Schüttler (50-80 RPM, unter Lichtausschluss)
- Abdeckung durch Klebefolie zum Schutz vor Evaporation

##### **Waschen**

- 3 x 5 min mit PBST in Inkubationskammer (150  $\mu\text{L}$ , 0,05% Tween 20 in PBS, Schüttler, 30-50 RPM)
- 3 x 10 min mit PBST in großer Schale (0,05% Tween 20 in PBS, Schüttler, 30-50 RPM)

##### **Trocknen**

- Unter Verwendung von Druckluft

##### **Scannen**

- Mittels GenePix 4000B (Axon)
- Auswertung mittels Gene Pix Pro 7

### *Forward-Microarray*

Für die Microarrays im Forward-Format wurden die Antigene fluoreszenzmarkiert und je nach Versuch wie im Folgenden beschrieben vorgegangen.

#### *Einfluss verschiedener Antigen-Konzentrationen*

Bei einem Forward-Microarray zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Antigen-Konzentrationen wurden die immobilisierten Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen des markierten Antigens inkubiert (100 µL; CRP: 0-1000 nM, 16 h, sCD25: 0-1000 nM, 1h; CXCL9: 0-250 nM, 1 h). Zusätzlich wurden zur Beurteilung der Antikörperspezifität die immobilisierten Antikörper mit verschiedenen Kontroll-Proteinen inkubiert, um die Signalintensitäten mit denen des zu untersuchenden Proteins zu vergleichen (CRP: HSA mit 0,1-500 nM; sCD25: HSA mit 0,1-100 nM, CRP mit 0,5 und 500 nM CRP; CXCL9: HSA mit 0,1-100 nM, CRP mit 0,1-100 nM). Bei einem kompetitiven Versuchsaufbau wurde das markierte und zu untersuchende Antigen zusammen mit einem Kontroll-Protein in die Vertiefung der Inkubationskammer gegeben, um zu überprüfen, ob das zu untersuchende Protein bevorzugt gebunden wird (CRP: HSA als Kontroll-Protein, 0,5-500 nM, 5 bzw. 30 min, sCD25: CRP und HSA als Kontroll-Proteine, je 50 nM, 120 min).

#### *Einfluss verschiedener Inkubationszeiten*

Bei einem Forward-Microarray zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Inkubationszeiten wurden die immobilisierten Antikörper dem markierten Antigen zu unterschiedlich langen Inkubationszeiten ausgesetzt (100 µL; CRP: 5-90 min, 10 nM; sCD25: wenige Sekunden bis 180 min, 100 nM; CXCL9: wenige Sekunden bis 180 min, 50 nM). Die verwendeten Antigen-Konzentrationen wurden aus den Ergebnissen der Versuche ‚Einfluss verschiedener Antigen-Konzentrationen‘ gewählt, sodass ein eindeutiges Signal entsteht, jedoch ressourcenschonend gearbeitet wurde. Die Auftragung der Proteinlösung erfolgt nacheinander, sodass alle Felder gleichzeitig gewaschen und weiterprozessiert werden konnten. Bis ein Feld mit Proteinlösung inkubiert wurde, wurde es mit PBS vor Austrocknung geschützt.

### *Sandwich-Microarray*

Für die Microarrays im Sandwich-Format wurden die Antikörper fluoreszenzmarkiert und vorweg mit den zu untersuchenden Proteinlösungen inkubiert. Im Inkubationsschritt wurden diese dann gemeinsam in die Vertiefungen der Inkubationskammer gegeben, um der Bindungsreihenfolge auf einem LFA gerecht zu werden.

### *Einfluss verschiedener Antigen-Konzentrationen*

Zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Antigen-Konzentrationen im Sandwich-Format wurde eine definierte Konzentration Detektionsantikörper (CRP: 100 nM und 200 nM; sCD25: 50 nM; CXCL9: 50 nM) mit variierenden Antigen-Konzentrationen vorinkubiert (CRP: 10-100 nM, 15 min; sCD25: 0-2,5  $\mu$ M, 120 min; CXCL9: 0-500 nM, 90 min). Anschließend wurde die Lösung aus Detektionsantikörper und Antigen in die Vertiefungen der Inkubationskammer gegeben und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert (CRP: 15 min; sCD25: 180 min; CXCL9: 120 min). Zusätzlich wurden zur Beurteilung der Antikörperspezifität die immobilisierten Antikörper mit verschiedenen Proteinen mit variierenden Konzentrationen mit gleichem Inkubationszeiten und gleichen Konzentrationen an Detektionsantikörpern untersucht (CRP: HSA mit 50 und 500 nM; sCD25: HSA mit 100 nM, CRP mit 100 nM CRP; CXCL9: HSA und CRP mit 50 und 500 nM).

### *Einfluss verschiedener Detektionsantikörper-Konzentrationen*

Zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Detektionsantikörper-Konzentrationen im Sandwich-Format wurde eine definierte Konzentration Antigen (sCD25: 2,5 nM, CXCL9: 50 nM) mit variierender Detektionsantikörper-Konzentration (sCD15: 0-1  $\mu$ M, 120 min; CXCL9: 0-100 nM, 90 min) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus Detektionsantikörper und Antigen in die Vertiefungen der Inkubationskammer gegeben und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert (sCD25: 180 min; CXCL9: 120 min).

### **7.3.4.3 Auswertung der Microarray-Slides**

Nachdem die Microarray-Slides getrocknet wurde, wurden sie zur Auswertung mit dem Scanner GenePix 4000B (Axon, Forster City, CA, USA) visualisiert. Beim Scannen wurden durch die Variation der verschiedenen Photomultipliersensitivitäten (PMT-*gain*) sowohl starke als auch schwächere Signal erfasst. Dabei wurde die Laserstärke auf 33% gesetzt, damit die Nitrozellulosemembran nicht durch den Laser geschädigt wird. Um die gewünschten Proteine zu visualisieren, wurden diese vorher mit Cy5 oder dem Monolith Labelling Kit fluoreszenz-markiert (B.4.1) und anschließend bei einer Wellenlänge von 635-650 nm angeregt und das emittiert Licht im orange-roten Bereich des sichtbaren Spektrums visualisiert. Das dabei entstehende Abbild des Microarray wurde anschließend mit der Software GenePix Pro 7 ausgewertet. Auf den entstandenen Scans wurde eine Maske (*grid*), die das *Spotting*-Muster darstellt, gelegt. Mit dieser Maske wird festgelegt in welchen Bereichen des Scans sich die auszuwertenden Bereiche befinden. Das Programm ermittelt daraufhin in den vorgegebenen Bereichen Parameter wie die Signalintensität (SM: *Signal Mean*), Hintergrundintensität (BM: *Background Mean*) und SNR (*Signal-to-Noise-Ratio*). Die SM besteht aus den gemittelten Intensitäten jedes Pixels in einem Spot. Die relative Signalintensität stellt die Intensität eines Spots abzüglich des Hintergrundes dar (SM-BM). In den Graphen dieser Arbeit werden die relativen Signalintensitäten der acht bzw. neun

Replikate addiert und gemittelt (mittlere Signalintensität). Die SNR wird aus der relativen Signalintensität dividiert durch die Standardabweichung des Hintergrundes (Stdev.BG) berechnet  $((SM-BM) \cdot (Stdev.BG)^{-1})$  und dient zur Überprüfung der Signalqualität. Erst ab einer SNR eines Punktes über einem Wert von 3 ( $SNR \geq 3$ ) besitzt dieser eine auswertbare Signalintensität.<sup>178</sup> Dementsprechend wurden hier nur Punkte mit  $SNR \geq 3$  verwendet.

### 7.3.5 Lateral Flow Assay

#### 7.3.5.1 Flokkulationstest und Herstellung von Goldnanopartikel-Antikörper-Konjugaten

Für die Signalgebung im LFA werden Konjugate aus AuNPs und Detektionsantikörpern verwendet. Dazu wird im Flokkulationstest die niedrigste Antikörper-Konzentration ermittelt, die die AuNPs vollständig bedeckt und somit stabilisiert. Während des Flokkulationstest wird mittels Salzzugabe eine Aggregation, die entsteht, wenn die Antikörper nicht mit ausreichend Antikörpern bedeckt sind, ausgeschlossen. Die Aggregation kann mittels UV-Vis Spektroskopie verfolgt werden.<sup>157</sup>

Dazu wurde die Gold-Lösung auf pH 9 mittels verdünnter Salzsäure gebracht. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze für den Flokkulationstest wird in Tabelle 7-11 (Pipettierschema bei Verwendung monoklonaler Antikörper) und Tabelle 7-12 (Pipettierschema bei Verwendung polyklonaler Antikörper) dargestellt. In jedes Reaktionsgefäß (1,5 mL) wird die Gold-Lösung und der Boraxpuffer vorlegt.

**Tabelle 7-11: Pipettierschema zur Herstellung verschiedener Ansätze für den Flokkulationstest mit unterschiedlichen Mengen an monoklonalen Detektionsantikörper (DA).**

|   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gold-Lösung [ $\mu\text{L}$ ]                                 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| DA ([ $\mu\text{L}$ ], $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 5   | 10  | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  |
| Boraxpuffer [ $\mu\text{L}$ ]                                 | 70  | 65  | 60  | 55  | 50  | 45  | 40  | 35  | 30  | 25  |

**Tabelle 7-12: Pipettierschema zur Herstellung verschiedener Ansätze für den Flokkulationstest mit unterschiedlichen Mengen an polyklonalen Detektionsantikörper (DA).**

|   | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10      |
|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| Gold-Lösung [ $\mu\text{L}$ ]                                 | 20 | 20  | 20  | 20  | 20  | 20  | 20  | 20  | 20  | 20      |
| DA ([ $\mu\text{L}$ ], $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 0  | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9     |
| Boraxpuffer [ $\mu\text{L}$ ]                                 | 3  | 2,9 | 2,8 | 2,7 | 2,6 | 2,5 | 2,4 | 2,3 | 2,2 | 2,1 ... |

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,6 | 1,7 | 1,8 | 1,9 | 2   | 2,1 | 2,2 | 2,3 | 2,4 | 2,5 | 2,6 |     |
| ... | 2   | 1,9 | 1,8 | 1,7 | 1,6 | 1,5 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |

Für eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Antikörper in der Gold-Lösung, werden die Antikörper in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert, kurz auf dem Vortexmischer in die Gold-Lösung eingebracht und für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend werden 28,75  $\mu\text{L}$  bzw. 2,3  $\mu\text{L}$  NaCl (10% w/w) in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben und mittels Vortexmischer in die Lösung eingebracht. Die Lösungen wurden visuell begutachtet und mittels UV-Vis-Spektrometer (Epoch, Mikroplatten-Spektralphotometer, Spektrum: 300-700 nm) zusammen mit reinen AuNP ohne Antikörper vermessen. Die Kurvenverläufe wurden anschließend mit den typischen Charakteristika eines Kurvenverlaufs von reinen Goldnanopartikeln verglichen und die hierzu ähnlichste Kurve wurde für die Herstellung der Goldnanopartikel-Antikörper-Konjugaten verwendet.

Für die Herstellung der Goldnanopartikel-Antikörper-Konjugate wurden je nach im Flokkulationstest identifizierter Antikörperkonzentration, Gold-Lösung, Detektionsantikörper und Boraxpuffer vereint und für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 28,75  $\mu\text{L}$  BSA-Lösung (10% in PBS) in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben, auf dem Vortexmischer gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000xg, 30 min). Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 670  $\mu\text{L}$  Wasser gelöst. Dieser Waschschrift wurde für die sCD25-spezifischen sowie die CXCL9-spezifischen Antikörper noch zwei Mal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 50  $\mu\text{L}$  Wasser gelöst.

### 7.3.5.2 Vorbehandlung der Release Pads

Das *Release Pad* wurden für eine optimale Konjugat- und Probenaufnahme für ca. 5 h in einer Pufferlösung (1% BSA, 0,05% Tween 20, 100 mM Tris (pH 8)) inkubiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### 7.3.5.3 Herstellung der Teststreifen

Für die Herstellung der Teststreifen wurden die Membran (Nitrozellulosemembran Unisart® 180 mit *backing*, 140 mit *backing*, 140 ohne *backing*, 95 mit *backing*), das *Release Pad* und das *Absorbent Pad* auf eine selbstklebende *Backing Card* aufgeklebt, wobei die beiden *Pads* mit der Membran für einen gesicherten Probenübergang überlappen müssen. Anschließend wurden die Teststreifen mit der Guillotine (Dahle562) in 0,4 mm breite Streifen geschnitten.

#### **7.3.5.4 Auftragen der Antikörper in der Test- und Kontrollzone**

Die Antikörper in der Test- und Kontrolllinie wurden mit verschiedenen Methoden aufgebracht. Zum einen wurden sie händisch in Form eines Punktes oder in Form einer Linie durch die Auftragung mehrerer Punkte nebeneinander aufgetragen ( $0,1-0,5 \mu\text{L}$ ;  $0,1-3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Für die Auftragung wurden die Streifen in eine Vorrichtung mit Markierung für die Höhe des Test- und Kontrolllinie gelegt (Abbildung 7-1). Zum anderen wurden die Antikörper maschinell entweder mittels Nano-Plotter oder durch eine externe Firma (Fassisi GmbH,  $1 \mu\text{L}$  Antikörper/ cm Membran) aufgetragen. Mit dem Nano-Plotter wurde mit je 20 Tropfen pro Punkt und 705 Reihen (1 Punkt pro Reihe) mit einem Abstand von  $0,1 \text{ mm}$  pro Reihe eine Linie gedruckt. Bei der maschinellen Auftragung wurden zunächst die Antikörper auf die Membran aufgetragen und dieser erst anschließend in Streifen geschnitten. Die Antikörper wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **7.3.5.5 Durchführung des Lateral Flow Assays**

Für die Durchführung eines LFAs wurde zunächst der Laufpuffer (zu untersuchendes Protein in  $0,1\%$  BSA/PBS oder Patientenprobe) hergestellt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (BRANDplates®) gegeben. Die Patientenproben wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde das Konjugat mit Wasser auf ein Volumen von  $10 \mu\text{L}$  aufgefüllt, in der Mitte des *Release Pads* aufgetragen und der LFA-Streifen wurde vertikal in die Vertiefung der Mikrotiterplatte mit dem Laufpuffer gestellt. Es wurden Scans nach 20, 40 und 60 Minuten aufgenommen.

#### **7.3.5.6 Auswertung der Lateral Flow Assays**

Die Scans wurden mittels ImageJ ausgewertet. Dafür wurden die Bilder grau skaliert und über einem Analysefenster von  $126 \times 738$  Pixel wurden die Histogramme mit den Intensitäten der roten Bereiche in der Test- und Kontrollzone dargestellt.

Zur Berechnung der Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurve wurde MS Excel XLSTAT 2020 verwendet. Dazu wurden die eGFR-Konzentrationen der im LFA verwendeten Patientenproben sowie die entsprechenden Intensitäten der Testzone verwendet.

## **Betreute Abschlussarbeiten**

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten von mir geplant und betreut:

Yvonne Mergel: Entwicklung antikörperbasierter Systeme zur Detektion von sCD25.  
Bachelorarbeit im Fach Life Science, Februar – April 2019. Teilergebnisse in Kapitel 4.3.2

Charlotte Hauschildt: Entwicklung antikörperbasierter Systeme zur Detektion von CXCL9.  
Bachelorarbeit im Fach Life Science, Oktober – Dezember 2019. Teilergebnisse in Kapitel 4.4.3

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von angeborenem und adaptivem Immunsystem in Gegenwart eines körperfremden Antigens (Abbildung modifiziert nach Rink et al. <sup>4</sup> ).....  | 5  |
| Abbildung 3-2: Einsatz verschiedener Medikamente zur Minimierung einer Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantats (Abbildung modifiziert nach Halloran et al. <sup>21</sup> ).....  | 8  |
| Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Verlaufes einer T-zell-vermittelten akuten bzw. chronischen Nierenabstoßung über den direkten bzw. indirekten Weg (Abbildung modifiziert nach Joosten <sup>34</sup> ).....  | 13 |
| Abbildung 3-4: Pentamere Struktur von C-Reaktiven Protein (Abbildung aus Shrive et al. <sup>56</sup> ).....   | 15 |
| Abbildung 3-5: Verschiedene Zusammensetzungen des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R) mit den Untereinheiten IL-2R $\alpha$ (CD25), IL-2R $\beta$ (CD122) und der $\gamma_c$ -Kette (CD132) und der daraus resultierenden Affinitäten (Abbildung modifiziert nach Asao <sup>80</sup> ).....   | 16 |
| Abbildung 3-6: sCD25-Level von Patienten mit (yes, n=22) und ohne (no, n=53) Transplantatabstoßung vor (pre) und nach (post) der Nierentransplantation (**p<0,01, ***p<0,001; Abbildung aus Rasool et al. <sup>86</sup> ).....  | 17 |
| Abbildung 3-7: Anstieg des CXCL9 (MIG)-Levels im Urin bei Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen (AR=akute Abstoßung, Borderline=Borderline-Abstoßung, ABAR=Antikörpervermittelte Abstoßung (AMR), ATN=akute tubuläre Nekrose, BKN=BK Virus Nephropathie, CAN= chronische Allograft Nephropathie, SGF= stabile Transplantatfunktion, HC=gesunde Kontrolle, **p < 0,01) (Abbildung aus Hu et al. <sup>100</sup> ).....        | 18 |
| Abbildung 3-8: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers. Dargestellt sind die Antigenbindestellen, schweren (blau-violett) und leichten (gelb-orange) Ketten sowie sind die Fc-Region ( <i>crystallisable fragment</i> ), Fab-Fragment ( <i>antigen-binding fragment</i> ) und die konstanten Regionen (C') und die variablen Regionen (V') (Abbildung modifiziert nach Hufnagel und Brettschneider <sup>107</sup> )..... | 20 |
| Abbildung 3-9: Kassette für ein Multi-Parameter-Lateral Flow Assay-System von der Firma Fassisi GmbH. Die Probe wird jeweils in den runden Aufgabefeldern aufgetragen. Das Ergebnis kann anschließend durch eine eventuelle Rotfärbung in den länglichen Feldern unter T (Testzone) und C (Kontrollzone) abgelesen werden.....  | 22 |
| Abbildung 3-10: Schematische Darstellung eines Lateral Flow Assays (LFA). A) Zusammensetzung eines LFA-Streifens, B) positives Testergebnis (zwei rote Linien), C) negatives Testergebnis (eine rote Linie in der Kontrollzone).....  | 23 |
| Abbildung 4-1: Rasterelektronenmikroskop (REM) - Aufnahmen der verwendeten Goldnanopartikel (AuNP) und ihre Größenverteilung. A), B) und C) zeigen drei exemplarische REM-Aufnahmen der AuNPs. In A wurden zusätzlich exemplarisch vier Größenmarker dargestellt. D) Verteilung der Durchmesser von 186 AuNPs [nm] dieser REM-Aufnahmen (Eingereicht als Seiler et al. <sup>138</sup> ).....                                    | 30 |
| Abbildung 4-2: UV-Vis-Spektrum der verwendeten Goldnanopartikel (AuNP). Die Größe der AuNPs wurde anhand des Verhältnisses von Absorptionsmaximum ( $A_{spr}$ ) der AuNPs zur Absorption bei 450 nm ( $A_{450}$ ) berechnet (Eingereicht als Seiler et al. <sup>138</sup> ).....  | 31 |
| Abbildung 4-3: Schematische Darstellung eines Microarray-Aufbaus mit Fängerantikörper, Antigen (CRP, sCD25 oder CXCL9) und einem fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper.....  | 32 |
| Abbildung 4-4: Auftragungsschema der Antikörper auf einen Microarray-Slide. A) Microarray-Slide mit 16 Nitrozellulosefeldern. B) Auftragungsschema der Proteine in dieser Arbeit: Von links nach rechts wurden bis zu sechs verschiedene Antikörper aufgetragen und von oben nach unten acht Replikate dieser Antikörper.....   | 33 |
| Abbildung 4-5: Schematische Darstellung vom Ablauf eines Microarray-Versuchs im A) Forward-Format und B) Sandwich-Format. 1) Auftragung der Antikörper, 2) Zugabe des Blockierungsreagenzes, 3) Entfernen von ungebundenem Reagenz, 4A) Zugabe fluoreszenzmarkierter Antigene, 4B) Zugabe von Antigenen gebunden an   |    |

|  |    |
|--|----|
| fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper, 5A) und 5B) Entfernen von ungebundenem Reagenz.....  | 33 |
| Abbildung 4-6: Schematische Darstellung eines Microarrays im Forward-Format. ....  | 34 |
| Abbildung 4-7: Einfluss verschiedener CRP*-Konzentrationen (0,01 - 1000 nM) bei gleichbleibender Konzentration (1 mg·L <sup>-1</sup> ) der vier monoklonalen Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39) im Forward-Format. N=8.....  | 35 |
| Abbildung 4-8: Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (5 - 90 Minuten) der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39; 1 mg·L <sup>-1</sup> ) gegenüber CRP* (10 nM) im Forward-Format. N=8.....  | 37 |
| Abbildung 4-9: Schematische Darstellung des Sandwich-Formats, das sowohl im Microarray als auch im LFA in der Testzone verwendet wird.....   | 37 |
| Abbildung 4-10: Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 250 nM, 1000 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39; 1 mg·L <sup>-1</sup> ) sowie des Detektionsantikörpers 43*(100 nM, links bzw. 200 nM, rechts) im Sandwich-Format. N=8. ....  | 38 |
| Abbildung 4-11: Schematische Darstellung eines Microarrays im Sandwich-Format bei hoher Konzentration an Detektionsantikörpern. ....   | 39 |
| Abbildung 4-12: Microarray im Sandwich-Format mit verschiedenen Antigen-Konzentrationen und gleichbleibender Konzentration an markiertem Detektionsantikörper. A) niedrige Antigen-Konzentration, B) mittlere Antigen-Konzentration, C) hohe Antigen-Konzentration. ....   | 40 |
| Abbildung 4-13: Einfluss verschiedener CRP-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 250 nM, 1000 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39, 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) sowie des Detektionsantikörpers 39* (100 nM, links bzw. 200 nM, rechts) im Sandwich-Format. N=8. ....  | 40 |
| Abbildung 4-14: Bindungsstudien im Forward-Format von verschiedenen CRP*- und HSA*-Konzentrationen (0,1, 0,5, 10 und 500 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität (FA-30, FA-43, FA-05, FA-39). N=8.....   | 41 |
| Abbildung 4-15: Kompetitive Bindungsstudien im Forward-Format mit fluoreszenzmarkiertem CRP* (500 nM), verschiedenen Konzentrationen nicht-markiertem HSA (0,5; 1; 10 und 500 nM) und den Fängerantikörpern FA-30, FA-43, FA-05 und FA-39. N=8. ....   | 42 |
| Abbildung 4-16: Schematische Darstellung eines Lateral Flow Assays. A) Darstellung der einzelnen Kom-ponenten eines Lateral Flow Assays mit seiner Flussrichtung. B) Ausbildung einer Rotfärbung durch Bindung des Antigen-Konjugat-Komplexes in der Testzone sowie Bindung des Detektionsantikörpers in der Kontroll-zone zeigt ein positives Test-Ergebnis an. C) Alleinige Ausbildung einer Rotfärbung in der Kontrollzone durch Bindung des Konjugats zeigt ein negatives Test-Ergebnis an (Eingereicht als Seiler et al. <sup>138</sup> ). ....   | 43 |
| Abbildung 4-17: Visuelle Auswertung (A) und Absorptionsspektren (B) des Flokkulationstests mit DA-39 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,78 µg·mL <sup>-1</sup> , 2=1,74 µg·mL <sup>-1</sup> , 3=2,6 µg·mL <sup>-1</sup> , 4=3,48 µg·mL <sup>-1</sup> , 5=4,35 µg·mL <sup>-1</sup> , 6=5,22 µg·mL <sup>-1</sup> , 7=6,09 µg·mL <sup>-1</sup> , 8=6,96 µg·mL <sup>-1</sup> , 9=7,83 µg·mL <sup>-1</sup> , 10=8,7 µg·mL <sup>-1</sup> , AuNP=0 µg·mL <sup>-1</sup> ). Zur besseren Übersicht sind in B) nicht alle Konjugationsansätze dargestellt. Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert..... | 45 |
| Abbildung 4-18: LFAs (B) unter Verwendung von drei unterschiedlichen Membranen (I, II, III), die mit jeweils vier verschiedenen Laufpuffern durchgeführt wurden sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100 µL CRP (50 mg·L <sup>-1</sup> ), HSA (50 g·L <sup>-1</sup> ), PBS mit 0,1% BSA oder CRP (50 mg·L <sup>-1</sup> ) mit reinen AuNPs durchgeführt wurden. Es wurde 1 µL AuNP-39 auf dem <i>Release Pad</i> , Antikörper 43 als CRP-FA (0,3 µL, 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) in der Testzone                               |    |

- und Antikörper WG als FA für DA-39(0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Kontrollzone verwendet. I: Membran 140 mit *backing*; II: 140 ohne *backing*; III: 95 mit *backing*. ..... 47
- Abbildung 4-19: LFAs (B) unter Verwendung von drei unterschiedlichen Membranen (I, II und III), die mit jeweils drei verschiedenen Laufpuffern durchgeführt wurden sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100  $\mu\text{L}$  CRP (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), HSA (50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) oder PBS mit 0,1% BSA durchgeführt wurden. Es wurde 1  $\mu\text{L}$  AuNP-43 auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Testzone und Antikörper WG als FA für DA-43 (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Kontrollzone verwendet. I: Membran 140 mit *backing*; II: 140 ohne *backing*; III: 95 mit *backing*. ..... 49
- Abbildung 4-20: LFAs (B) mit unterschiedlichen Fänger- und Detektionsantikörpern zur Identifizierung der geeignetsten Kombination sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die jeweils mit 100  $\mu\text{L}$  CRP (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durchgeführt wurden. Es wurde jeweils 1  $\mu\text{L}$  Konjugat auf dem *Release Pad* und WG (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Kontrollzone verwendet. Als Fängerantikörper (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) wurden verschiedene Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. .... 50
- Abbildung 4-21: LFAs (B) unter Verwendung von variierenden CRP-Konzentrationen (0,001 – 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) im Laufpuffer sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Säulendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1  $\mu\text{L}$  AuNP-05 auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Testzone und Antikörper WG als FA für AuNP-05 (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Kontrollzone verwendet. .... 51
- Abbildung 4-22: Schematische Darstellung der Auswirkung des *high-dose hook-effects*. Eine deutlich erhöhte Konzentration an CRP führt durch Übersättigung der Antikörper zu dem gleichen Signal wie eine niedrigere CRP-Konzentration (Abbildung modifiziert nach Schiettecatte et al. <sup>156</sup>). ..... 52
- Abbildung 4-23: Schematische Darstellung eines LFAs mit positivem und negativem Signal. A) Bei einer CRP-Konzentration über 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bedeutet ein positives Ergebnis eine Rotfärbung der Test- und Kontrollzone. Bei einem negativen Ergebnis erscheint lediglich die Kontrollzone. B). Bei einer CRP-Konzentration unter 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bedeutet ein negatives Ergebnis eine Rotfärbung der Test- und Kontrollzone. Bei einem positiven Ergebnis erscheint lediglich die Kontrollzone. .... 53
- Abbildung 4-24: Schematische Darstellung eines Sandwich-Formats in der Testzone (TZ) bei Konzentration unter (A) und über (B) 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRP. A) Bei CRP-Konzentrationen unter 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  binden sowohl Fänger- und Detektionsantikörper an das Antigen und erzeugen somit ein Signal auf der TZ. B) Bei CRP-Konzentrationen über 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  binden führt die hohe Antigen-Konzentration dazu, dass sowohl die Fänger- als auch die Detektionsantikörper mit Antigenmolekülen abgesättigt sind und somit keinen Sandwich sowie Signal ausbilden können. .... 54
- Abbildung 4-25: Schematische Darstellung einer zusätzlichen Hilfszone (HZ) und ihres Einflusses. A) Aufbau des LFAs mit Hilfszone, Testzone (TZ) und Kontrollzone (CZ), B) niedrige Antigen-Konzentration, C) mittlere Antigen-Konzentration, D) hohe Antigen-Konzentration, E) sehr hohe Antigen Konzentrationen. .... 56
- Abbildung 4-26: LFAs (B) mit einer Test- (TZ) und einer Hilfs- (HZ)zone (B) sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung mit ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, die von links nach rechts jeweils mit 100  $\mu\text{L}$  CRP (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  CRP (20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  CRP (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inkubiert wurden. I: Es wurde 1  $\mu\text{L}$  AuNP-30 (1:10 verdünnt) auf dem

*Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 2 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-30 (2-3 x 0,1 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. II: Es wurde 1 µL AuNP-05 (1,74 µg·mL<sup>-1</sup>) auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (2-3 x 0,1 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet..... 57

Abbildung 4-27: Strategie zur Herabsetzung der Intensität der Testzone durch Verwendung eines weiteren nicht-markierten Detektionsantikörpers. A) Schematische Darstellung eines LFAs, bei dem die Probenflüssigkeit vorweg mit CRP-spezifischen Antikörpern inkubiert wird. B) Schematische Darstellung der Bindung des markierten sowie des nicht-markierten Detektionsantikörpers an CRP und Fängerantikörper. .... 58

Abbildung 4-28: LFAs (B) unter Verwendung einer Vorinkubation mit einem zusätzlichen CRP-spezifischen Antikörper. Laufpuffer (CRP, 1 mg·L<sup>-1</sup>) wurde vorweg 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen (0,1-0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) des CRP-spezifischen Antikörpers 43 inkubiert. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (hellgrau) und Kontrollzone (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem *Release Pad*, Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 0,4 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Testzone und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der Kontrollzone verwendet. I: Proben wurden mit CRP-spezifischem Antikörper vorinkubiert. II: Probe wurde nicht vorinkubiert. .... 59

Abbildung 4-29: LFAs (B) mit einer zusätzlichen versteckten Hilfszone (HZ) und nach Vorinkubation der CRP-Probenflüssigkeit mit einem CRP-spezifischen Antikörper für 15 Minuten. Es wurden unterschiedliche Antikörpern in variierenden Konzentrationen in der Testzone (TZ) sowie der Hilfszone (HZ) verwendet. Menge und Zusammensetzung des Konjugates auf dem *Release Pad* blieben gleich (1 µL AuNP-05). Jeweils der rechte Streifen dient als Kontroll-LFA ohne Vorinkubation. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. I: Es wurde Antikörper 39 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. II: Es wurde Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 43 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. III: Es wurde Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ, Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. .... 60

Abbildung 4-30: LFAs (B) mit einer Testzone (TZ) und einer Hilfszone (HZ), verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer und einem Extra-Pad mit dem CRP-spezifischen Antikörper 43. A) Auswertung der LFAs mittels ImageJ und die daraus resultierenden Säulendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (mittelgrau), HZ (hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der verschiedenen LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 (1,74 µg·mL<sup>-1</sup>) auf dem *Release Pad*, Antikörper 30 als CRP-FA (5-7 x 0,1 µL; 3 mg·mL<sup>-1</sup>) in der TZ und HZ und Antikörper WG als FA für DA-05 (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: CRP-Proben (1 – 50 mg·L<sup>-1</sup>). II: Kontrollen: HSA (50 g·L<sup>-1</sup>), PBS und CRP (50 mg·L<sup>-1</sup>) mit reinen AuNPs..... 61

Abbildung 4-31: Boxplots der sCD25-Konzentrationen in Urin- und Plasmaproben. A: 1. Kohorte, Plasmaproben; B: 2. Kohorte, Plasmaproben; C: 3. Kohorte, Urinproben von 112 (A), 71 (B) und 61 (C) Nierentransplantatempfängern. Analysiert mit *Protein-Multiplex-Assay (Biorad, A und B)* und ELISA (C, als Teil der vorliegenden Arbeit). Sterne zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Patienten mit einer unauffälligen Biopsie an (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, gemäß Mann-Whitney-U-Test). TCMR=T-zellvermittelte Abstoßung, AMR=Antikörpervermittelte Abstoßung (Eingereicht als Seiler et al.<sup>138</sup>)..... 64

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 4-32: Einfluss verschiedener sCD25*-Konzentrationen (0,01 – 1000 nM) bei gleichbleibender Konzentration (1 mg·mL <sup>-1</sup> ) der drei Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB, FA-ABX) im Forward-Format (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ). N=8 .....   | 66 |
| Abbildung 4-33: Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (wenige Sekunden bis 180 Minuten) der drei sCD25-spezifischen Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB, FA-ABX; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) gegenüber sCD25* (100 nM) im Forward-Format (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ). N=8.....   | 67 |
| Abbildung 4-34: Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5 µM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-AF, FA-MAB und FA-ABX; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) sowie des Detektionsantikörpers (BAF*, 50 nM). BAF* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ). N=8 .....  | 68 |
| Abbildung 4-35: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Detektionsantikörpers (BAF*, 0 – 1 µM) bei konstanter sCD25-Konzentration (2,5 nM) im Sandwich-Format mit den Fängerantikörpern FA-AF, FA-MAB und FA-ABX (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ). .....  | 70 |
| Abbildung 4-36: Schematische Darstellung von Detektionsantikörpern, die das Antigen abschirmen, sodass dieses nicht mehr an den Fängerantikörper auf dem Microarray binden kann. ....  | 71 |
| Abbildung 4-37: Bindungsstudien im Forward-Format von verschiedenen sCD25*-Konzentrationen (500; 100; 0,5; 0,01 nM) im Vergleich mit HSA* (100; 10; 0,1 nM) und CRP* (500; 0,5 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-AF, FA-MAB und FA-ABX (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ).....   | 72 |
| Abbildung 4-38: Kompetitive Bindungsstudien im Forward-Format mit markiertem sCD25 (50 nM) und verschiedenen Konzentrationen nicht-markiertem CRP (50 nM) bzw. HSA (50 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-MAB, FA-AF und FA-ABX (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ).....   | 73 |
| Abbildung 4-39: Bindungsstudien zum Vergleich verschiedener Antigene (CRP, 100 nM; HSA, 100 nM; sCD25, 50 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität mit BAF* als Detektionsantikörper und FA-MAB, FA-AF und FA-ABX als Fängerantikörper im Sandwich-Format (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup> ). N=8.....   | 73 |
| Abbildung 4-40: Grafische Auswertung des Flokkulationstests mit Antikörper BAF als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 14 verschiedenen Antikörperkonzentrationen sowie unkonjugierte AuNPs (AuNP) als Referenz (1=0,00 µg·mL <sup>-1</sup> , 2=0,39 µg·mL <sup>-1</sup> , 4=1,17 µg·mL <sup>-1</sup> , 6=1,96 µg·mL <sup>-1</sup> , 8=2,74 µg·mL <sup>-1</sup> , 10=3,52 µg·mL <sup>-1</sup> , 12=4,30 µg·mL <sup>-1</sup> , 14=5,09 µg·mL <sup>-1</sup> , 16=5,87 µg·mL <sup>-1</sup> , 18=6,65 µg·mL <sup>-1</sup> , 20=7,43 µg·mL <sup>-1</sup> , 22=8,22 µg·mL <sup>-1</sup> , 24=9,00 µg·mL <sup>-1</sup> , 26=9,78 µg·mL <sup>-1</sup> ). Zur besseren Übersicht ist nur jeder zweite Konjugationsansatz dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.24)..... | 74 |
| Abbildung 4-41: LFAs (B) mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen (0 – 5,9 ng·mL <sup>-1</sup> ) im Laufpuffer sowie die jeweils grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und in der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-BAF auf dem <i>Release Pad</i> , Antikörper AF als sCD25-FA (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (5-7 x 0,1 µL; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) in der CZ verwendet. I: sCD25 im Laufpuffer. II: Kontrollproteine im Laufpuffer: sCD25 (5,9 ng·mL <sup>-1</sup> , mit reinen Goldnanopartikeln als Konjugat), CRP (50 mg·L <sup>-1</sup> ) und HSA (50 g·L <sup>-1</sup> ). .....  | 76 |
| Abbildung 4-42: Untersuchung einer Vorinkubation von Laufpuffer mit AuNP-BAF für 0 (schwarz), 15 (dunkelgrau), 30 (grau) und 45 (hellgrau) Minuten. Dazu wurden verschiedene sCD25-Konzentrationen (0 - 5,9 ng·mL <sup>-1</sup> ) im Laufpuffer verwendet. Die Scans der Membranen wurden 60 min nach Testbeginn aufgenommen. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in den Testzonen (TZ) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurden 2 µL AuNP-BAF auf dem <i>Release</i>   |    |

|  |    |
|--|----|
| <i>Pad</i> , Antikörper AF als sCD25-FA (0,3 $\mu\text{L}$ ; 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (0,3 $\mu\text{L}$ ; 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der CZ verwendet.....   | 79 |
| Abbildung 4-43: Vergleich von zwei AuNP-BAF-Konjugaten mit einer BAF-Konzentration von 4,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Nr. 12) und 5,87 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Nr.16) bei unterschiedlichen sCD25-Konzentrationen (5,9-0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) im Laufpuffer. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Die Scans der relevanten Membranbereichen wurden nach 60 min nach Testbeginn aufgenommen. Es wurden 2 $\mu\text{L}$ AuNP-BAF auf dem <i>Release Pad</i> , Antikörper AF als sCD25-FA (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. ....   | 81 |
| Abbildung 4-44: LFAs (B) mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen (5,9-0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , I) und Kontrollproteinen (CRP, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HSA, 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; CXCL9, 2000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , II) im Laufpuffer. Die Proben wurden für 15 Minuten mit AuNP-BAF vorinkubiert. A) Mittels ImageJ quantifizierte Intensität der Test-(TZ, hellgrau) und Kontrollzonen (CZ, dunkelgrau) der LFAs. B) Die Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 60 min nach Testbeginn. Es wurden 2 $\mu\text{L}$ AuNP-BAF (Nr.16) auf dem <i>Release Pad</i> , Antikörper AF als sCD25-FA (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der TZ und Antikörper AG als FA für DA-BAF (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. N=3. ....   | 82 |
| Abbildung 4-45: LFAs (B) von 53 Urin-Patientenproben und deren quantitative Auswertung mittels ImageJ (A). Proben wurden 1:2 mit Laufpuffer verdünnt und 15 Minuten vor Testbeginn mit AuNP-BAF (Nr. 16, 5,87 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) inkubiert. Die Scans der Membranen wurden 20 min nach Testbeginn aufgenommen. I: 35 LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer T-Zell-vermittelten Abstoßung (TCMR) durchgeführt wurden. II: Drei LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer Borderline-Abstoßung durchgeführt wurden. III: Zwei LFAs, die mit Urinproben von Patienten mit einer AMR zusammen mit TCMR bzw. Borderline-Abstoßung durch-geführt wurden. IV: 13 LFAs, die mit Urin-proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie durchgeführt wurden (Eingereicht als Seiler et al. <sup>138</sup> )..... | 85 |
| Abbildung 4-46: <i>Receiver Operating Characteristics</i> (ROC) – Kurven, die die Diskriminierung zwischen Proben von Patienten mit einer Abstoßungsreaktion von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (A) mittels des entwickelten Lateral Flow Assays zum Nachweis von sCD25 mit einer Fläche unter der Kurve (AUC, <i>area under curve</i> ) von 0,894 und (B) unter Verwendung des Serum-Kreatinin-Wertes mit einer AUC von 0,565 beschreibt. Die ROC-Analyse wurde mithilfe von MS Excel XLSTAT durchgeführt (Eingereicht als Seiler et al. <sup>138</sup> ).87   | 87 |
| Abbildung 4-47: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Rattenüberstände auf ihre Fähigkeit als Fängerantikörper.....  | 91 |
| Abbildung 4-48: Überprüfung der Hybridoma-Überstände aus der Ratte auf ihre Fähigkeit als Fängerantikörper. Die vier Detektionsantikörper mit der höchsten Affinität gegenüber CXCL9 sind gestrichelt umrandet. N=2. ....  | 92 |
| Abbildung 4-49: Überprüfung der Fängerantikörper A, J, C und S auf ihre Bindungsaffinität zu CXCL9 bei verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (0-20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). N=1.....  | 93 |
| Abbildung 4-50: Bindungsaffinität von Fängerantikörper A zu CXCL9 vor und nach der Aufreinigung. ....  | 94 |
| Abbildung 4-51: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Rattenüberstände auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper.....  | 94 |
| Abbildung 4-52: Überprüfung der Hybridoma-Überstände aus der Ratte auf ihre Fähigkeit als Detektions-antikörper. ....  | 95 |
| Abbildung 4-53: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zur Untersuchung der Mausüberstände auf ihre Fähigkeit als Detektionsantikörper. ....   | 95 |
| Abbildung 4-54: Überprüfung Hybridoma-Überstände aus der Maus auf ihre Fähigkeit als Detektions-antikörper. Die drei Detektionsantikörper mit der höchsten Affinität gegenüber CXCL9 sind gestrichelt umrandet. N=2.....   | 96 |
| Abbildung 4-55: Überprüfung der Detektionsantikörper 8, 15 und 26 auf ihre Bindungsaffinität zu CXCL9 bei verschiedenen Konzentrationen (1,56-50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).....   | 97 |
| Abbildung 4-56: Einfluss verschiedener CXCL9*-Konzentrationen (0,01 – 100 nM) bei gleichbleibender Konzentration (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) der vier monoklonalen Fängerantikörper (FA-   |    |

|  |     |
|--|-----|
| AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD) im Forward-Format (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup> ).<br>N=8.....   | 98  |
| Abbildung 4-57: Einfluss verschiedener Inkubationszeiten (wenige Sekunden bis 180 Minuten) der CXCL9-spezifischen Antikörper (FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) gegenüber CXCL9 im Forward-Format. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Signalintensität bezogen auf die jeweils höchste in einem Versuchsdurchlauf erzielte Signalintensität (=100 %) (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup> ). .....   | 100 |
| Abbildung 4-58: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 – 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD, 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) sowie des Detektionsantikörpers (AKC*; 50 nM) im Sandwich-Format (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup> ). N=8.....   | 101 |
| Abbildung 4-59: Bindungsstudien im Forward-Format von CXCL9* im Vergleich zu HSA* und CRP* in den gleichen Konzentrationen (100 nM, 1 nM, 0,1 nM) zur Beurteilung der Antikörperspezifität von FA-AKA, FA-AKB, FA-AKC und FA-AKD (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup> ). .....  | 103 |
| Abbildung 4-60: Beurteilung der Antikörperspezifität im Sandwich-Format unter Verwendung von CXCL9, HSA und CRP in den gleichen Konzentrationen (50 nM, 500 nM) mit AKA als Fängerantikörper (1 mg·L <sup>-1</sup> ) und AKC* als Detektionsantikörper (50 nM) (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup> ). N=8.....   | 104 |
| Abbildung 4-61: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit AKC als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,87 µg·mL <sup>-1</sup> , 2=1,71 µg·mL <sup>-1</sup> , 3=2,54 µg·mL <sup>-1</sup> , 4=3,36 µg·mL <sup>-1</sup> , 5=4,17 µg·mL <sup>-1</sup> , 6=4,96 µg·mL <sup>-1</sup> , 7=5,74 µg·mL <sup>-1</sup> , 8=6,50 µg·mL <sup>-1</sup> , 9=7,26 µg·mL <sup>-1</sup> , 10=8,00 µg·mL <sup>-1</sup> , AuNP=0 µg·mL <sup>-1</sup> ). Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr. 9). .....   | 105 |
| Abbildung 4-62: LFAs (B) mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (100 – 1,56 ng·mL <sup>-1</sup> ) im Laufpuffer sowie die jeweils grafische Auswertung mittels ImageJ (A). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und in der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. Es wurde 2 µL AuNP-AKC auf dem <i>Release Pad</i> , Antikörper AKA als CXCL9-FA (0,3 µL; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) in der TZ und Antikörper AR als FA für DA-AKC (0,3 µL; 1 mg·mL <sup>-1</sup> ) in der CZ verwendet. I: CXCL9 im Laufpuffer. II: Kontrollproteine im Laufpuffer: CRP (50 mg·L <sup>-1</sup> ) und sCD25 (235 pg·mL <sup>-1</sup> ).....  | 106 |
| Abbildung 4-63: LFAs (B) mit Beschichtung der Fängerantikörper in der Test- und Kontrollzone (TZ, CZ) durch eine externe Firma (Fassisi GmbH). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: Testung der neuen Beschichtung mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (6250 – 1562,5 pg·mL <sup>-1</sup> ) im Laufpuffer und Antikörper AKA als CXCL9-FA (1 mg·mL <sup>-1</sup> ) auf der TZ, Antikörper AR als FA für DA-AKC (1 mg·mL <sup>-1</sup> ) auf der CZ und 2 µL AuNP-AKC. II: LFA mit 6250 pg·mL <sup>-1</sup> CXCL9 im Laufpuffer zum Vergleich. III: Verdopplung der Konjugat-Menge (AuNP-AKC, 4 µL). LFAs wurden mit verschiedenen CXCL9-Konzentrationen (6250 – 1562,5 pg·mL <sup>-1</sup> ) im Laufpuffer sowie FA-AKA (1 mg·mL <sup>-1</sup> ) auf der TZ und FA-AR (1 mg·mL <sup>-1</sup> ) auf der CZ durchgeführt..... | 108 |
| Abbildung 4-64: Verstärkung des Signals in der Testzone (TZ) durch einen zweiten mit Goldnanopartikeln konjugierten Detektionsantikörper (AuNP-IgG2a, lila). Der zweite Detektionsantikörper ist spezifisch gegen IgG2a-Antikörper gerichtet und bindet AuNP-AKC (grün). A) Rotfärbung in der TZ wird durch AuNP-IgG2a verstärkt. B) AuNP-IgG2a binden AuNP-AKC, sodass FA-AKA nicht mehr gebunden werden kann und eine Rotfärbung in der TZ ausbleibt. ....   | 109 |
| Abbildung 4-65: Verschiedene Auftrags-Positionen der beiden Konjugate. A) AuNP-IgG2a (schwarz) wird in der Nähe der Membran auf dem <i>Release Pad</i> aufgetragen B) AuNP-AKC (grau) wird in der Nähe der Membran auf dem <i>Release Pad</i> aufgegeben.....  | 110 |

- Abbildung 4-66: LFAs (B) mit zwei unterschiedlichen Konjugaten (AuNP-AKC und AuNP-IgG2a) in verschiedenen Konjugatvolumina und Auftrags-Positionen auf dem *Release Pad* (entspricht in B genannter Konjugat-Reihenfolge, I-VIII) zur Verstärkung der Rotfärbung in der Testzone mit  $6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 im Laufpuffer Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ) und Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: AuNP-AKC ( $2 \mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a ( $2 \mu\text{L}$ ). II: AuNP-AKC ( $1 \mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a ( $2 \mu\text{L}$ ). III: mit zusätzlicher Vorinkubation (15 Minuten) von AuNP-AKC mit der Laufprobe ( $2 \mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a ( $2 \mu\text{L}$ ). IV: AuNP-IgG2a ( $2 \mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC ( $1 \mu\text{L}$ ) V: AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC ( $2 \mu\text{L}$ ). VI: AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ). VII: Kontroll-LFA mit AuNP-IgG2a ( $2 \mu\text{L}$ ), ohne AuNP-AKC. VIII: Referenz-LFA zum Vergleich der Veränderung der Signalintensität mit AuNP-AKA ( $2 \mu\text{L}$ ). 111
- Abbildung 4-67: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen ( $0\text{-}6250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf dem optimierten LFA. LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. 112
- Abbildung 4-68: LFAs durchgeführt mit Urin-Patientenproben. LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone, Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone sowie AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. TCMR=T-Zell vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung, B=Borderline, TCMR, AMR und Borderline werden als Abstoßer zusammengefasst (hellgrau). N=Normal (Probe mit unauffälliger Biopsie, dunkelgrau) A) Proben wurden 1:10 mit Laufpuffer verdünnt. B) Proben wurden 1:2 mit Laufpuffer verdünnt. C) Proben wurden unverdünnt verwendet. I: Ohne Zusatzbedingungen. II: Zusätzlicher Einsatz von AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ). III: Zusätzlicher Einsatz einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Patientenprobe mit AuNP-AKC. IV: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Patientenprobe mit AuNP-AKC. 115
- Abbildung 4-69: LFAs durchgeführt mit Plasma-Patientenproben. LFAs wurden mit Antikörper-AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone, Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone sowie AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. TCMR=T-Zell vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung, B=Borderline, TCMR, AMR und Borderline werden als Abstoßer zusammengefasst (hellgrau). N=Normal (Probe mit unauffälliger Biopsie, dunkelgrau) A) Proben wurden 1:10 mit Laufpuffer verdünnt. B) Proben wurden 1:2 mit Laufpuffer verdünnt. C) Proben wurden unverdünnt verwendet. I: Ohne Zusatzbedingungen. II: Zusätzlicher Einsatz von AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ). III: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Laufprobe mit AuNP-AKC. 117
- Abbildung 4-70: Vergleich einer Plasma-Patientenprobe mit verschiedenen Verdünnungen der Probe. LFAs wurden mit FA-AKA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone, FA-AR ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone sowie AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) darstellen. B) Scan der relevanten Membranbereiche der LFAs I: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ). II: Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) der verdünnten Probe mit AuNP-AKC. 118
- Abbildung 4-71: LFAs, die mit Plasmaproben von Patienten mit verschiedenen Biopsie-Diagnosen durchgeführt wurden. Die LFAs wurden mit unverdünnten Proben, Antikörper AKA als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-AKC ( $3 \mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a ( $1 \mu\text{L}$ ) durchgeführt. Die Linie bei 400 AU stellt den *cut-off* zwischen positiven und negativen Testergebnissen dar. I: Zwei LFAs wurden mit Proben von Patienten, die an einer T-Zell-

- vermittelten Abstoßung (TCMR) leiden durchgeführt. Neun der verwendeten Proben stammen von Patienten mit einer Antikörper-vermittelten Abstoßung (AMR). Vier der aufgetragenen Proben kommen von Patienten, die eine Borderline-Abstoßung (B) aufweisen. Zwei LFAs wurden mit Proben von Patienten, bei denen eine AMR mit B bzw. B + others diagnostiziert wurde durchgeführt (davon neun richtig positiv und acht falsch negativ). II: Sieben LFAs mit Proben von Patienten mit einer unauffälligen Biopsie (davon 2 falsch positiv und 5 richtig negativ)..... 119
- Abbildung 7-1: Spotschema der Fängerantikörper auf die Nitrozellulosemembran mit Höhenangaben. A) händisch mit der Pipette 1 Tropfen à 0,3 µL, B) händisch mit der Pipette 5-7 Tropfen à 0,1 µL, C) mit dem Nano-Plotter gespottete Linie, D) von Fassisi beschichteter Streifen..... 138
- Abbildung 7-2: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit 43 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,78 µg·mL<sup>-1</sup>, 2=1,74 µg·mL<sup>-1</sup>, 3=2,6 µg·mL<sup>-1</sup>, 4=3,48 µg·mL<sup>-1</sup>, 5=4,35 µg·mL<sup>-1</sup>, 6=5,22 µg·mL<sup>-1</sup>, 7=6,09 µg·mL<sup>-1</sup>, 8=6,96 µg·mL<sup>-1</sup>, 9=7,83 µg·mL<sup>-1</sup>, 10=8,7 µg·mL<sup>-1</sup>, AuNP=0 µg·mL<sup>-1</sup>). Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.5)..... 138
- Abbildung 7-3: Visuelle (A) und grafische (B) Auswertung des Flokkulationstests mit 05 als Konjugationsantikörper unter Verwendung von 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1=0,87 µg·mL<sup>-1</sup>, 2=1,74 µg·mL<sup>-1</sup>, 3=2,6 µg·mL<sup>-1</sup>, 4=3,48 µg·mL<sup>-1</sup>, 5=4,35 µg·mL<sup>-1</sup>, 6=5,22 µg·mL<sup>-1</sup>, 7=6,09 µg·mL<sup>-1</sup>, 8=6,96 µg·mL<sup>-1</sup>, 9=7,83 µg·mL<sup>-1</sup>, 10=8,7 µg·mL<sup>-1</sup>, AuNP=0 µg·mL<sup>-1</sup>). Zur besseren Übersicht sind in B) nicht alle Konjugationsansätze dargestellt. Die blaue Kurve zeigt reine Goldnanopartikel (AuNP), die türkise Kurve zeigt den Konjugationsansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration, die die AuNPs ausreichend stabilisiert (Nr.7)..... 139
- Abbildung 7-4: LFAs zur Etablierung einer Rotfärbung der Testzone bei CRP-Konzentrationen kleiner als 10 mg·L<sup>-1</sup> mit verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer (0,1 – 50 mg·L<sup>-1</sup>). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem *Release Pad* sowie Antikörper WG als FA für DA-05 (0,3 µL, 1 mg·L<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: Fängerantikörper 30 (FA-30; 0,3 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verdünntem Konjugat (AuNP-05, 1 µL, 1:10). II: FA-30 (0,3 µL; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verdünntem Konjugat (AuNP-05, 1 µL, 1:10) und geringerer Konzentration des FA-30 (0,3 µL; 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>). III: reduzierte Konzentration des FA-30 (0,3 µL; 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>) und verringerte Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1 µL; 0,87 µg·mL<sup>-1</sup>, Nr.1)..... 139
- Abbildung 7-5: LFAs zur Etablierung einer Rotfärbung der Testzone bei CRP-Konzentrationen kleiner als 10 mg·L<sup>-1</sup> mit verschiedenen CRP-Konzentrationen im Laufpuffer (1 – 75 mg·L<sup>-1</sup>). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurde 1 µL AuNP-05 auf dem *Release Pad* sowie Antikörper WG als FA für DA-05 (0,3 µL, 1 mg·L<sup>-1</sup>) in der CZ verwendet. I: verringerte Konzentration des Fängerantikörpers 39 (FA-39; 0,3 µL; 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>) mit AuNP-05 (1 µL). II: erhöhte Konzentration FA-39 (0,3 µL; 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verringerte Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1 µL; 1,74 µg·mL<sup>-1</sup>, Nr.2). III: verringerte Konzentration FA-30 (0,3 µL; 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>) mit verringerte Konzentration des Detektionsantikörpers auf dem Konjugat (AuNP-05; 1 µL; 0,87 µg·mL<sup>-1</sup>, Nr.1)..... 140
- Abbildung 7-6: Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5 µM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AF, MAB und ABX; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) sowie des Detektionsantikörpers (AF\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AF\* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel<sup>158</sup>)..... 140

- Abbildung 7-7: Einfluss verschiedener sCD25-Konzentrationen (0 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AF, MAB und ABX; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (MAB\*, 50 nM) im Sandwich-Format. MAB\* und die zu untersuchenden sCD25-Lösungen wurden vorweg für 120 Minuten inkubiert (abgeändert nach Mergel <sup>158</sup>)..... 141
- Abbildung 7-8: LFAs zu Bindungsstudien von AuNP-AF zu den Fängerantikörpern (FA) MAB, ABX und AF mit verschiedenen sCD25-Konzentrationen im Laufpuffer (5,9 und 1,18  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Es wurden 2  $\mu\text{L}$  AuNP-AF auf dem *Release Pad* sowie Antikörper AG als FA für DA-BAF (0,3  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in der CZ verwendet. I: Einsatz von FA-MAB (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). II: Einsatz von FA-ABX (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). III: Einsatz von FA-AF (0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )..... 141
- Abbildung 7-9: Studie zu verschiedenen Trocknungszeiten und -methoden der Membran. Die Membranen wurden entweder bei Raumtemperatur, bei 40°C oder bei 50°C getrocknet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. Für die Durchführung der LFAs wurden AF als Fängerantikörper (5-7 x 0,1  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), AuNP-AF (1  $\mu\text{L}$ ) und 5,9  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 im Laufpuffer verwendet. I: Trocknungsdauer der Membran: 1h. II: Trocknungsdauer der Membran: 24 h. .... 142
- Abbildung 7-10: Vergleich von gewaschen und ungewaschen Konjugat (AuNP-AF, 2  $\mu\text{L}$ ) auf LFA-Streifen (Fängerantikörper AF; 0,3  $\mu\text{L}$ ; 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mit 5,9 und 1,18  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sCD25 im Laufpuffer. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der Testzone (TZ, hellgrau) und der Kontrollzone (CZ, dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche der LFAs. I: ungewaschene AuNP-AF. II: gewaschene AuNP-AF. .... 142
- Abbildung 7-11: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 – 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKA\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKA\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). .... 143
- Abbildung 7-12: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 – 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKB\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKB\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). .... 143
- Abbildung 7-13: Einfluss verschiedener CXCL9-Konzentrationen (0 – 500 nM) auf das Bindungsverhalten bei konstanter Konzentration der Fängerantikörper (AKA, AKB, AKC und AKD; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie des Detektionsantikörpers (AKC\*, 50 nM) im Sandwich-Format. AKC\* und die zu untersuchenden CXCL9-Lösungen wurden vorweg für 90 Minuten inkubiert (abgeändert nach Hauschild <sup>172</sup>). .... 144
- Abbildung 7-14: Ermittlung des besten Volumen-Verhältnis von AuNP-AKC zu AuNP-IgG2a zur Ausbildung der stärksten Rotfärbung in der Testzone. Für die Durchführung wurde Fängerantikörper AKA als CXCL9-FA (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ), Antikörper AR als AKC-FA (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ) und 1562,5  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CXCL9 im Laufpuffer verwendet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) und in der CZ (dunkelgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: AuNP-AKC (2  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (0,5  $\mu\text{L}$ ). II: AuNP-AKC (2  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (0,75  $\mu\text{L}$ ). III: AuNP-AKC (2  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a 1  $\mu\text{L}$ ). IV: AuNP-AKC (3  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (0,5  $\mu\text{L}$ ). V: AuNP-AKC (3  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (0,75  $\mu\text{L}$ ). VI: AuNP-AKC (3  $\mu\text{L}$ ) und AuNP-IgG2a (1  $\mu\text{L}$ ). VII: Referenz-LFA zum Vergleich der Veränderung der Signalintensität mit AuNP-AKA (2  $\mu\text{L}$ )..... 145
- Abbildung 7-15: Vergleich von unverdünnten Plasma- und Urin-Patientenproben von vier verschiedenen Patienten. LFAs wurden mit Antikörper AKA als CXCL9-FA (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der

---

|   |     |
|---|-----|
| Testzone (TZ), Antikörper AR als FA für DA-AKC ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone (CZ) sowie AuNP-AKC ( $3 \text{ }\mu\text{L}$ ) durchgeführt. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (hellgrau) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. I: Plasma- und Urinproben von Patient 1 als Laufpuffer. II: Plasma- und Urinproben von Patienten 2 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \text{ }\mu\text{L}$ ). III: Plasma- und Urinproben von Patient 3 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \text{ }\mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) Laufprobe mit AuNP-AKC. IV: Plasma- und Urinproben von Patient 4 als Laufpuffer; Zusätzlicher Einsatz von IgG2a ( $1 \text{ }\mu\text{L}$ ) und einer Vorinkubation (15 Minuten) Laufprobe mit AuNP-AKC. .... | 146 |
| Abbildung 7-16: Vergleich von jeweils zwei sCD25-LFAs unter gleichen Bedingungen, die an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Material-Chargen durchgeführt wurden. LFAs wurden mit Antikörper AF als CXCL9-FA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Testzone (TZ), Antikörper AG als FA für DA-BAF ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auf der Kontrollzone, AuNP-BAF ( $2 \text{ }\mu\text{L}$ ) und drei Urin-Patientenproben mit Laufpuffer verdünnt (1:2) verwendet. A) Zu den LFAs gehörende Balkendiagramme, die die Intensität der Rotfärbung in der TZ (dunkelgrau, LFA1 und hellgrau, LFA2) darstellen. B) Scans der relevanten Membranbereiche, 20 Minuten nach dem Auftragen der Probe. ....   | 147 |

## Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 3-1: BANFF-Kriterien zur Einordnung der Abstoßungsart nach Nierentransplantation (Tabelle aus Loupy et al. <sup>33</sup> ).....   | 10  |
| Tabelle 4-1: Verwendete CRP-spezifische, monoklonale Antikörper mit ihrer Artikelnummer sowie den in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen. ....  | 35  |
| Tabelle 4-2: Optimierung der Konzentration der Fängerantikörper sowie Konjugate. In der ersten Zeile sind Ausgangsbedingungen aufgelistet, Änderungen zum vorigen LFA sind in fett markiert. ....   | 54  |
| Tabelle 4-3: Verteilung der Abstoßungsarten der Urin- und Plasmaproben aus Abbildung 4-31 für die Bestimmung der sCD25-Konzentration. N: Anzahl analysierter Proben.....  | 64  |
| Tabelle 4-4: Verwendete Optimierungsstrategien zum Aufbau eines LFAs zu Detektion von sCD25. In der ersten Zeile sind die Ausgangsbedingungen aufgelistet. In der letzten Zeile ist die Zusammensetzung für den fertigen LFA dargestellt. In der Kontrollzone wurde immer der Antikörper AG (1 mg·L <sup>-1</sup> ) verwendet. Wurden nicht ausreichend Konzentrationen getestet, gibt es keine Angabe (k.A.) zu ‚maximale Rotfärbung in TZ‘..... | 83  |
| Tabelle 4-5: Anzahl verwendeter Urinproben aufgeteilt nach ihrer BANFF-Klassifikation und Kohorte. ....   | 84  |
| Tabelle 4-6: Auswertung des sCD25-Lateral Flow Assays (LFA) mit Angabe der erkrankten und gesunden Personen in Zusammenhang mit dem LFA-Ergebnis (positiv/negativ) und die daraus resultierende Einordnung in richtig positiv (RP), falsch positiv (FP), falsch negativ (FN) und richtig negativ (RN).....  | 86  |
| Tabelle 4-7: CXCL9-Konzentrationen der Urin- und Plasmaproben aus Kohorte 2 eingeteilt nach ihrer BANFF-Klassifikation. TCMR=T-Zell-vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung, N: Anzahl analysierter Proben.....   | 90  |
| Tabelle 4-8: Optimierungsstrategien des LFA-Aufbaus für die Detektion von CXCL9 hinsichtlich einer Intensivierung der Rotfärbung in der Testzone mit dem zugehörigen Ergebnis.....  | 107 |
| Tabelle 4-9: Verteilung der Urin- und Plasmaproben nach ihrer BANFF-Klassifikation aus der 2. und 3. Kohorte. TCMR=T-Zell-vermittelte Abstoßung, AMR=Antikörper-vermittelte Abstoßung.....  | 114 |
| Tabelle 4-10: Auswertung des CXCL9-Lateral Flow Assays (LFAs, unverdünnte Patientenprobe & mit AuNP-IgG2a) mit Angabe der erkrankten und gesunden Personen in Zusammenhang mit dem LFA-Ergebnis (positiv/negativ) und die daraus resultierende Einordnung in richtig positiv (RP), falsch positiv (FP), falsch negativ (FN) und richtig negativ (RN).....   | 120 |
| Tabelle 7-1: Verschiedene Nitrozellulosemembranen von Sartorius (UniSart®) mit ihren Eigenschaften. <sup>128,177</sup> .....  | 148 |
| Tabelle 7-2: Eigenschaften der Urin-Patientenproben, die für die LFA-Durchführungen verwendet wurden, nach Abstoßungsart sortiert. CyA*: Standard-Triple-Therapie bestehend aus Cyclosporin, Mycophenolat und Steroiden; Tac*: Standard-Triple-Therapie bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolat und Steroiden; mTOR*: Standard-Triple-Therapie bestehend aus mTOR-Inhibitor, Mycophenolat und Steroiden.....                                       | 148 |
| Tabelle 7-3: Verwendete Geräte und Materialien. ....  | 149 |
| Tabelle 7-4: Verwendete Software. ....  | 150 |
| Tabelle 7-5: Verwendete Chemikalien. ....   | 150 |
| Tabelle 7-6: Verwendete Kits.....   | 151 |
| Tabelle 7-7: Verwendete Puffer und Lösungen.....  | 151 |
| Tabelle 7-8: Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....   | 152 |
| Tabelle 7-9: Verwendete Antikörper und andere Proteine.....   | 152 |
| Tabelle 7-10: Verhältnis des Absorptionsmaximums ( $A_{spr}$ ) zum lokalen Minimum bei 460 ( $A_{450}$ ) in Abhängigkeit zum Durchmesser (d) eines Goldnanopartikels (aus Haiss et al. <sup>139</sup> ).....  | 154 |
| Tabelle 7-11: Pipettierschema zur Herstellung verschiedener Ansätze für den Flokkulationstest mit unterschiedlichen Mengen an monoklonalen Detektionsantikörper (DA). ....  | 161 |
| Tabelle 7-12: Pipettierschema zur Herstellung verschiedener Ansätze für den Flokkulationstest mit unterschiedlichen Mengen an polyklonalen Detektionsantikörper (DA). ....  | 161 |

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Lisa Katharina Seiler

Geburtsdatum/-ort 05.05.1989, Aachen

### Akademischer Werdegang

seit 06/2017 Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

10/2013 – 07/2015 Masterstudium, M. Sc. im Fach Life Science, Gottfried-Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
Thema der Masterarbeit: Heterologous Expression of Terpene-Related Gene Clusters from *T. reesei*

10/2009 – 10/2012 Bachelorstudium, B. Sc. im Fach Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
Thema der Bachelorarbeit: Studien zu möglichen Inhibitoren der Glutenhydrolyse

2008 Allgemeine Hochschulreife, Ricarda-Huch-Schule, Hannover

### Berufliche Erfahrungen

06/2017 – 11/2020 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

10/2009 – 07/2016 Studentische Hilfskraft am Studiendekanat der Fakultät für Maschinenbau an der Leibniz Universität Hannover, Unterstützung u. a. bei der Qualitätssicherung von Lehrveranstaltungen, Pflege der Homepage und Organisation und Durchführung von Veranstaltungen

### Absolvierte Praktika

06/2014 – 08/2014 Forschungspraktikum in Neuseeland an der School of Biological Sciences an der University of Auckland  
Forschungsthema: Purification and crystallization of the Cydia Pomonella granulovirus envelope protein: Orf22

02/2013 – 03/2013 Forschungspraktikum in Israel am Department of Plant and Environmental Sciences an der Hebrew University of Jerusalem  
Forschungsthema: A kinetics-based search for drug responsive *E.coli* promoters

## Publikationsliste

### Akzeptierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

Ngoc Linh Phung, Johanna G. Walter, Rebecca Jonczyk, **Lisa K. Seiler** (10%), Thomas Scheper and Cornelia Blume. *Development of an Aptamer-Based Lateral Flow Assay for the Detection of C-Reactive Protein Using Microarray Technologie as a Prescreening Platform*. ACS Comb. Sci. 2020, 22 617-629, doi: 10.1021/acscombsci.0c00080.

**Lisa. K Seiler** (80%), Rebecca Jonczyk, Patrick Lindner, Ngoc Ling Phung, Thomas Scheper, Christine S. Falk, Jessica Kaufeld, Wilfried Gwinner, Irina Scheffner, Lars Pape, Stephan Immenschuh and Cornelia Blume. *A New Lateral Flow Assay to Detect sIL-2R During T-Cell Mediated Rejection After Kidney Transplantation*. *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 2021, doi: 10.1039/d1an01001h

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen in Revision

Rebecca Jonczyk\*, Nils Stanislawski\*, **Lisa Seiler\*** (15%), Holger Blume, Stefanie Heiden, Henning Lucas, Samir Sarikouch, Philipp-Cornelius Pott, Meike Stiesch, Corinna Hauß, Giulietta Saletti, Mariana González-Hernández, Franziska Karola Kaiser, Albert Osterhaus, Guus Rimmelzwa and Cornelia Blume. *Combined prospective seroconversion and PCR data of selected cohorts indicate a high rate of subclinical SARS-CoV-2 infections – an open observational study in Lower Saxony, Germany*. *Microbiology Spectrum*.

### Eingereichte wissenschaftliche Veröffentlichungen

**Lisa K. Seiler\*** (40%), Ngoc Linh Phung\*, Christoph Nikolin, Stephan Immenschuh, Christian Erck, Jessica Kaufeld, Hermann Haller, Christine S. Falk, Rebecca Jonczyk, Julia Siegl, Günter Mayer and Cornelia Blume. *An antibody-aptamer-hybrid lateral flow assay for detection of CXCL9 in antibody-mediated rejection after kidney transplantation*. *Diagnostics*.

### Posterbeiträge

#### American Transplant Congress 2020

**Lisa. K Seiler**, Rebecca Jonczyk, Patrick Lindner, Ling Phung, Thomas Scheper, Christine S. Falk and Cornelia Blume. *Lateral Flow Assay to Detect sCD25 after After Kidney Transplantation*.

#### American Transplant Congress 2021

**Lisa. K Seiler**, Rebecca Jonczyk, Patrick Lindner, Linh Phung, Christine S. Falk and Cornelia Blume. *Development of a Lateral Flow Assay Detecting CXCL9 within Antibody Mediated and Acute T-Cell Mediated Rejections After Kidney Transplantation*.