

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Entwicklung einer neuen Biosensor-Analysenmethode für die Diagnostik des Systemischen Lupus Erythematodes

Alexander Buhl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. apl. Prof. Dr. P. B. Lippa

Die Dissertation wurde am 14.01.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 04.03.2009 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von 03/2005 bis 01/2009 am Institut für Klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar in München. Für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Finanzierung der Arbeit, sowie das mir entgegengebrachte große Vertrauen möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter B. Lippa ausdrücklich danken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Betreuung.

Großer Dank gilt meinen Kollegen, allen voran Herrn Dr. Jochen Metzger, der mich in zahlreiche Techniken eingeführt und mich in vielen Gesprächen auf neue Ideen gebracht hat sowie Frau Anita Schreiegg für die umfassende handwerkliche Hilfe. Frau Dr. Sharon Page danke ich für die Unterstützung bei den Gelshift-Experimenten, Frau Dürmeyer, Frau Miebach und Frau Pfaffenbüchler für die Durchführung des Farr-Assays. Frau Dr. Sonja Cuenca sei gedankt für die Seren der Kontrollgruppen. Herrn Felix Fiegel, der viele Messungen mit dem in dieser Arbeit entstandenen Biosensor-Messverfahren durchgeführt hat, danke ich für seine zuverlässige, gute und sehr selbstständige Arbeit und wünsche ihm viel Erfolg für Medizinstudium und Promotion. Besonderer Dank gilt außerdem Frau Carolin Müller für die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem gemeinsamen Labor.

Dr. Niels Heegaard vom Statens Serum Institut in Kopenhagen hat mir freundlicherweise einige Aliquots Antikörper, Dr. H.-P. Jäkel vom Dietrich Bonhoeffer Klinikum in Neubrandenburg hat mir Seren von SLE-Patienten zur Verfügung gestellt. Hierfür herzlichen Dank.

Bodenlos wäre es, all die aufzuzählen, die mir in den letzten Jahren im privaten Umfeld zur Seite standen. Euch allen danke! Ausdrücklich erwähnt sei lediglich meine Familie, der ich für ihre Unterstützung sowie die mir vermittelte Bodenständigkeit danken möchte, sowie Chrissy für's Korrekturlesen und all ihre Hilfe.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht unter:

Buhl A, Metzger JH, Heegaard NH, von Landenberg P, Fleck M, Luppia PB. Novel biosensor-based analytic device for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies. *Clin Chem* 2007; 53:334-41.

Metzger J, von Landenberg P, Kehrel M, Buhl A, Lackner KJ, Luppia PB. Biosensor analysis of beta2-glycoprotein I-reactive autoantibodies: evidence for isotype-specific binding and differentiation of pathogenic from infection-induced antibodies. *Clin Chem* 2007;53:1137-43.

Thaler M, Buhl A, Welter H, Schreiegg A, Kehrel M, Alber B, et al. Biosensor analyses of serum autoantibodies - application to antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Aug 31. Im Druck.

Buhl A, Page S, Heegaard NH, von Landenberg P, Luppia PB. Optical biosensor-based characterization of anti-double-stranded DNA monoclonal antibodies as possible new standards for laboratory tests. *Biosens Bioelectron* 2009. In Vorbereitung.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen
und die mir angediehene Förderung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Theorie	4
2.1	Systemischer Lupus Erythematoses	4
2.1.1	Krankheitsbild	4
2.1.2	Diagnose	7
2.2	Antikörper gegen DNA	8
2.2.1	Überblick	8
2.2.2	Struktur und Funktion von Antikörpern	9
2.2.3	DNA als Antigen	11
2.2.4	Qualitative Eigenschaften von anti-dsDNA	13
2.2.5	Diagnostische und pathologische Relevanz	15
2.2.6	Zusammenfassung	16
2.3	Stand der anti-dsDNA-Laboranalytik	16
2.3.1	Radioimmunoassay nach Farr	17
2.3.2	<i>Crithidia luciliae</i> Immunfluoreszenz	18
2.3.3	ELISA-Methoden	19
2.3.4	Nicht mehr gebräuchliche Methoden	21
2.3.5	Standardisierung mit Wo/80	21
2.3.6	Zusammenfassung	21
2.4	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Biosensorik	23
2.4.1	Grundlagen der Biosensorik	23
2.4.1.1	Begriffsbestimmung	23
2.4.1.2	Klassifizierung auf Basis des Erkennungselementes	24
2.4.1.3	Klassifizierung auf Basis des Transducers	25
2.4.2	SPR-Biosensoren	26
2.4.2.1	Oberflächenplasmonenresonanz	26
2.4.2.2	Nutzung in Biosensoren	31
2.4.2.3	Aufbau und Funktion des Biacore X SPR-Biosensors	31
2.4.3	Spezielle Auswertung von SPR-Biosensorgrammen	35
2.4.3.1	Extraktion kinetischer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten	35
2.4.3.2	Extraktion thermodynamischer Gleichgewichtskonstanten	36

2.4.3.3	Komplexe Reaktionskinetiken	40
2.4.3.4	Bestimmung der Analytkonzentration	41
3	Ergebnisse und Diskussion	42
3.1	Etablierung der antigenen Oberfläche	42
3.1.1	Biokonjugation	44
3.1.2	Präparation und Ligation antigener dsDNA	51
3.1.3	Immobilisierung auf der Biosensor-Oberfläche	57
3.1.4	Zusammenfassung	59
3.2	Pilotversuche zur Evaluierung der antigenen Oberfläche	60
3.2.1	Antikörperkontrollen & Referenzoberfläche	60
3.2.2	Die gemessene Anbindung wird durch Immunglobuline verursacht	61
3.2.3	Kompetition	63
3.2.4	Messung von Serumproben	66
3.2.5	Wiederholpräzision	70
3.2.6	Zusammenfassung	70
3.3	Charakterisierung monoklonaler Antikörper	71
3.3.1	Messung im Farr-Assay	73
3.3.2	Analyse im Biosensor	74
3.3.3	Analyse mittels Gelretardation	77
3.3.4	Biosensormessungen im kompetitiven Format	83
3.3.5	Zusammenfassung	86
3.4	Messung klinischer Realproben	87
3.4.1	Diskriminierung zwischen SLE-Patienten und Kontrollgruppen .	92
3.4.2	Methodenvergleich	94
3.4.3	Verhalten des Kalibrators	96
4	Zusammenfassung	99
5	Experimenteller Teil	102
5.1	Geräte und Zubehör	102
5.2	Verbrauchsmaterialien	103
5.2.1	Chemikalien, Enzyme & Kits	103
5.2.2	Antikörper und Antiseren	105
5.2.3	Oligonukleotide	105
5.2.4	Patientenproben	106
5.2.4.1	Für Pilotmessungen (Abschnitt 3.2) verwendete Serum-	
	proben	106
5.2.4.2	Für klinische Evaluation (Abschnitt 3.4) verwendete Se-	
	rumproben	107
5.3	Puffer und Lösungen	107

5.4	Methoden	112
5.4.1	Allgemeine Methoden der Biochemie	112
5.4.2	Herstellung von hTf-DNA-Coatingkonjugat	115
5.4.3	Biosensorik	117
5.4.4	Auswertung von Daten	118
6	Abkürzungen	119
7	Anhang	121
	Literaturverzeichnis	141

1 Einleitung und Problemstellung

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine chronische Autoimmunerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis. Die Ätiologie ist nicht abschließend geklärt. Zu genetischen Faktoren, die meist grundlegende Komponenten des Immunsystems, wie den Haupthistokompatibilitätskomplex oder das Komplementsystem betreffen, kommen Umweltfaktoren und hormonelle Risiken. Sowohl die Art der Symptome wie auch ihre Schwere unterscheidet sich von Patient zu Patient und kann sich im Verlauf deutlich ändern (1). Aufgrund dieses schwer zu diagnostizierenden Krankheitsbildes wird der SLE häufig nicht erkannt, was bei dieser potentiell letalen Krankheit fatal sein kann. Als eindrucksvolles Beispiel strahlte der Mitteldeutsche Rundfunk 2006 die Krankheitsgeschichte einer heute 33-jährigen jungen Patientin aus, die trotz eindeutiger Hinweise und zahlreicher Klinikaufenthalte nicht korrekt diagnostiziert, geschweige denn behandelt wurde. Am Ende standen der Verlust beider Beine und eine schwere Nierenschädigung (2).

Um rechtzeitig therapeutisch intervenieren zu können, ist eine frühzeitige korrekte Diagnose, genauso wie eine effiziente Vorhersage von Exazerbationen von essentieller Bedeutung. Zentrales Dokument für die Lupusdiagnostik stellen die 1971 veröffentlichten, 1982 überarbeiteten und 1997 aktualisierten Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) dar (3; 4). Diese enthalten eine Liste von elf Diagnosekriterien, wobei die Präsenz von mindestens vier davon für die Feststellung der Erkrankung ausreichend ist. Hierbei ist es gleichgültig, ob sie simultan oder seriell in jedem beliebigen Zeitintervall auftreten. Während die meisten der angegebenen Merkmale auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen auftreten, kommt manchen aufgrund ihrer hohen Spezifität für den SLE eine besondere Bedeutung zu. So sind „Antikörper gegen native DNA in abnormem Titer“ (Kriterium 10.b) ein entscheidender Stützpfeiler im diagnostischen Prozess und häufig richtungsweisend für weitere Untersuchungen.

Verglichen mit anderen klinisch-chemischen Parametern, wie etwa der Bestimmung von Elektrolyt- oder Proteinkonzentrationen in Körperflüssigkeiten, stellt die Analytik von Autoantikörpern ein Gebiet mit besonderen Eigenheiten und Schwierigkeiten dar. Während es im ersten Fall prinzipiell möglich ist, die Konzentration des entsprechenden Serumanalyten, wie etwa von Kalium oder des Eisentransportproteins Transferrin, eindeutig zu bestimmen, ist man im Falle von Autoantikörpern mit einer a priori wesentlich schwierigeren Situation konfrontiert: hier gilt es, aus dem physiologischen Antikörperrepertoire des Patienten einen Anteil pathologischer Autoantikörper

spezifisch zu detektieren und im besten Fall zu quantifizieren. Da es sich jedoch beim SLE um eine polyklonale Immunantwort handelt, hat man es mit einer heterogenen Gruppe von Antikörpern unterschiedlicher Feinspezifitäten, unterschiedlicher kinetischer Bindungseigenschaften und oft sogar unterschiedlicher Isotypen zu tun, die sich vom physiologischen Anteil lediglich durch ihre Spezifität für bestimmte körpereigene Antigene unterscheiden. Im Falle der anti-dsDNA kommt noch erschwerend hinzu, dass auch das Antigen, doppelsträngige DNA, nicht eindeutig definiert ist, sodass für den Nachweis stark unterschiedliche Präparationen zum Einsatz kommen. Dies führt dazu, dass je nach analytischem Testsystem stark divergente Ergebnisse erhalten werden, die im Lichte des verwendeten Assays und dem Zustand des Patienten interpretiert werden müssen. Die Verwendung unterschiedlicher DNA-Substrate (prokaryotisch oder eukaryotisch, gereinigt oder noch in der Zelle befindlich, markiert oder unmarkiert), unterschiedlicher Reaktions- bzw. Detektionsbedingungen und eine nicht äquivalente Kalibrierung haben Testergebnisse zur Folge, die zu einem gewissen Maße arbiträr sind und nur schlecht miteinander verglichen werden können (5).

Diese bekannte Problematik wird weiterhin dadurch verstärkt, dass bisher keine adäquaten Mittel zur Standardisierung oder Kalibration zur Verfügung stehen. Eine befriedigende Referenzmethode zur Aufklärung absoluter Größen existiert für anti-dsDNA, wie generell für Autoantikörper, zum jetzigen Zeitpunkt nicht. Um zumindest ein gewisses Maß an Zuverlässigkeit zu schaffen, wurde im Jahr 1988 ein internationaler Standard definiert, welcher daraufhin für die Kalibration von anti-dsDNA-Assays herangezogen wurde (6). Diese als Wo/80 bezeichnete WHO Referenzpräparation wurde vom Zentrallabor des Bluttransfusionservice des Niederländischen Roten Kreuzes (heute Sanquin) vertrieben und in der Zwischenzeit ersatzlos aus dem Verkehr genommen. Wo/80 wurde durch Rekalzifizierung von zwei Litern Plasma von einem einzelnen anti-dsDNA positiven Patienten gewonnen. Ein Lyophilisat-Aliquot, entsprechend 500 μ L rekonstituierten Serums, wurde daraufhin als 100 internationale Einheiten anti-dsDNA enthaltend spezifiziert. Selbst wenn man das hohe Alter und die begrenzte Menge von Wo/80 außer Acht ließe, erscheint die Präparation angesichts des polyklonalen Charakters und der unbekanntem Zusammensetzung ungeeignet, die Vergleichbarkeit zwischen den vorhandenen Assays zu erhöhen oder absolute Größen mit ihnen zu ermitteln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, dem vorhandenen Methodenspektrum ein neues, leistungstärkeres Testsystem zur Analyse von anti-dsDNA hinzuzufügen und dessen Eignung als zukünftige Referenzmethode bzw. als Methode zur Charakterisierung neuer geeigneter Standards zu evaluieren. Hierzu sollte ein auf Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) beruhender Biosensor eingesetzt werden, mit welchem die Interaktion zwischen auf einer Oberfläche immobilisierter dsDNA und spezifischen Antikörpern in Echtzeit, markierungsfrei, und unter einheitlichen Bedingungen gemessen werden kann. Da diese Oberflächen im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden, wie z.B. ELISAs, nach entsprechenden Regenerationsschrit-

ten für bis zu mehreren hundert Messungen zur Verfügung stehen sollten, musste ihr Aufbau sehr sorgfältig und unter hohem Aufwand vorgenommen werden. Anschließend sollte das erhaltene System sowohl für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper, welche für einen Einsatz als zuverlässige Kalibratoren in Frage kommen, als auch für Messungen von Patientenproben direkt aus der komplexen Serummatrix verwendet werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf jeder Verbesserung der Vergleichbarkeit bzw. Standardisierung der gemessenen Werte.

2 Theorie

2.1 Systemischer Lupus Erythematos

2.1.1 Krankheitsbild

Der Systemische Lupus Erythematos ist eine äußerst komplexe und schwer zu fassende Autoimmunerkrankung, ein Oberbegriff, der eine ganze Reihe individueller Krankheitszustände umfasst. Manche Autoren gehen sogar soweit, die Bezeichnung SLE könne eine Vielzahl intrinsisch gar nicht miteinander in Beziehung stehender Krankheitsmanifestationen beschreiben (7). Dieses komplexe Bild spiegelt sich sowohl in der Geschichte des SLE als eigenständiges Krankheitsbild als auch in der nach wie vor nicht vollständig aufgeklärten Ätiologie wider. Die Bezeichnung Lupus (lateinisch für Wolf) tauchte erstmals im Mittelalter auf und verweist der gängigen Interpretation zufolge auf die an Biss- oder Kratzspuren eines Wolfes erinnernden typischen kutanen Läsionen im Gesicht (8). Auch der Namenszusatz erythematos (vom griechischen $\eta\rho\acute{\upsilon}\theta\eta\mu\alpha$ für „Röte“, „Entzündung“; im angelsächsischen Sprachraum ist die latinisierte Version erythematosus gebräuchlich) bezieht sich ausschließlich auf kutane Erscheinungsformen und wurde 1851 von dem französischen Dermatologen Alphonse Cazenave etabliert (9). Erst der Wiener Arzt Moritz Kaposi verbindet erstmals viszerale und dermatologische Symptome und weist auf die systemische Natur des SLE hin, der damit kein rein dermatologisches Leiden darstellt (10). Heute wird die Erkrankung aufgrund ihrer multisystemischen Ausprägung oft als die prototypische systemische Autoimmunerkrankung bezeichnet. Im Gegensatz zu organspezifischen Fehlfunktionen des Immunsystems, wie bei der Hashimoto-Thyreoiditis, Diabetes mellitus Typ 1 oder Morbus Basedow, sind hier so grundlegende Mechanismen gestört, dass zahlreiche Organsysteme direkt betroffen sein können, wobei die Ausprägung extrem unterschiedlich und im Verlauf variabel ist (11). Einen Überblick über die große Vielzahl typischer klinischer Manifestationen gibt Tabelle 2.1 (modifiziert nach (12)).

Symptome	% Anteil
Allgemeinsymptome: Leistungsminderung, Unwohlsein, Fieber, Anorexie, Gewichtsverlust	95
Bewegungsapparat	95
Arthralgien/Myalgien	95

Nicht erosive Polyarthritits	60
Handdeformationen	10
Myopathie/Myositis	25/5
Ischämische Knochennekrose	15
<hr/>	
Haut	80
Photosensitivität	70
Wangenerythem	50
Orale Ulzera	40
Alopezie	40
Diskoides Erythem	20
Vaskulitis mit Erythem	20
Anderes (z.B. Urtikaria, subakuter kutaner Lupus)	15
<hr/>	
Blut	85
Anämie (Entzündungsanämie)	70
Leukozytopenie (< 4000/ μ L)	65
Lymphozytopenie (< 1500/ μ L)	50
Thrombozytopenie (< 100.000/ μ L)	15
Lymphadenopathie	15
Splenomegalie	15
Hämolytische Anämie	10
<hr/>	
Nervensystem	60
Kognitive Dysfunktion	50
Psychosen	40
Kopfschmerzen	25
Krampfanfälle	20
Mono- oder Polyneuropathie	15
Schlaganfall, TIA	10
Akute Verwirrtheit oder Bewegungsstörungen	2-5
Aseptische Meningitis, Myelopathie	< 1
<hr/>	
Herz/Lunge	60
Pleuritis, Perikarditis, Ergüsse	30-50
Myokarditis, Endokarditis	10
Lupuspneumonitis	10
Herzkranzgefäßerkrankungen	5
Interstitielle Fibrose	5
Pulmonale Hypertonie, ARDS, Blutung	< 5
<hr/>	
Niere	30-50
Proteinurie > 500 mg/24 h, Harnsediment	30-50
Nephrotisches Syndrom	25

Niereninsuffizienz	40
Magen-Darm-Trakt	40
Unspezifisch (Übelkeit, leichte Schmerzen, Diarrhö)	30
Pathologische Leberenzyme	40
Vaskulitis	5
Thrombosen	15
Venös	10
Arteriell	5
Augen	15
Sicca-Syndrom	15
Konjunktivitis/Episkleritis	10
Vaskulitis	5

Tabelle 2.1: Klinische Manifestationen des SLE und Anteil der Patienten, welche diese im Laufe der Erkrankung entwickeln

Als vermutlich bekanntestes, optisch sichtbares Symptom des SLE sei exemplarisch das „Schmetterlingserythem“ erwähnt, eine photosensitive Rötung im Gesicht, die typischerweise besonders auf Wangen und Nase auftritt, und an die Form eines Schmetterlings erinnert. Dieses Tier wird deshalb oft symbolisch für die Erkrankung gebraucht und ziert zum Beispiel Webauftritte von Selbsthilfegruppen. Aufgrund ihrer Gefährlichkeit kommt daneben den renalen Manifestationen besondere Bedeutung zu. Die Lupusnephritis (diffuse proliferative Glomerulonephritis, DPGN bzw. rapid-progressive Glomerulonephritis) stellt in der ersten Dekade der Erkrankung die häufigste Todesursache dar und führt innerhalb von zwei Jahren obligat zur terminalen Niereninsuffizienz (12). Diese renale Krankheitsmanifestation verläuft unbehandelt letal und stellt sozusagen den „natural course“ der Krankheit dar. Die dabei initial in den Glomeruli ablaufenden pathologischen Veränderungen sind sehr ähnlich auch bei anderen systemischen Autoimmunerkrankungen wie den Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierten Kleingefäß-Vaskulitiden (Wegnersche Granulomatose, Mikroskopische Polyangiitis und Churg-Strauss-Syndrom) festzustellen. Auf eine ausführlichere Beschreibung der vielen potentiellen Krankheitsverläufe und Symptome soll an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet werden.

Der SLE betrifft vor allem junge Frauen, einige ethnische Gruppen, z.B. Menschen afrikanischer oder asiatischer Herkunft, tragen ein höheres Risiko (13; 14), die Prävalenz beträgt etwa eins in 2000 (11).

Die Ätiologie ist nicht vollständig aufgeklärt und vermutlich sehr komplex (15), die für den SLE typische Produktion multipler Autoantikörper wird jedoch häufig durch Defekte verursacht, welche die Schwelle für Überleben und Aktivierung autoreaktiver

B-Zellen erniedrigen (16). Von einer starken genetischen Suszeptibilität ist auszugehen, hier sind vor allem Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes, des Komplementsystems und des Fc γ -Rezeptors zu nennen (17). Daneben scheinen äußere Faktoren wie Infektionen, Umweltschadstoffe (z. B. Pestizide, Schwermetalle und insbesondere Hormone), die Einnahme bestimmter Medikamente und bestimmte Verhaltensweisen (Rauchen, erhöhte UV-Exposition) eine gewisse Rolle zu spielen (18).

Serologisch ist der SLE vor allem durch eine humorale Immunantwort mit Antikörpern gegen zahlreiche körpereigene, v.a. nukleäre Antigene geprägt (19). Diagnostisch wegweisend sind hier in erster Linie jene gegen nukleäre Strukturen (antinukleäre Antikörper, ANA), dsDNA, Nukleosomen, Sm-Antigen (20) und ribosomale P-Proteine.

2.1.2 Diagnose

Die korrekte und frühzeitige Diagnose des SLE ist schwierig und erfahrenen Rheumatologen vorbehalten. Die Zeit zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnose beträgt im Schnitt zwei Jahre (21). Um die diagnostische Sicherheit zu erhöhen und allgemeinverbindliche Regeln zu erreichen, erarbeitete ein Subkommittee der **American Rheumatism Association (ARA)** 1971 erste **Klassifikationskriterien**, welche im Anschluß große Verbreitung erfuhren (22). Diese wurden 1982 gründlich überarbeitet und dabei vor allem um serologische Tests, welche in den ursprünglichen Kriterien noch nicht enthalten waren, erweitert (3). Nach einer erneuten Aktualisierung 1997 (4) stand das Dokument, welches als zentrales Werkzeug für die Diagnose des SLE verstanden werden kann, in seiner heutigen Form zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine Auflistung von elf Manifestationen, von denen mindestens vier in einem beliebigen Zeitraum identifiziert werden müssen, um die Erkrankung mit hoher Sicherheit festzustellen (Tabelle 2.2, modifiziert nach (3; 4)).

Kriterium	Definition
1. Schmetterlingserythem	umschriebene, symmetrische hellrote flache bis leicht erhabene Rötung der Wangen, die über dem Nasenrücken zusammenläuft.
2. Diskoides Erythem	meist rote Plaques mit (follikulären) Hyperkeratosen, Pigmentverschiebungen und Atrophie
3. Photosensitivität	Hautausschlag als Resultat einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonneneinstrahlung
4. Orale Ulzera	Orale oder nasopharyngeale Geschwüre, in der Regel schmerzfrei
5. Arthritis	Nonerosive Arthritis in zwei oder mehr peripheren Gelenken

6. Serositis	a) Pleuritis oder b) Pericarditis
7. Renale Störung	a) Persistente Proteinurie > 0,5 Gramm pro Tag oder größer als 3+ wenn keine Quantifizierung erfolgt oder b) Harnsedimente – Erythrozyten, Hämoglobin, Zylinder oder gemischt
8. Neurologische Störung	a) Anfälle ohne erkennbare Ursache oder b) Psychosen ohne erkennbare Ursache
9. Hämatologische Störung	a) Hämolytische Anämie oder b) Leukopenie oder c) Lymphopenie oder d) Thrombozytopenie
10. Immunologische Störung	a) ENTFÄLLT oder b) Anti-DNA: Antikörper gegen native DNA in abnormem Titer oder c) Autoantikörper gegen das Ribonukleoprotein Sm oder Fund von Antiphospholipid Antikörpern
11. Antinukleäre Antikörper	Abnormer Titer von antinukleären Antikörpern

Tabelle 2.2: Diagnosekriterien des American College of Rheumatology

Obwohl einige der angegebenen Kriterien, wie Arthritis oder antinukleäre Antikörper, nur eine sehr geringe Spezifität für den SLE aufweisen, wird durch die Kombination von vier Befunden eine Spezifität von 96% bei einer Sensitivität von ebenfalls 96% erreicht. Jedoch ist das Auffinden hochspezifischer Kriterien, obwohl allein nicht ausreichend für die Diagnose, wertvoll, um den diagnostischen Prozess in die richtige Richtung zu lenken. Hier spielen Antikörper gegen doppelsträngige DNA eine herausragende Rolle (23; 24).

2.2 Antikörper gegen DNA

2.2.1 Überblick

Zirkulierende Antikörper gegen DNA wurden erstmals 1957, praktisch gleichzeitig, von vier verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (25; 26; 27; 28). Auf Grund ihrer hohen Spezifität für den SLE und ihres frühen Auftretens spielen sie eine große Rolle in der Diagnosefindung der Erkrankung. Einige sind selbst pathogen.

Neun Jahre zuvor war mit der Entdeckung der spezifisch im Knochenmark von SLE-Patienten vorkommenden LE-Zelle durch HARGRAVES et al. der Grundstein für die

SLE-Labordiagnostik gelegt worden (29). Bei der LE-Zelle handelt es sich um neutrophile Granulozyten mit basophilen Einschlußkörperchen, die Kernresten phagozytierter, zerstörter Leukozyten entsprechen (30). Dieses Phänomen, die Alteration des Zellkerns mit nachfolgender Phagozytose von nukleärem Material, ließ sich im Folgenden durch die Inkubation von physiologischen Leukozyten mit Patientenseren hervorrufen (31), was auf einen Serumfaktor zurückgeführt wurde, der später der Gammaglobulinfraktion zugeordnet wurde (32). Folglich handelte es sich um Antikörper mit, wie inzwischen bekannt, Spezifität gegen den DNA-Protein-Komplex Chromatin (33) bzw. reine DNA (34). Im Folgenden war endlich ein Labortest mit hoher Spezifität für SLE vorhanden, der jedoch in Ermangelung einfach durchzuführender Methoden mit hohem Aufwand und schlechter Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien verbunden war. Vor diesem Hintergrund stellte die Entdeckung von Autoantikörpern mit Spezifität gegen DNA eine große Verbesserung dar. Nachdem diese als klinisch relevanter Parameter identifiziert worden waren (35) und sich die Analytik als wesentlich verlässlicher und weniger aufwändig als die des LE-Zellfaktors herausstellte, fand ihre Bestimmung breite Akzeptanz und wurde schließlich 1982 in die offiziellen Kriterien des ACR aufgenommen (3). Bis heute ist die Bestimmung von dsDNA-Autoantikörpern für die Diagnosefindung und Verlaufskontrolle des Systemischen Lupus Erythematoses trotz ihrer noch zu erläuternden Schwächen ein essentieller und weit verbreiteter Test.

2.2.2 Struktur und Funktion von Antikörpern

Antikörper oder Immunglobuline stellen die sezernierte Form der B-Zell-Antigenrezeptoren dar und sind die entscheidenden Effektormoleküle der humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe ist die spezifische Erkennung und Bindung von Antigenen, Teilstrukturen potentiell schädigender Agentien. Einige Noxen, wie bakterielle Toxine, können allein durch diese Bindung neutralisiert werden, während größere Schädlinge, etwa Viren oder Bakterien, durch den Vorgang für eine nachfolgende Phagozytose markiert ("opsoniert") werden. Daneben ist eine Aktivierung des Komplementsystems möglich. Bei korrekter Funktionsweise des Immunsystems unterscheiden Antikörper damit zwischen Selbst und Nicht-Selbst, um das nachfolgende Unschädlichmachen fremder Stoffe zu ermöglichen. Da sich der menschliche Körper mit einer hohen Vielzahl verschiedener Eindringlinge konfrontiert sieht, existiert folgerichtig eine extreme Variabilität zwischen den Immunglobulinen, die die spezifische Erkennung unterschiedlichster Antigene gestattet.

Die molekulare Struktur der Antikörper ist in Abbildung 2.1 exemplarisch am Beispiel eines IgG gezeigt. Ein Immunglobulin vom Isotyp G besteht aus vier Polypeptidketten, jeweils zwei identischen leichten (ca. 25 kDa) und schweren Ketten (ca. 50 kDa), welche über Disulfidbrücken verbunden sind. Die eigentliche Antigenbindungsstelle befindet sich in der variablen Region. Jede der vier beteiligten Domänen verfügt über drei hypervariable Bereiche (*Complementary determining regions, CDR*), durch

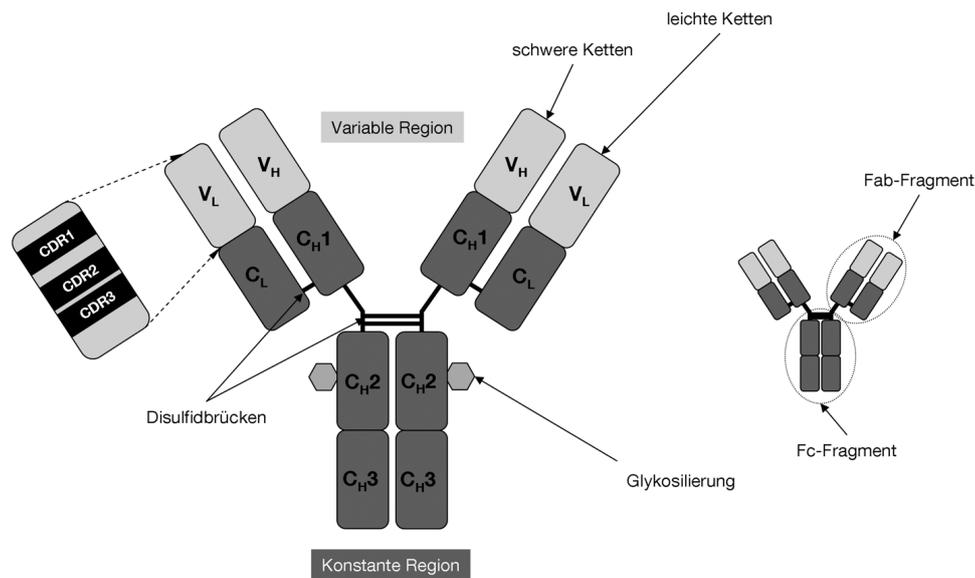


Abbildung 2.1: Struktur eines IgG-Moleküls

welche die hohe Vielzahl der möglichen Antigenpezifitäten verursacht wird. Der für die Antigenbindung verantwortliche Bereich wird dabei als Paratop bezeichnet. Die Effektorfunktion wird über die konstante Region definiert. Anhand dieser lassen sich beim Menschen fünf Hauptklassen, Isotypen, differenzieren: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Diese unterscheiden sich charakteristisch voneinander durch Zahl und Lokalisation der Disulfidbrücken, Glykosilierungsmuster sowie die Gelenkregion zwischen Fc- und Fab-Fragmenten. Dazu kommt, dass IgM in der Regel als Pentamere, IgA als Dimere sezerniert werden und eine entsprechend höhere Masse haben (36).

Produziert werden Immunglobuline von Plasmazellen - ausdifferenzierten B-Lymphozyten. Ein Plasmazellklon sezerniert dabei immer nur Antikörper mit identischen Bindungseigenschaften, sogenannte monoklonale Antikörper. Die typische Immunantwort *in vivo* ist jedoch in der Regel polyklonal, d.h. es existieren mehrere Plasmazellklone, welche Antikörper mit potentiell ähnlicher bis gleicher Spezifität, jedoch ansonsten unterschiedlichen Eigenschaften produzieren. Deren Bindungseigenschaften lassen sich analytisch über die Spezifität bzw. Kreuzreaktivität, sowie die Bindungsstärke (Affinität) beschreiben. Da z.B. IgGs mit beiden Fab-Fragmenten, IgMs mit bis zu zehn gleichzeitig an ihr Antigen binden können, kann es zu kooperativen Effekten kommen. Die beobachtete makroskopische Bindungsstärke ist dabei oft von der für nur ein Paratop definierten mikroskopischen **Affinität** verschieden. In diesem Fall spricht man von der **Avidität** der Bindung. Oft übergangen wird dabei die Tatsache, dass auch die Kinetik der Antigenbindung für diverse Anwendungen relevant sein kann und in die umfassende Charakterisierung von Immunglobulinen integriert werden sollte.

2.2.3 DNA als Antigen

Deoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein aus Deoxyribonucleotiden aufgebautes Polymer. Die Nucleotide ihrerseits bestehen jeweils aus einer der vier organischen Stickstoffbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) oder Thymin (T), dem Kohlenhydrat Deoxyribose in seiner D-Furanose Form, sowie Phosphat (Abb. 2.2).

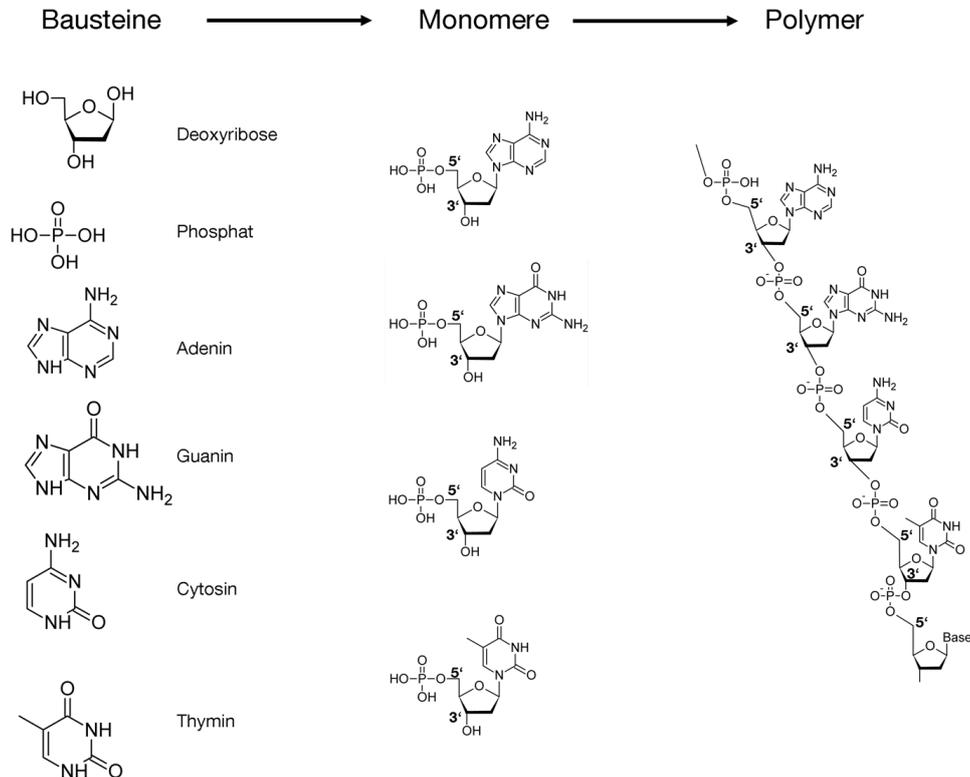


Abbildung 2.2: Molekularer Aufbau der DNA.

Dabei bilden Deoxyribose und Phosphat das Phosphodiester-Rückgrat, nehmen also in erster Linie strukturelle Aufgaben wahr, während die Abfolge der Basen für die genetische Information eines Organismus codiert. Deren Reihenfolge wird dabei in der Regel, auf die C-Atome der Deoxyribose beziehend, in 5'- nach 3'-Richtung angegeben. Da Adenin mit Thymin, sowie Guanin mit Cytosin starke, auf Wasserstoffbrücken beruhende Wechselwirkungen eingeht (in diesem Kontext spricht man von Basenpaarung), kommt es zur Hybridisierung von komplementären gegenläufigen DNA-Strängen (Abb. 2.3), woraufhin man doppelsträngige DNA (dsDNA) erhält, welche konformationell die typische, weitbekannte Doppelhelix ausbildet (37). Dabei befinden sich die gepaarten Basen im Zentrum, während das Phosphodiester-Rückgrat nach außen hin orientiert und damit besser zugänglich ist (38).

Neben der gezeigten rechtsgängigen B-Form existiert unter anderem noch eine kompaktere A- und eine linksgängige Z-Form (39; 40). Diese unterscheiden sich in ihrer geometrischen Struktur deutlich voneinander.

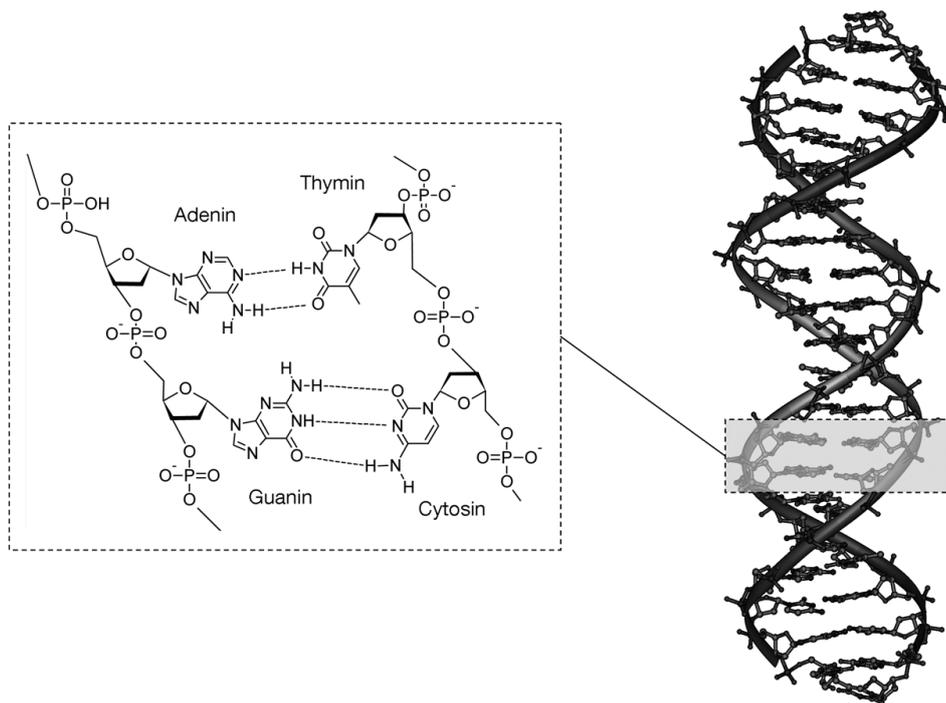


Abbildung 2.3: Basenpaarung führt zur typischen Helixstruktur der DNA.

Damit ergeben sich für dsDNA einige Besonderheiten, welche sie zu einem ungewöhnlichen wie problematischen Antigen machen:

- Innerhalb der Bezeichnung DNA existiert eine extreme Vielzahl verschiedener Makromoleküle. Diese sind potentiell unterschiedlich lang, einzel- oder doppelsträngig, mit verschiedener Basenabfolge (Sequenz) und Konformation.
- Als Epitop, als Bindungsstelle für Antikörper, kommen stark unterschiedliche Substrukturen in Betracht. Diese umfassen die Basen, das negativ geladene Phosphodiester-Rückgrat, sowie erst durch das Einnehmen einer bestimmten Konformation ausgebildete räumliche Strukturen.
- Wird das Epitop von den Basen ausgebildet, so impliziert dies eine mögliche Sequenzspezifität.
- Das Phosphodiester-Rückgrat bildet eine hochrepetitive Struktur. Bei Bindung der Antikörper an das Rückgrat ist eine Sequenzspezifität unwahrscheinlich, jedoch wird auf engstem Raum eine hohe Anzahl von Epitopen zur Verfügung gestellt, was die Bindung an praktisch jeder Stelle des DNA-Stranges, sowie möglicherweise mehrerer Antikörper pro Strang erlaubt.

Zusammenfassend ergibt sich also ein komplexes Bild. Zur Gruppe der anti-DNA bzw. anti-dsDNA gehören Antikörper mit unterschiedlichsten Bindungseigenschaften, das An-

tigen ist primär nicht genau definiert. Grundsätzlich handelt es sich also bei zirkulierenden DNA-Antikörpern um eine polyklonale Mischung von Antikörpern potentiell unterschiedlicher Spezifitäten und Kreuzreaktivitäten, sowie Affinitäten und kinetischen Eigenschaften. Allgemeine Aussagen über ihre Bindungseigenschaften zu treffen ist daher bereits eine gewisse Vereinfachung, allen gemeinsam ist lediglich die Bindung an irgendeine Form von DNA. Eine künstliche Festlegung auf bestimmte DNA-Strukturen scheint zuerst einmal nicht sinnvoll, vielmehr müssten bei einer umfassenden Charakterisierung folgende Fragen beantwortet werden:

1. *Qualität* der Antikörper:
 - a) An welche Feinstruktur binden die gemessenen Antikörper?
 - b) Wie sind ihre kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften?
 - c) Zu welcher Isotyp-Klasse gehören sie?
2. *Quantität* der Antikörper: In welcher Konzentration sind sie im Serum vorhanden?
3. *Klinische* Korrelation: Welche diagnostische sowie pathologische Relevanz ist damit verbunden?

Eine vollständig befriedigende Antwort darauf für jeden einzelnen Patienten zu finden ist kaum realisierbar und im Sinne einer effizienten Vorgehensweise auch nicht sinnvoll. Die verfügbare Literatur lässt sich aber zum überwiegenden Teil in diese Gruppen gliedern: zum einen werden *qualitative* Aspekte wie Feinspezifitäten, Kreuzreaktivitäten oder Bindungsstärken untersucht, wofür sich besonders monoklonale anti-dsDNA, aber auch polyklonale Seren eignen. Diese Arbeiten zielen darauf ab, generelle Eigenschaften bestimmter Subgruppen von anti-dsDNA detailliert und grundlegend zu untersuchen. *Quantitative* Aspekte, also Konzentrations- bzw. Titermessungen sind eher methodisch interessant und werden in Abschnitt 2.3 besprochen. Hier besteht die größte Problematik darin, dass nicht jeder Test jede Subgruppe der Autoantikörper überhaupt erfasst bzw. dass verschiedene Methoden unterschiedlich gewichten. Damit gibt das benutzte Testsystem die Qualität der gemessenen Antikörper in spezifischer, aber häufig unbekannter Art und Weise vor. Zuletzt ist ein ganz entscheidender Punkt der, einen Zusammenhang zwischen der Qualität bzw. Quantität von anti-dsDNA und deren klinischer Relevanz für Diagnose und Monitoring des SLE herzustellen.

2.2.4 Qualitative Eigenschaften von anti-dsDNA

Generell akzeptiert ist die Aussage von ARANA und SELIGMANN, die DNA Antikörper aufgrund ihrer Spezifität in drei Gruppen einteilen: (1) solche, die ausschließlich mit einzelsträngiger DNA reagieren, was auf eine Spezifität für Nukleinsäurebasen, Nucleoside, Nukleotide oder Polynukleotide zurückzuführen ist; (2) solche, die sowohl mit einzel-

wie auch doppelsträngiger DNA reagieren und (3) seltene Antikörper, welche exklusiv dsDNA binden (41). Anti-dsDNA, wie sie aufgrund ihrer Spezifität für SLE in der vorliegenden Arbeit verstanden werden, umfassen die letzteren beiden Gruppen. Auf molekularer Ebene ist diese Spezifität meist mit der Bindung an das negativ geladene Phosphodiester-Rückgrat zu erklären (42). Bereits in frühen Arbeiten wurde erkannt, dass deshalb im Prinzip dsDNA aus unterschiedlichsten Quellen für den Nachweis dieser Autoantikörper verwendet werden kann (43). Dabei gibt es jedoch quantitative Unterschiede, welche auf molekularer Ebene schwierig zu verstehen sind. ANDRZEJEWSKI et al. konnten am Beispiel muriner monoklonaler anti-dsDNA verschiedene Bindungsprofile, also quantitativ unterschiedliche Spezifitäten gegen ss-DNA, ds-DNA oder Oligonukleotide demonstrieren. Diese unterschieden sich nicht nur interindividuell von Maus zu Maus, sondern intraindividuell zwischen den einzelnen mAbs (44; 45).

Was die Entstehung bzw. den genetischen Ursprung von anti-dsDNA angeht, so konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Hypothese, IgM anti-dsDNA seien das Produkt einer unspezifischen B-Zell-Aktivierung, während IgG anti-dsDNA spezifisch auf einen Antigen-Reiz produziert würden, nicht zutrifft. Im Gegenteil kommt es immer zu klonaler Selektion, somatischer Hypermutation sowie zu einem Klassenwechsel von IgM zu anderen Isotypen (46; 47). Hierbei fällt auf, dass einige Variationen in der variablen Region der Antikörper typisch sind, also bestimmte Mutationen gehäuft auftreten (48; 49; 50). MARION et al. konnten zeigen, dass vor allem (positiv geladene) Arginine in der dritten *complementary determining region* (vgl. Abb. 2.1) mit der anti-DNA Spezifität der Antikörper korrelieren. Auch sie fanden eine klonal selektive, Antigen-spezifische Immunantwort (51; 52; 53; 54; 55; 56).

Aus Dissoziationsexperimenten bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken wurde geschlossen, dass die Wechselwirkung zwischen anti-dsDNA und dsDNA hauptsächlich auf ionische Wechselwirkungen zurückzuführen ist (57), ausserdem ist die Bindung abhängig von der Länge der eingesetzten dsDNA-Fragmente (bessere Bindung an längere DNA), was sich jedoch von Serum zu Serum unterscheiden kann (58). SANO et al. fanden eine höhere Affinität zu G+C-reichen Sequenzen und zu methylierter DNA (59).

Daneben sei die Existenz von konformations- (42) sowie sequenz-spezifischen anti-dsDNA erwähnt. Letztere sind nicht mit SLE assoziiert und elektrostatische Interaktionen spielen keine große Rolle für die Wechselwirkung (60). SLE-assozierte anti-dsDNA zeigen außerdem ausgeprägte Kreuzreaktivitäten z.B. gegen das Phospholipid Cardiolipin, Komponenten des Zytoskeletts, Blutplättchen, Ribosomales Protein S1 und α -Actinin (61; 62; 63).

Für die Affinität der bisher untersuchten anti-dsDNA existieren, wie zu erwarten, deutliche Unterschiede. Dies spielt eine Rolle für zwei noch zu erläuternde Aspekte, die Korrelation mit dem klinischen Bild der Erkrankung, sowie den Eigenschaften gebräuchlicher Assays, welche niedrigavide Antikörper zum Teil nicht erfassen. So können

Antikörper mit niedriger Avidität z.B. mit dem PEG-Assay bestimmt werden. Sie sind zwar weniger auf SLE beschränkt als ihre hochaviden Pendanten, jedoch sinnvoll für ein einleitendes Screening. Die Ratio der Messwerte aus zwei Assays, welche entweder nur hochavide (Farr-Assay, siehe Abschnitt 2.3) bzw. auch niedrigavide anti-dsDNA (PEG-Assay) nachweisen, wurde hier als sinnvoll für die Vorhersage von Exazerbationen betrachtet (64; 65; 66). Die Ratio korreliert außerdem mit der Salzlabilität der Immunkomplexe (67). DEVENS weist darauf hin, dass nicht die Affinität der anti-dsDNA entscheidend für ihre Rolle in der SLE Diagnostik sei, sondern die bei weitem komplexere und biologisch relevantere Avidität des ganzen multivalenten Antikörpermoleküls. Dies resultiert in etwa 10^2 bis 10^6 -fach höheren Gleichgewichtskonstanten (68; 69; 70). Auf eine große Rolle kooperativer Effekte deutet auch eine grundlegende Arbeit von AARDEN et al. hin, in der durch partielle Reduktion der Disulfidbrücken von Antikörpermolekülen eine ausgeprägte Alteration des Bindungsverhalten erfolgt (71). Eine exakte Bestimmung der Aviditäten von anti-dsDNA ist jedoch analytisch schwierig, ein früher Vergleich drei verschiedener Ansätze führte zu keinem befriedigenden Ergebnis. (72).

2.2.5 Diagnostische und pathologische Relevanz

Anti-dsDNA sind spezifisch für den SLE und korrelieren mit dem Krankheitsverlauf, sodass sie auch für ein Monitoring geeignet sind (73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 66; 80). Ausserdem sind sie bereits Jahre vor dem Ausbruch der Erkrankung nachweisbar (81). Erwähnenswert ist eine Studie von OKAMURA et al., die eine starke Korrelation zwischen IgG anti-dsDNA und renaler Beteiligung aufdeckt, während für IgM anti-dsDNA oder anti-ssDNA kein Zusammenhang gefunden wurde. Als Besonderheit wurden hier unbehandelte Patienten beobachtet, bei einer Behandlung ist ein Rückgang der anti-dsDNA möglich (82). Die besondere Bedeutung von Autoantikörpern des IgG Isotyps wurde mehrfach bestätigt (83; 84; 43; 73), v.a. für die Vorhersage einer renalen Beteiligung sind diese wertvoll (85). Dagegen korreliert IgM nicht gut mit dem Krankheitsverlauf (86; 87; 88). Spätere Arbeiten zeigen eine negative Korrelation von IgM anti-dsDNA mit der gefürchteten Glomerulonephritis (89; 90), andere eine Korrelation mit kutanen Erscheinungsformen (91). Auch für IgA anti-dsDNA wurde eine Assoziation mit bestimmten Manifestationen, v.a. Vaskulitis gefunden (92).

Wie bereits erwähnt, ist neben dem Isotyp auch die Avidität der Antikörper von Bedeutung. Hochavide Antikörper sind demnach mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf, insbesondere mit Glomerulonephritis assoziiert (93; 94; 95; 96; 97).

Einige, aber nicht alle anti-dsDNA sind darüberhinaus selbst pathogen. So konnten etwa in wegweisenden Arbeiten von KOFFLER et al. anti-dsDNA aus den Nieren verstorbener SLE-Patienten mit Glomerulonephritis eluiert werden (98; 99; 100). Bei der Injektion von aufgereinigten anti-dsDNA in Mäuse kommt es zu einer Anreicherung einiger Subpopulationen in den Glomeruli (101). Einige murine monoklonale anti-dsDNA

rufen bei passivem Transfer in gesunde Mäuse Glomerulonephritis hervor (102). Allerdings wurden in Myelom-Patienten bereits hohe Mengen anti-dsDNA nachgewiesen, ohne dass diese einen Lupus entwickelten (103). Für die pathogene Aktivität werden im wesentlichen drei Mechanismen diskutiert. Zum einen bilden DNA-Autoantikörper *in vivo* Immunkomplexe (35), welche nach Ablagerung in den Glomeruli Komplement fixieren können (104). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Komplementfixation auch nach einer direkten Bindung von Strukturen der Niere ausgelöst wird (105; 106; 107; 104). Daneben kann es zu einer Penetration in lebende Epithelzellen von Tubuli mit deren anschließender Schädigung kommen (104). Die Gabe des immunsuppressiven Glucocorticoids Prednison bei Anstieg des anti-dsDNA Titers ist in der Lage, Exazerbationen zu einem gewissen Grad zu verhindern (108).

Eine molekulare Analyse pathogener IgGs offenbart charakteristische Mutationen in der variablen Region. Hier sind vor allem basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin in den CDRs von Bedeutung, was sich mit dem oben zitierten Fund kationischer IgGs deckt. Desweiteren deutet eine Kreuzreaktivität mit α -Actinin auf eine gewisse pathologische Relevanz hin (50).

HAUGBRO et al. weisen schließlich auf das große diagnostische Dilemma hin, dass die Aussagekraft der anti-dsDNA-Detektion vom jeweils verwendeten Assay abhängt. Zu wenige Studien würden sich mit der eigentlichen Frage beschäftigen, ob eine Korrelation mit Bindungsmustern, Avidität, molekularer Spezifität oder einfach nur Titern besteht. Ginge man davon aus, dass nur Subpopulationen von anti-dsDNA für den SLE spezifisch sind, wäre die Messung von "Antikörpern gegen native DNA in abnormem Titer", wie in den ACR-Kriterien verlangt, nicht ausreichend (109).

2.2.6 Zusammenfassung

Antikörper gegen doppelsträngige DNA kommen mit hoher Spezifität im Serum von SLE-Patienten vor. Auf eine renale Beteiligung - die Glomerulonephritis stellt eine gefürchtete Komplikation dar - deutet vor allem hohe Avidität sowie der Isotyp G hin. Subpopulationen, vor allem wieder hochavide IgG Antikörper, sind selbst pathogen. Die Bestimmung von anti-dsDNA ist damit sowohl für die Diagnose als auch für die Verlaufskontrolle der Erkrankung von großer Bedeutung.

2.3 Stand der anti-dsDNA-Laboranalytik

Um die Sinnhaftigkeit und das Ziel der vorliegenden Arbeit zu verstehen, ist ein vertiefter Einblick in die aktuelle Situation der anti-dsDNA-Laboranalytik wichtig. Grundsätzlich ist darauf hinzuweisen, dass das Feld der Labordiagnostik von Autoimmunerkrankungen nur schlecht mit anderen analytischen Situationen vergleichbar ist. Ist man etwa am Anteil der Verunreinigungen in einem Pharmakon, an Pestizidrückständen in einem Gewässer (110; 111) oder am Allergengehalt von Lebensmitteln interessiert (112),

so kommt es darauf an, den betreffenden Analyten auch aus komplexen Matrices (Arzneiform, Gewässer, Lebensmittel) spezifisch und mit hoher Sensitivität zu quantifizieren. Im Vergleich dazu ist die Ausgangslage bei der Analytik von Autoantikörpern gegen dsDNA wesentlich komplexer. Den "einen" anti-dsDNA Antikörper gibt es nicht, jedes denkbare Immunglobulin, welches - und sei es auch nur schwach - an dsDNA bindet, gehört zu dieser Gruppe. Dazu kommt das Problem, dass man bei der Untersuchung von Patientenproben nicht nur inter-, sondern auch intraindividuell mit einer enormen Vielfalt relevanter Analyten konfrontiert ist. Außerdem befindet sich jeder anti-dsDNA in Gesellschaft zahlreicher Antikörper mit anderen, irrelevanten Spezifitäten.

Jeder Assay zum Nachweis von Autoantikörpern ist damit in gewisser Weise eine Art funktioneller Assay: relevante Immunglobuline werden von irrelevanten ausschließlich aufgrund einer ihrer Funktionen - der Bindung an ihr Antigen - unterschieden. Genau daraus folgt ein großes Problem: die im polyklonalen Serum vorhandenen monoklonalen anti-dsDNA unterscheiden sich potentiell nicht nur in ihrer jeweiligen Konzentration, sondern auch was ihre Kreuzreaktivitäten und Affinitäten angeht, also gerade in ihrer Funktionalität. Das Ergebnis eines Assays ist damit ganz empfindlich von den genauen Eigenschaften desselben abhängig. Historisch bedeutende und aktuell gängige Tests sollen deshalb an dieser Stelle kurz rekapituliert werden.

2.3.1 Radioimmunoassay nach Farr

Der nach Richard Farr benannte RIA geht auf ein Verfahren zur Quantifizierung der Wechselwirkung von ^{131}I -markiertem BSA mit spezifischen Antisera zurück (113). Bis dahin übliche Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Antikörpern maßen in der Regel sekundäre Effekte, wie Komplementfixation, Präzipitation oder Hämolyse, welche nach der Formation von Immunkomplexen nur in einem Teil der Fälle auftreten, und damit keine Information über den Gesamtgehalt an Antikörpern liefern (114). Im Gegensatz dazu liefert der Farr-Assay ein direktes Maß für die Antigen-Bindungskapazität. Technisch beruht er auf der Tatsache, dass BSA-anti-BSA Immunkomplexe in einer zu 50% gesättigten Ammoniumsulfatlösung unlöslich sind, nicht jedoch freies BSA. Dies gilt im Gegensatz zur spontanen Immunpräzipitation auch im Überschuss von Antigen.

Die Methode wurde 1968 für die Verwendung mit ^3H - (später ^{125}I)-dsDNA adaptiert (115) und im Folgenden ausgiebig untersucht. Sensitivität und Spezifität für die Bestimmung von anti-dsDNA hängen dabei entscheidend von pH-Wert und Ionenstärke während der Immunkomplex-Formation ab. Werden die Reaktionsbedingungen falsch gewählt, so wird eine nicht auf anti-dsDNA beruhende Reaktivität von Kontrollseren gesunder Spender beobachtet (116). Ebenfalls großen Einfluss auf das gemessene Ergebnis haben Größe und Reinheit des als Antigen benutzten DNA-Substrats (117), durch Radioaktivität verursachte Strangtrennung führt potentiell zu einer Kontamination mit ssDNA (5). Unter idealen Bedingungen ist die Bindung eines einzelnen IgG Moleküls pro

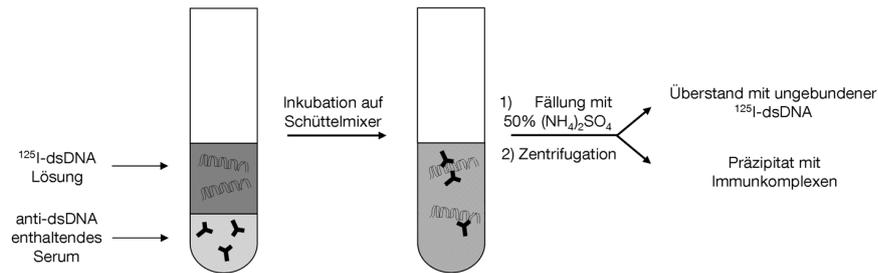


Abbildung 2.4: Funktionsprinzip des Farr-Assay: Immunkomplexe aus dsDNA und in Serum enthaltenen dsDNA-Antikörpern werden mit 50% Ammoniumsulfat präzipitiert und nach Zentrifugation durch Messung der im Präzipitat enthaltenen Radioaktivität quantifiziert.

DNA Molekül (eingesetzt wurde hier DNA des Bakteriophagen PM2 mit einer Masse von etwa $5,9 \times 10^6$ Da) bereits ausreichend für die Ammoniumsulfat-Präzipitation (118). Als problematisch gilt die hohe Ionenstärke, welche zu einer Dissoziation von niedrig aviden DNA-anti-DNA Komplexen führen kann (119). Auch wenn darüber eine gewisse Kontroverse existiert (so zeigen etwa RUBIN et al., dass niedrig avide Komplexe gerade nicht selektiv durch Ammoniumsulfat dissoziiert werden (120)), gilt der Farr-Assay daher gemeinhin als auf die Detektion hochavidere anti-dsDNA beschränkt. Er ist damit die restriktivste und auch spezifischste der routinemäßig verwendeten Bestimmungsmethoden (121) und wird aufgrund seiner hohen Spezifität häufig als Goldstandard für die anti-dsDNA Bestimmung bezeichnet (122). Zudem ist ein Anstieg des gemessenen anti-dsDNA Wertes prädiktiv für Exazerbationen (75).

2.3.2 *Crithidia luciliae* Immunfluoreszenz

Bereits in der Frühzeit der anti-dsDNA Laboranalytik entstand die Idee, die verbreitete Technik der indirekten Immunfluoreszenz auszunutzen, wobei unter Verwendung von Leukozyten als Substrat auf anti-dsDNA hindeutende Fluoreszenz-Pattern identifiziert werden konnten (123). Um die mangelhafte Spezifität dieser Methode zu verbessern, wurde 1975 von AARDEN et al. der Hämoflagellat *Crithidia luciliae* als Substrat für die IF vorgeschlagen (124). Dieser eukaryotische Einzeller verfügt über ein einziges großes Mitochondrium, in dem sich der Kinetoplast befindet, ein großes Netzwerk mitochondrialer DNA, welche praktisch nicht mit anderen nukleären Antigenen assoziiert ist (125). Darüberhinaus ist *C. luciliae* nicht humanpathogen und relativ leicht zu kultivieren. Zur Durchführung wird *C. luciliae* auf Objektträgern fixiert und mit Patientenserum in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Antikörper werden mit einem FITC-markierten anti-human-Ig Serum angefärbt und mikroskopisch identifiziert (Abb. 2.5). Messergebnis ist der Grenztiter, also die höchste als positiv bewertete Verdünnung der ursprünglichen Probe. Eine echte Quantifizierung wird damit nicht er-

möglichst, im Gegensatz zum Farr-Assay kann jedoch durch Wahl geeigneter Antiseren problemlos zwischen den verschiedenen Isotypen differenziert werden.

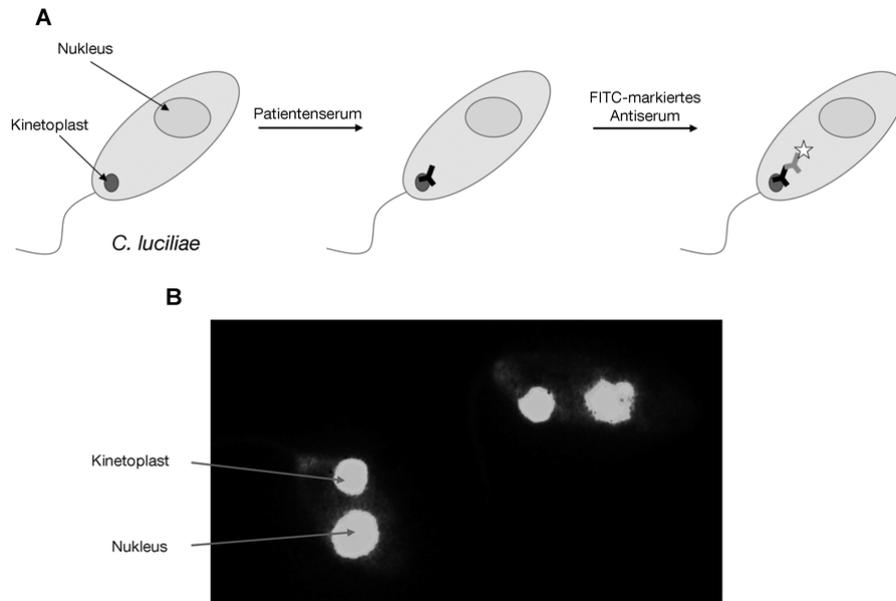


Abbildung 2.5: A. Prinzip der *Crithidia luciliae* Immunfluoreszenz. B. Positiver Befund: entscheidend ist die Anfärbung des Kinetoplasten, der aufgrund seiner Lage nahe der Geißel identifiziert werden kann (hier schlecht sichtbar). Aufgrund der Abwesenheit anderer nukleärer Antigene ist die Färbung des Kinetoplasten spezifisch für anti-dsDNA, während die Färbung des Nukleus nicht ausreicht.

BALLOU et al. fanden im Folgenden eine gute diagnostische Spezifität der CLIF für SLE, darüberhinaus folgten die Titer dem Krankheitsverlauf und ermöglichten eine Vorhersage von Exazerbationen (73). Der Vergleich mit dem Farr-Assay unter Verwendung einer sehr hohen Probenzahl förderte jedoch hohe Differenzen zwischen den beiden Methoden zu Tage; mit der CLIF wurden etwa dreimal so viele Seren als anti-dsDNA positiv bewertet (126). Dies wird darauf zurückgeführt, dass im Gegensatz zum Farr-Assay zusätzlich Antikörper niedriger Affinität erfasst werden können (73; 119; 127; 121). Zu kritisieren ist der hohe Arbeitsaufwand und die fehlende echte Quantifizierbarkeit, zudem ist eine gewisse Erfahrung für die Durchführung und Auswertung des Tests vonnöten, sodass die Ergebnisse immer subjektiv gefärbt sind. Einen Ausweg aus diesem Dilemma könnte die Computer-gestützte Auswertung liefern, die jedoch in der klinischen Praxis noch nicht gebräuchlich ist (128).

2.3.3 ELISA-Methoden

In der labormedizinischen Praxis zeigen ELISAs, was ihre grundsätzliche Praktikabilität angeht, einige klare Vorteile gegenüber den anderen Methoden. Die relativ einfache

Durchführung und Auswertung, der Verzicht auf Radioaktivität, ihre hohe Sensitivität, die gute Quantifizierbarkeit und die Möglichkeit, ohne hohen Mehraufwand mit mehreren Replikaten zu arbeiten, sind als vorteilhaft zu bewerten. Es sind daher eine ganze Reihe von Systemen auf dem Markt, die sich zum Teil stark unterscheiden (Tab. 2.3).

Name	Hersteller	Isotypspezifität	Antigen
Anti-dsDNA IgG	Orgentec, Mainz	IgG	rekombinante dsDNA
Anti-dsDNA IgM	Orgentec, Mainz	IgM	rekombinante dsDNA
Anti-dsDNA IgA	Orgentec, Mainz	IgA	rekombinante dsDNA
Anti-dsDNA Screen	Orgentec, Mainz	IgG/M/A	rekombinante dsDNA
AESKULISA dsDNA-G	Aesku, Wendelsheim	IgG	rekombinante dsDNA
AESKULISA dsDNA-M	Aesku, Wendelsheim	IgM	rekombinante dsDNA
AESKULISA dsDNA-A	Aesku, Wendelsheim	IgA	rekombinante dsDNA
AESKULISA dsDNA-Check	Aesku, Wendelsheim	IgG/M/A	rekombinante dsDNA
Bindazyme	The Binding Site, Schwetzingen	IgG	Kalbsthymus dsDNA
Farrzyme	The Binding Site, Schwetzingen	IgG	Kalbsthymus dsDNA
Anti-dsDNA	Generic Assays, Dahlewitz	IgG	keine Angabe
Varelisa dsDNA Antibodies	Phadia, Freiburg	IgG	rekombinante Plasmid-DNA
ELiA Phadia	Phadia, Freiburg	IgG	rekombinante Plasmid-DNA

Tabelle 2.3: Übersicht einiger kommerziell erhältlicher anti-dsDNA-ELISAs.

Dazu kommen weitere kommerzielle und nicht kommerzielle ELISAs, auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll (129; 130; 131; 132; 133). Während bisher davon ausgegangen wurde, dass mit ELISAs auch Antikörper sehr niedriger Affinität, und damit insgesamt die größte Subpopulation von anti-dsDNA detektiert werden kann (127), ist dies mit neuen Methoden nicht mehr der Fall. Da die Detektion niedrigaffiner Antikörper zwar zu einer guten diagnostischen Sensitivität, allerdings auch zu einer schlechten diagnostischen Spezifität führt, wurden Tests entwickelt, welche wieder gezielt nur hochaffine Antikörper detektieren. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der Farrzyme (Tab. 2.3), welcher in einem aktuellen Assayvergleich seine Eignung für die Diagnostik bewies (134).

2.3.4 Nicht mehr gebräuchliche Methoden

Eine Reihe von anti-dsDNA Testsystemen hat nur noch historische Bedeutung und ist, zumindest was die Routinediagnostik angeht, nicht mehr in Gebrauch.

So wurde gerade in der Anfangszeit der anti-dsDNA Bestimmung die relativ insensitive Immunpräzipitation, also die Ausfällung von Immunkomplexen, häufig angewendet (135; 41). Hierunter fallen auch Techniken wie die zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony (136; 137; 35; 98) oder die sensitivere Gegenstrom-Immunelektrophorese (138). Weitere für die anti-dsDNA Bestimmung eingesetzte Methoden, welche auf die Messung sekundärer Effekte abzielen, sind Hämagglutination (98) und quantitative Komplementfixation (139; 41).

Eine Variante des Farr-Assays ist der PEG-Assay (140). Dieser funktioniert nach dem gleichen Prinzip, jedoch wird statt Ammoniumsulfat PEG für die Präzipitation der Immunkomplexe eingesetzt, was auch die Detektion von anti-dsDNA mit niedrigerer Affinität ermöglicht.

2.3.5 Standardisierung mit Wo/80

Um die diagnostische Sicherheit und die Vergleichbarkeit zwischen den bis dato gebräuchlichen anti-dsDNA-Bestimmungsmethoden zu erhöhen, wurde 1988 von FELTKAMP et al. der erste internationale Standard für Antikörper gegen dsDNA etabliert (6; 141). Dafür wurden zwei Liter Plasma eines einzelnen SLE Patienten (Wo) rekalkifiziert und nach Ablauf der Gerinnung zentrifugiert. Das resultierende Serum wurde in 1800 Vials aliquotiert und lyophilisiert, jedes Vial enthielt dann per Definition 100 IU anti-dsDNA und war für die Rekonstitution zu einem Volumen von 500 µl gedacht. Wo/80 wurde mit dem Farr-Assay sowie der CLIF in ihrer damals üblichen Form getestet, wobei relativ konsistente Ergebnisse erhalten wurden. Desweiteren wurde Wo/80 sowohl auf die Abwesenheit weiterer Autoantikörper sowie auf Stabilität geprüft, wobei der längste Zeitraum für die Stabilitätstestung lediglich zwei Jahre betrug. Der Standard war daraufhin als biologische Referenzpräparation der WHO verfügbar und wurde vom Zentrallabor des Niederländischen Roten Kreuzes vertrieben. Praktisch alle kommerziellen Assays wurden in der Folgezeit gegen Wo/80 kalibriert. Um das Problem der ganz offensichtlich limitierten Menge zu umgehen, schlugen FELTKAMP et al. die Etablierung nationaler, regionaler und lokaler Standards vor.

Wo/80 wurde in der Zwischenzeit ohne jeden Ersatz zurückgezogen (142).

2.3.6 Zusammenfassung

Die großen Unterschiede zwischen vorhandenen Assays und die damit verbundene mangelhafte Vergleichbarkeit (131; 130; 134; 109) erschwert es dem Kliniker, die erhaltenen Laborwerte richtig einzuordnen und gegebenenfalls geeignete Konsequenzen, wie eine

	Farr RIA	CLIF	diverse ELISAs	SPR-Biosensor
Detektierter Isotyp	alle Isotypen	meist nur IgG	meist nur IgG	a priori alle Isotypen
DNA Substrat	radioaktiv markierte dsDNA	<i>Crithidia luciliae</i> Kinetoplast	div. eukaryotische und prokaryotische Quellen	rekombinant human
Affinität	+++	++	+ bis +++	a priori +

Tabelle 2.4: Vergleich gebräuchlicher anti-dsDNA Labortests und des vorgestellten SPR-Biosensors hinsichtlich ihrer Eigenschaften

medikamentöse Behandlung des Patienten, zu ergreifen. EGNER (5) nennt hier folgende Ursachen:

1. Unterschiedliche Substrate: da keinerlei regulative Festlegung auf die Art und Quelle der zu verwendenden antigenen dsDNA existiert, kommen von PCR-Produkten über Plasmide und Säugetier-DNA bis hin zu ganzen Zellen die unterschiedlichsten Präparationen zum Einsatz, die nicht zwingend die gleiche Gruppe von Antikörpern binden.
2. Detektierter Isotyp: verschiedene Assays detektieren je nach Aufbau verschiedene Isotypen (IgG, IgA, IgM, bzw. Kombinationen hiervon). Alle drei sind jedoch potentiell vorhanden und besitzen eine unterschiedliche klinische Relevanz (92; 90; 91; 89; 87; 84).
3. Affinität der Antikörper: die Affinität hat ebenfalls einen starken Einfluss darauf, ob Antikörper von einem gegebenen Test detektiert werden oder nicht. Während z.B. einige ELISAs Subgruppen niedriger Affinität sehr wohl erfassen, tragen diese bei anderen Methoden nicht zum Messwert bei. Dazu kommt, dass hochaffine anti-dsDNA möglicherweise über ein höheres pathogenes Potential verfügen.
4. Assay-spezifische Probleme: falsch positive Ergebnisse können z.B. durch Verunreinigungen des Substrats mit ssDNA und Histonen oder durch Antikörper gegen eingesetzte chemische Crosslinker verursacht werden.
5. Problematische bzw. fehlende Standardisierung und Kalibration.

Es bleibt für die Praxis festzuhalten, dass mit jedem Assay andere Subgruppen von anti-dsDNA detektiert und unterschiedlich gewichtet werden. Tabelle 2.4 zeigt eine knappe Darstellung der wichtigsten Differenzen zwischen den gebräuchlichsten Methoden und dem hier vorgestellten SPR-Biosensor (modifiziert nach (5; 104; 109)).

Resultat dieser Situation ist die Praxis, mit mehreren Assays zu arbeiten und diese je nach Fragestellung für z.B. Erstdiagnose, Verlaufskontrolle oder Vorhersage von Exazerbationen, einzusetzen (122; 143; 144).

2.4 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Biosensorik

2.4.1 Grundlagen der Biosensorik

2.4.1.1 Begriffsbestimmung

”Ein Sensor wandelt [...] [eine] zu messende physikalische Größe und ihre Änderung in elektrische Größen und deren Änderungen um, die elektronisch weiterverarbeitet oder übertragen werden können” (145).

Ein *chemischer* Sensor ist dabei laut WOLFBEIS ein ”Gerät, welches in der Lage ist, einen physikalischen Parameter oder die Konzentration einer chemischen oder biochemischen Spezies kontinuierlich und reversibel zu messen” (146), während NIESSNER ihn als kleinen Meßwertaufnehmer zur Umsetzung von Stoffkonzentrationen in elektrische oder optische Signale definiert (147).

Auch für den Begriff des *Biosensors* existiert eine ganze Reihe von im Wortlaut verschiedenen Definitionen (148; 149; 150), die sich jedoch in ihrer Quintessenz kaum unterscheiden. Am elegantesten formuliert es meiner Einschätzung nach SETHI, der den Biosensor als ”ein Gerät, welches biologische Aktivität in ein quantifizierbares Signal wandelt” definiert. Der Biosensor ist damit ein Spezialfall des chemischen Sensors, bei dem die zu messende Größe von biologischer Aktivität verursacht wird. Dafür sind immer drei Schlüsselmodule nötig (Abb. 2.6): zum einen ein Erkennungselement, welches mit einer biologischen Komponente möglichst spezifisch interagieren kann, wodurch eine physikalische Änderung hervorgerufen wird. Diese Änderung wird durch den in unmittelbarer Nähe befindlichen Transducer möglichst sensitiv in ein quantifizierbares Signal umgewandelt, welches vom nachgeschalteten Prozessor entsprechend den Anforderungen des Nutzers weiterverarbeitet wird.

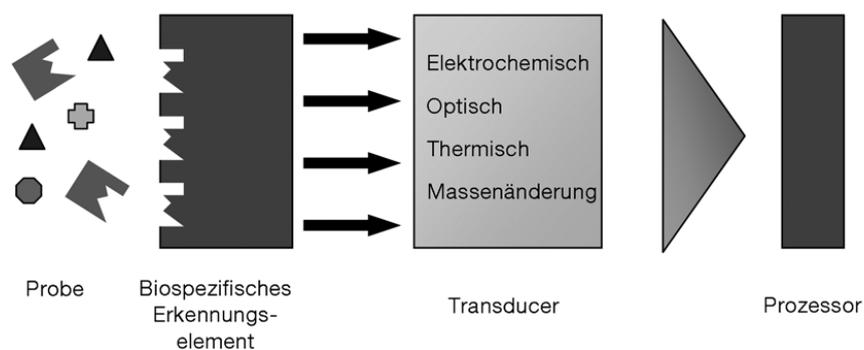


Abbildung 2.6: Generelles Funktionsprinzip eines Biosensors

Art des Erkennungselements	Erkennungselement	Analyt	Referenz
Enzym	Glucoseoxidase	Glucose	(153)
Enzymsubstrat	<i>p</i> -Nitrophenyl-tri- <i>N</i> -acetyl- β -chitotriosid	Lysozym	(154)
Antikörper	spezifische Antikörper	diverse Pestizide	(155)
Antigen	4-Chloro-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)capronsäure	Atrazin	(156)
Nukleinsäuren	PNA	PCR amplifiziert, denaturierte dsDNA	(157)
	ssODN	ssODN	(158)
	ssODN	HIV-1 abgeleitete DNA-Sequenz	(159)
ganze Zellen	<i>Chlorella vulgaris</i>	Herbizide	(160)
Rezeptorliganden	Dihydrotestosteronderivate	Sexualhormonbindendes Globulin	(161)
biomimetische Rezeptoren	Molekular geprägtes Polymer (<i>Molecularly imprinted polymer</i> , MIP)	Morphin	(162)

Tabelle 2.5: Beispiele zur Einteilung von Biosensoren anhand deren Erkennungselementen

2.4.1.2 Klassifizierung auf Basis des Erkennungselementes

Eine Klassifizierung der Biosensoren kann sinnvollerweise entweder durch die Art des Erkennungselementes oder des Transducers erfolgen. Als Erkennungselemente, im Fall der Biosensoren häufig als Biorezeptoren bezeichnet, kommen zahlreiche unterschiedliche Biomoleküle in Betracht. Für eine grobe Einteilung können fünf Gruppen definiert werden: Enzymsysteme, Antikörper/Antigen, Nukleinsäuren, zelluläre Strukturen/ganze Zellen und biomimetische Materialien (synthetische Rezeptoren) (151). Tabelle 2.5 zeigt eine exemplarische Übersicht über einige veröffentlichte Anwendungen. Allgemein werden Biosensoren vor allem zur Nahrungsmittel- und Umweltanalytik, klinischen Diagnostik, sowie zur Prozessüberwachung eingesetzt. Ein weiteres zukunftsweisendes Einsatzgebiet ist das High-Throughput Screening von Substanzbibliotheken zur Suche neuer Pharmaka (152).

Von einem *Immunosensor* spricht man üblicherweise dann, wenn Antikörper oder Fragmente hiervon als Erkennungselement fungieren (150; 163). Dieser Aufbau ist extrem variabel, da mit der von KÖHLER und MILSTEIN entwickelten Hybridomatechnik, für die sie 1984 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden, monoklonale Antikörper gegen so gut wie jedes denkbare Antigen produziert werden können (164). Setzt man sie als Biorezeptor ein, kann so mit einem gleichbleibenden Arbeitsablauf eine extrem hohe Zahl unterschiedlicher Biosensor-Spezifitäten realisiert werden.

Im Sinne dieser Arbeit soll der Begriff des Immunosensors jedoch in Übereinstimmung mit MORGAN et al. etwas weiter gefasst werden (165). Es kann immer dann von einem Immunosensor gesprochen werden, wenn die gemessene biologische Aktivität auf spezifische Antikörper/Antigen-Interaktionen zurückgeführt werden kann. Dies bedeutet, dass auch das Antigen als Erkennungselement für die Messung der Antikörperaktivität eingesetzt werden kann. Der in dieser Arbeit vorgestellte anti-dsDNA-Biosensor, der auf diesem Prinzip beruht (Abb. 2.7), wird damit ebenfalls in die Kategorie der Immunosensoren eingeordnet, auch wenn in der Praxis die Nutzung von Antikörpern als Biorezeptoren klar überwiegt.

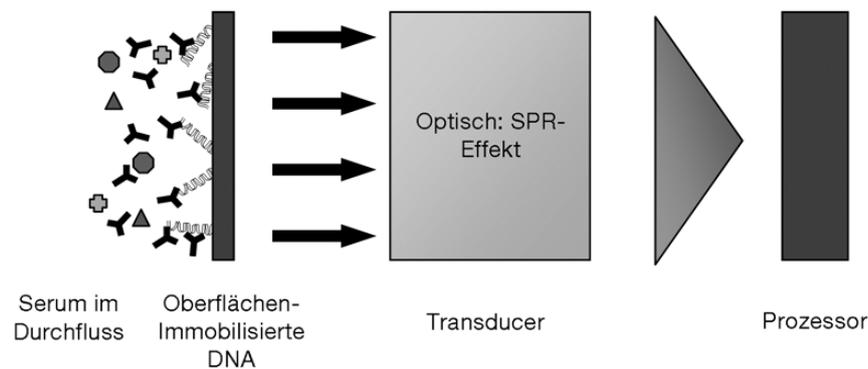


Abbildung 2.7: Funktionsprinzip des geplanten anti-dsDNA Biosensors

Nichtsdestoweniger ist dieses Messprinzip für medizinische Routineanwendungen interessant, wie z.B. in der vorgestellten Arbeit zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von Autoimmunerkrankungen. Daneben ist unter anderem eine Nutzung zur Identifizierung von IgE-Allergenspezifitäten bei allergischen Reaktionen vom Typ I denkbar (166; 167), sowie im Bereich der Infektionsserologie zur Bestimmung von Impftitern oder zur Diagnose von Infektionen (168).

2.4.1.3 Klassifizierung auf Basis des Transducers

Während der Biorezeptor für die Interaktion mit der zu analysierenden biologischen Komponente und damit für die Spezifität der Messung hauptverantwortlich ist, hat der Transducer, oder Signalwandler, die Aufgabe, diese biologische Aktivität in ein quantifizierbares und prozessierbares, häufig elektrisches Signal umzuwandeln (169). Dabei ist die Sensitivität des gesamten Messsystems maßgeblich, wenn auch nicht ausschließlich, von der Wahl eines geeigneten Transducers abhängig. Nicht jeder Biorezeptor kann mit jedem Transducer beliebig kombiniert werden, so setzen beispielsweise elektrochemische Transducer eine elektrochemische Aktivität voraus, welche beispielsweise bei Antikörper/Antigen Interaktionen primär nicht gegeben, und eher für enzymatische Reaktionen geeignet ist. Andere Transducer erfordern den Gebrauch eines Fluoreszenz-

oder Enzym-Labels. Eine Auflistung einiger gebräuchlicher Systeme und deren typische Applikationen zeigt Tab. 2.6.

Transducer-System	Messung	Messgröße	Typische Anwendung
Elektrochemisch	Potentiometrie	Potential	Enzymkatalysierte Reaktionen (170)
	Amperometrie	Stromstärke	Enzymkatalysierte Reaktionen (171)
	Konduktometrie	elektrischer Leitwert	Enzymkatalysierte Reaktionen (172)
Optisch	Oberflächenplasmonenresonanz	Brechungsindex	immunologische Interaktionen (173)
	<i>Total internal reflection fluorescence (TIRF)</i>	Fluoreszenz	immunologische Interaktionen (174)
	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)	optische Schichtdicke	ganze Zellen (175)
Mikrogravimetrisch - Piezoelektrisch	<i>Quartz Crystal Microbalance (QCM)</i>	Resonanzfrequenz	immunologische Interaktionen (176)
	<i>Surface Acoustic Wave (SAW)</i>	Phase und Amplitude akustischer Oberflächenwellen	immunologische Interaktionen (177)
Thermometrisch	Thermistor	Temperatur	Enzymaktivität (178)

Tabelle 2.6: Einige ausgewählte, bei Biosensoren gebräuchliche Transducer-Systeme

Grundsätzlich kann zwischen markierungsfrei arbeitenden (z.B. SPR, RIFS, QCM, SAW) und auf ein Label angewiesenen Systemen (z.B. TIRF) unterschieden werden.

2.4.2 SPR-Biosensoren

Der in dieser Arbeit verwendete Biacore X Biosensor nutzt einen auf dem SPR-Effekt (*Surface Plasmon Resonance*) basierenden Transducer. Dessen Funktionsweise soll daher im Folgenden etwas ausführlicher vorgestellt werden.

2.4.2.1 Oberflächenplasmonenresonanz

Die erstmals 1957 von RITCHIE vorgestellten Oberflächenplasmonen sind die Quanten kollektiver Schwingungen freier Elektronen an der Oberfläche von Metallen (179). Diese können unter bestimmten Umständen von Photonen angeregt werden, welche von der Metalloberfläche reflektiert werden. Im maximalen Resonanzfall wird die Energie der

Photonen dabei so optimal übertragen, dass kein Licht mehr reflektiert wird. Da diese Resonanz durch der Metallfläche aufliegende Schichten (bzw. adsorbierte Biomoleküle oder ähnliches) sehr empfindlich beeinflusst wird, lässt sich ein geeigneter Aufbau für die Analytik dieser Schichten einsetzen (180). Ohne zu sehr ins Detail zu gehen, sollen die Eigenschaften der Oberflächenplasmonen, sofern für die Verwendung als Transducer relevant, und der schematische Aufbau dieser Transducer kurz erläutert werden.

Die elektronischen Eigenschaften von Metallen können durch ein Gitter aus positiv geladenen Atomrümpfen beschrieben werden, in dem sich einzelne Elektronen frei bewegen. Daneben gibt es das Konzept des Plasmas: die Elektronen werden als hochdichtes Elektronengas behandelt, wobei Dichteschwankungen durch das Medium propagieren (181). Ähnlich wie bei Licht, welches nach dem Welle-Teilchen-Dualismus der Quantenmechanik sowohl als Wellenfunktion wie auch als Photon beschrieben werden kann, handelt es sich beim Plasmon um ein dem Photon entsprechendes Quasiteilchen. Es beschreibt besagte Schwingungen im Elektronengas eines metallischen Festkörpers. Besonders interessant sind dabei die an den Grenzflächen befindlichen Oberflächenplasmonen, da sie in der Lage sind, stark mit Licht zu interagieren. Dieser Fall tritt ein, wenn der Wellenvektor der eingestrahlten Photonen größer ist als der der Oberflächenplasmonen, es kommt zur Kopplung unter Ausbildung von Polaritonen. Im optimalen Fall, wenn die Wellenvektoren für eine gegebene Frequenz übereinstimmen, kommt es zur Resonanz.

Es soll im Folgenden die in Biosensoren zum Einsatz kommende Konfiguration nach Kretschmann (182; 183) betrachtet werden (Abb. 2.8):

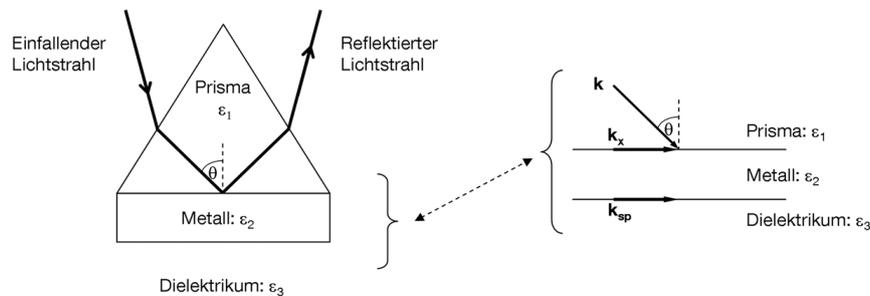


Abbildung 2.8: Die für Biosensoren verwendete Kretschmann-Konfiguration

Ein Lichtstrahl trifft aus einem Prisma unter einem Winkel Θ so auf eine dünne Metallschicht, dass Totalreflexion auftritt. Auf der andere Seite der Metallschicht befindet sich ein Dielektrikum. Der Lichtstrahl kann zwar nicht in das Metall penetrieren, sein elektrisches Feld dringt jedoch in dieses ein und klingt exponentiell ab. Man spricht von einem evaneszenten Feld. Die Reichweite des Evaneszenzfeldes liegt dabei etwa im Bereich der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes (z.B. He-Ne Laser mit $\lambda = 6328 \text{ \AA}$), wählt man also die Schichtdicke des Metalls dünn genug (realistisch sind z.B. Sil-

berschichten mit einer Dicke von 560 \AA), kann eine Anregung der an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum befindlichen Plasmonen erfolgen. Eine Anregung bewirkt dabei eine Abschwächung der Intensität des reflektierten Lichtstrahls (man spricht von *attenuated total reflection*, ATR).

Um eine Kopplung von Photonen und Plasmonen zu erlauben, muss die Kreiswellenzahl k der Photonen bei gegebener Kreisfrequenz ω größer, im optimalen Fall (dem Resonanzfall) gleich sein wie die der Plasmonen. Besagte Kreiswellenzahl k (der mit 2π multiplizierte Kehrwert der Wellenlänge λ) ist von den Eigenschaften des Mediums abhängig und steht mit der konstant bleibenden Kreisfrequenz ω in Relation. Die Abhängigkeit der beiden Größen wird in der Dispersionsrelation dargestellt. Für Licht besteht ein linearer Zusammenhang:

$$\omega = ck \quad (2.1)$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit im jeweiligen Medium ist. Diese ist vom jeweiligen Material abhängig und berechnet sich aus der Permittivität im Vakuum ε_0 und des Mediums ε_1 sowie der Permeabilität im Vakuum μ_0 und des Mediums μ_1 aus:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \varepsilon_1 \mu_0 \mu_1}} \quad (2.2)$$

Es wird p-polarisiertes Licht verwendet, d.h. der elektrische Feldvektor ist parallel zur Einfallsebene. Der Wellenvektor \vec{k} kann dann, wie aus Abb. 2.8 abzuleiten, in eine zur Grenzfläche parallele Komponente k_x und eine zur Grenzfläche senkrechte Komponente k_y aufgeteilt werden, wobei für die Kopplung von Photonen und Plasmonen ausschließlich der zur Grenzfläche parallele Anteil k_x relevant ist. Diese Komponente lässt sich mit einfacher Trigonometrie aus

$$k_x = \sin(\Theta) k \quad (2.3)$$

berechnen. Unter Berücksichtigung der Gleichungen 2.2 und 2.3 ändert sich Gleichung 2.1 damit zu

$$\omega = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \varepsilon_1 \mu_0 \mu_1}} \frac{k_x}{\sin(\Theta)} \quad (2.4)$$

d.h. die Dispersionsrelation des eingestrahlten Lichtes ist abhängig von den optischen Eigenschaften des Prismas sowie vom Einfallswinkel. Dies ist für das Messprinzip von essentieller Bedeutung, worauf später noch genauer eingegangen werden soll.

Betrachten wir nun die Oberflächenplasmonen, welche parallel zur Oberfläche mit dem Wellenvektor \vec{k}_{sp} schwingen. Ihre Dispersionsrelation lautet

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_2 \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3}} \quad (2.5)$$

wobei ε_2 , die Permittivität des Metalls, wiederum von ω abhängt und durch die Funktion

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (2.6)$$

mit ω_p gleich der Plasmafrequenz des Metalls (für Gold $\omega_p = 13,8 \times 10^{15} \text{s}^{-1}$) berechnet werden kann. Setzt man Gleichung 2.6 in 2.5 ergibt sich

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}\right) \varepsilon_3}{1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} + \varepsilon_3}} \quad (2.7)$$

Abbildung 2.9 zeigt jeweils den funktionellen Zusammenhang von ω und k für Oberflächenplasmonen, Licht in Luft und Licht in Glas nach den Gleichungen 2.4 und 2.7 mit $\sqrt{\varepsilon_1 \mu_1} = 1$ (Licht in Vakuum) bzw. 1,8 (über Glas eingekoppelt), sowie $\varepsilon_3 = \varepsilon_0$ (Vakuum als Dielektrikum).

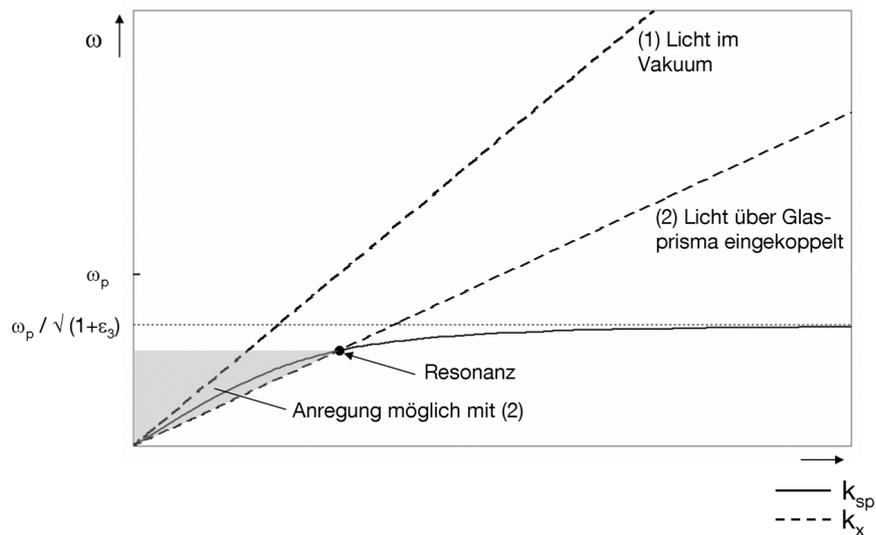


Abbildung 2.9: Dispersionsrelationen von Oberflächenplasmonen, sowie von eingestrahlttem Licht

Auf folgende Punkte soll dabei im Besonderen hingewiesen werden:

1. Um eine Anregung von Oberflächenplasmonen bewirken zu können, muss die Kreiswellenzahl des eingestrahltten Lichts größer sein als die der Oberflächenplasmonen, d.h. die Dispersionrelation des Lichts muss rechts der Dispersionrelation der Oberflächenplasmonen liegen. Optimale Anregung - Resonanz - erfolgt bei identischen Werten, also beim Schnittpunkt der Kurven (184).
2. Strahlt man Licht durch Vakuum (bzw. Luft) ein, liegt die Lichtlinie immer links der Dispersionrelation der Oberflächenplasmonen. Durch "Einkoppeln" des

Lichtstrahls über ein optisch dichteres Medium (in der Regel ein Glasprisma oder ähnliches), wird das Licht um den Faktor $\frac{1}{\sqrt{\varepsilon\mu}}$ abgebremst. Dadurch erhöht sich die Wellenzahl (und damit der Impuls). Eine Anregung von Oberflächenplasmonen ist nun möglich (vergleiche Dispersionsrelationen von Licht in Vakuum und über Glas eingekoppelt in Abb. 2.9).

3. Die Kreiswellenzahl der parallel zur Grenzfläche schwingenden Komponente k_x des Wellenvektors des eingestrahnten Lichtes lässt sich durch Modulierung des Einfallswinkels Θ ändern (siehe Gleichung 2.3). Im Umkehrschluss tritt eine Anregung bei Verwendung von monochromatischem Licht (k ist gegeben) nur unter einem bestimmten Winkel auf.
4. Die Dispersion der Oberflächenplasmonen reagiert sehr empfindlich auf die Zustände an der Grenzfläche Gold/Dielektrikum. Dünne Filme verschiedenster Materialien ändern diese bereits stark. So wurden ursprünglich LiF und Kohlenstoff-Schichten einer Dicke von ca. 25 - 10.000 Å auf Silberfilmen untersucht (185; 186).

Zur Nutzung als Messprinzip ist dabei die **Auslesung von Reflexionsspektren**, d.h. die Abhängigkeit der Reflektivität (das Verhältnis von eingestrahelter zu reflektierter Lichtintensität) vom Einfallswinkel geeignet. Die Reflektivität kann durch eine Funktion von k_x beschrieben werden (183), welche ein scharfes Minimum hat.

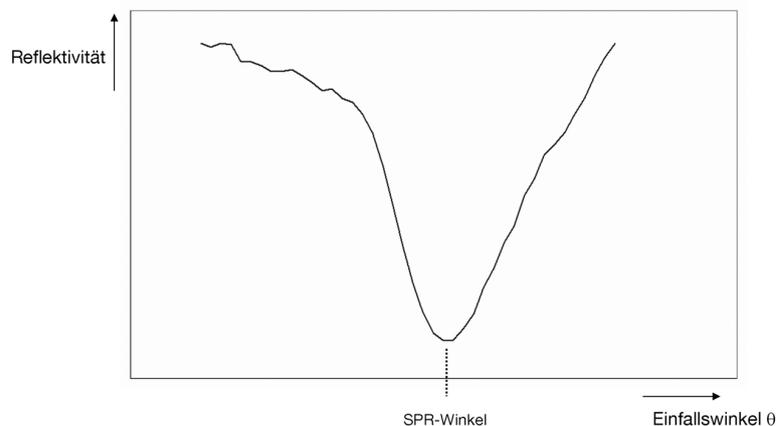


Abbildung 2.10: Demonstration eines Reflexionsspektrums. Das Minimum der Reflektivität tritt beim SPR-Winkel auf.

Der Winkel, unter dem dieses Minimum auftritt, d.h. der Einfallswinkel, bei dem die Anregung von Oberflächenplasmonen durch das Licht erfolgen kann, wird häufig als SPR-Winkel oder Resonanzwinkel bezeichnet (Abb. 2.10). Seine Lage erlaubt Rückschlüsse auf die optischen Eigenschaften des Dielektrikums sowie des eingesetzten Metalls. In der ursprünglichen Arbeit von KRETSCHMANN wurden auf diese Art und Weise optische Konstanten von Metallen bestimmt (183). Durch Änderung der

optischen Eigenschaften an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum kommt es zu einer Änderung der Dispersion der Oberflächenplasmonen und damit zu einer Verschiebung des Winkels zu größeren Werten (186).

2.4.2.2 Nutzung in Biosensoren

Die ersten Sensoren, welche SPR als Transducer nutzten, wurden Anfang der 1980er Jahre von NYLANDER und LIEDBERG vorgestellt. Sie greifen auf die Tatsachen zurück, dass (a) Resonanz wie oben beschrieben nur unter einem bestimmten Einfallswinkel erfolgt, (b) die Anregung von Oberflächenplasmonen eine Abschwächung der Lichtintensität bewirkt und (c) Oberflächenplasmonen sehr empfindlich auf die Bedingungen an der Grenzfläche zum Dielektrikum reagieren. Damit können Änderungen an der Grenzfläche als Änderung des Einfallswinkels unter dem maximale Abschwächung des reflektierten Lichtstrahls auftritt, sehr empfindlich detektiert werden. Die ersten Systeme wurden zur Gasdetektion eingesetzt und basierten auf dünnen Filmen reversibel Gas-absorbierender Materialien, deren Schwellung durch einen Shift des SPR-Winkels sehr sensitiv quantifiziert werden konnte, was eine Detektion von z.B. Halothan im ppm-Bereich erlaubte (187).

Bereits kurze Zeit später wurde der Sensor zur Detektion immunologischer Wechselwirkungen, also im Sinne eines Biosensors eingesetzt. Dabei wurde eine monomolekulare Schicht humanes IgG auf einem Silberchip adsorbiert, bis die Zugabe von IgG keinen weiteren Shift des SPR-Winkels mehr bewirkte. Die Reaktion mit anti-human IgG resultierte dann in einer spezifischen weiteren Anbindung, sichtbar in einem erneuten Shift zu höheren SPR-Winkeln (188; 189). Die Adsorption, bzw. der durch die Adsorption verursachte Shift des SPR-Winkels wurde außerdem zeitaufgelöst dargestellt (Abb. 2.11). Diese Darstellung, das Biosensorgramm, ist die Grundlage für eine kinetische Auswertung von Interaktionen, wie sie heute für die Technologie typisch sind.

In den darauf folgenden Jahren wurde die Technik von Pharmacia Biosensor industriell weiterentwickelt und ab den 1990er Jahren vermarktet. Die BIAcore Biosensoren (von BIA, *Biological Interaction Analysis*) wurden als Komplettlösung konzipiert, in der das SPR-Detektionssystem, eine Mikrofluidik, sowie leicht austauschbare Goldoberflächen im Chipformat (z.B. zur erleichterten Immobilisierung von Interaktionspartner bereits mit Carboxymethyldextran vormodifiziert) bereits integriert sind (190; 191).

2.4.2.3 Aufbau und Funktion des Biacore X SPR-Biosensors

Der Biacore X ist ein kommerzieller Biosensor, der den SPR-Effekt als Detektionsprinzip für die Aufzeichnung biologischer Interaktionen in Echtzeit nutzt. Dazu werden auf dünnen Goldschichten immobilisierte Interaktionspartner mit ihren in Lösung befindlichen Gegenspielern überspült. Hält man sich nochmal den grundsätzlichen Aufbau nach Kretschmann vor Augen (Abb. 2.8), so ist das Metall hier Gold, das Dielektri-

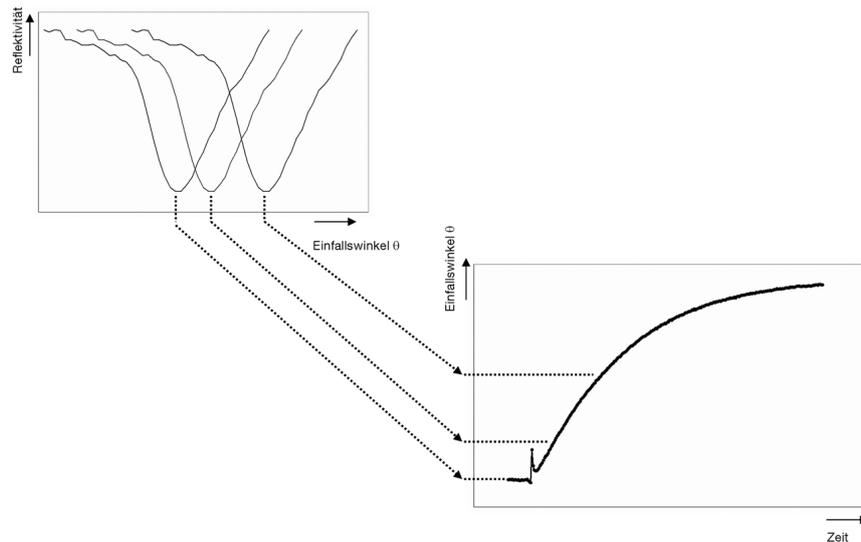


Abbildung 2.11: Ableitung des Sensorgrams als zeitaufgelöste Änderung des SPR-Winkels

kum eine Analytlösung. Entscheidend für die Eigenschaften der Oberflächenplasmonen ist eine dünne, auf das Gold aufgetragene biologische Schicht, deren Brechungsindex durch die (spezifische) Interaktion mit in der Analytlösung befindlichen Biomolekülen empfindlich verändert wird.

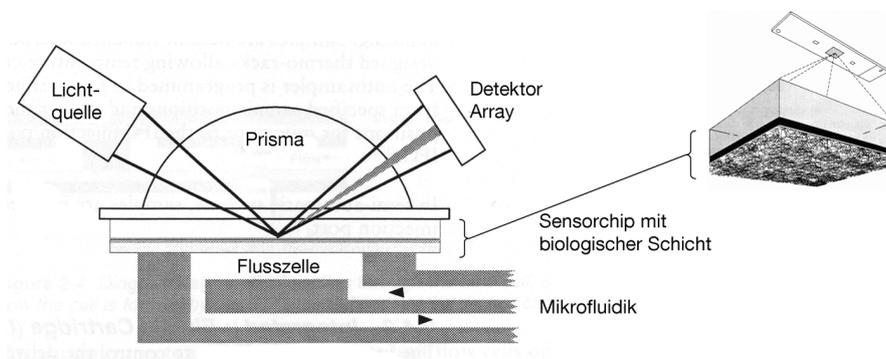


Abbildung 2.12: Aufbau des Biacore X Biosensors

Um einen schnellen Austausch der Messoberflächen zu ermöglichen, sind diese im Chipformat konzipiert (Abb. 2.12 modifiziert nach (192) mit freundlicher Genehmigung von Biacore¹). Die Chips bestehen aus einem Plastikträger, in den ein goldbedampftes Glasplättchen eingeklebt ist. Je nach Ausfertigung ist dabei die Goldoberfläche bereits mit z.B. Carboxymethyldextran, auf Carboxymethyldextran immobilisiertes Streptavidin oder auf Carboxymethyldextran immobilisierte Nitrilotriessigsäure vorbehandelt.

¹Biacore is a trademark of GE Healthcare companies; GE Healthcare Bio-Sciences AB, a General Electric Company; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala/Sweden

Auf die Glasseite des Chips wird die optische Detektionseinheit aufgepresst. Diese umfasst eine monochromatische Lichtquelle, sowie ein Detektor-Array. Im Gegensatz zum ursprünglichen Aufbau z.B. bei NYLANDER (187) wird die Änderung des Einfallswinkels dabei jedoch nicht durch Bewegung der Lichtquelle erreicht. Stattdessen wird ein ganzes Lichtbündel eingestrahlt und die Position des Schattens (also des Winkels unter dem Resonanz auftritt) in Echtzeit am Detektor-Array verfolgt.

Von der Unterseite, also der mit Biomolekülen belegten, goldbeschichteten Seite des Chips lassen sich Bereiche der Chipoberfläche gezielt mit einer Puffer- bzw. Analytlösung überspülen. Die Mikrofluidik verfügt über eine 100- μ l-Probenschleife, welche mit einer Kolbenhub-Pipette beschickt werden kann, einen Eingang für Pufferlösung sowie zwei Ausgänge für verbrauchte Lösungen (Abb. 2.13).

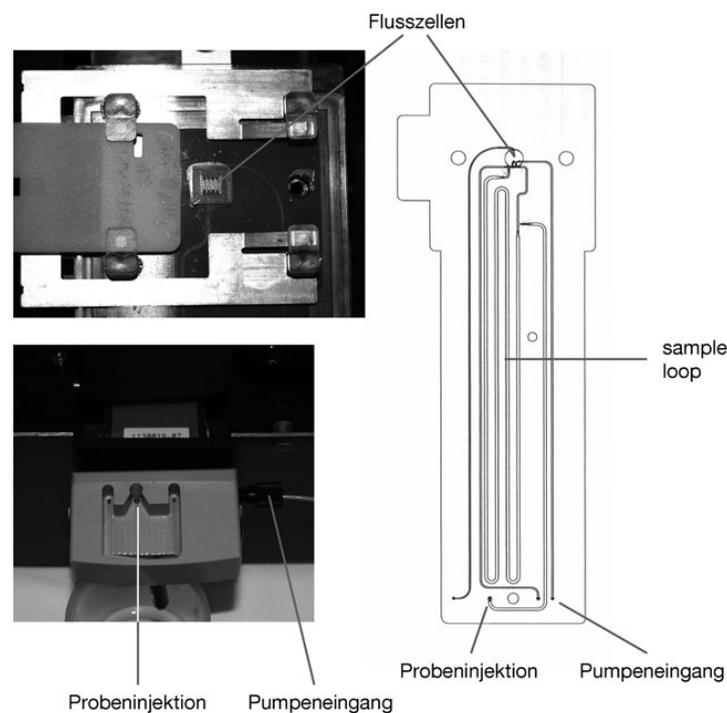


Abbildung 2.13: Mikrofluidik des Biacore X Biosensors (modifiziert nach (192) mit freundlicher Genehmigung von Biacore)

Als Pumpe fungiert eine 500- μ l-Hamilton-Spritze, welche einen konstanten Fluss von Laufpuffer (1 - 500 μ l/min) über die Oberfläche aufrecht erhält, über die Kontrollsoftware lässt sich ein definiertes Volumen aus der Probenschleife zum Fluß zuschalten. An der Kontaktstelle mit der Chipoberfläche werden von der mikrofluidischen Einheit vier Flusszellen (*flow cells*, FC) voneinander abgetrennt, wovon im Biacore X Biosensor nur zwei (FC1 und FC2) separat angesteuert werden können (schwach sichtbar in Abb. 2.13 oben links). Die Ansteuerung erfolgt dabei entweder seriell (Pumpe - Probenschleife - FC1 - FC2 - Abfall) oder einzeln (Pumpe - Probenschleife - FC1 - Abfall bzw.

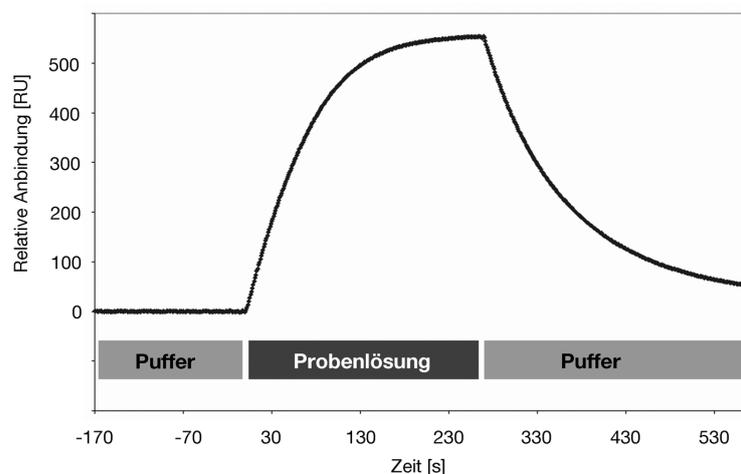


Abbildung 2.14: Typische Bindungskurve des SPR-Biosensors

Pumpe - Probenschleife - FC2 - Abfall), ein paralleler Modus ist nicht möglich. Durch die Verwendung von zwei distinkten Bereichen der Chipoberfläche ist es möglich, diese unterschiedlich mit Interaktionspartner zu beladen und eine Flusszelle als Referenzoberfläche zu nutzen. Hierdurch können unspezifische Effekte, die durch unterschiedliche Brechungsindices von Laufpuffer und Probenlösung herrühren, subtrahiert werden.

Bei typischen Bindungskurven (Abb. 2.14) wird beim Überspülen mit Laufpuffer eine stabile Basislinie erhalten. Schaltet man die Probenlösung, welche einen spezifisch an die Oberfläche bindenden Analyten enthält, in den Fluss, wird durch dessen Anbindung eine Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche Puffer/Gold bewirkt. Daraus resultiert eine Steigung der Kurve. Sobald die Probenlösung wieder durch Laufpuffer ersetzt wird, kommt es zur Dissoziation des entstandenen Komplexes - die Kurve fällt wieder.

Vorteile des Systems liegen zum einen darin, dass es markierungsfrei arbeitet, d.h. kein wie auch immer geartetes Label bzw. Tracer benötigt wird. Daneben verläuft die gesamte Messung unter homogenen Bedingungen (nicht in homogener Phase!), d.h. der Pufferstrom über die Oberfläche wird nicht durch eventuell anfallende Wasch- oder Stopschritte unterbrochen, wie dies bei anderen Methoden notwendig ist. Bei Verwendung von Puffern mit physiologischem pH und ohne aggressive Zusätze ist dies ein sehr schonendes Verfahren, mit dem auch niedrig affine, sowie schnell dissoziierende Interaktionen ohne weiteres detektiert werden können.

Um die mehrfache Nutzung der Oberflächen zu ermöglichen, müssen diese jedoch zwischen den einzelnen Messungen regeneriert werden. Hierfür kommen je nach Art der Interaktion verschiedene Substanzen in Betracht. Typische Regenerationslösungen arbeiten bei extremen pH-Werten, hohen Ionenstärken oder enthalten Detergenzien. Dieser Schritt muss für jedes System neu optimiert werden und soll gebundenen Ana-

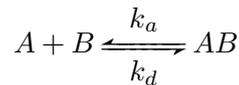
lyten vollständig abwaschen ohne die ursprüngliche Oberfläche anzugreifen (193).

2.4.3 Spezielle Auswertung von SPR-Biosensorgrammen

Die Messung von biologischen Interaktionen in Echtzeit ermöglicht die Bestimmung sowohl der kinetischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten als auch der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten der zugrundeliegenden Wechselwirkung. Daneben ist es auch möglich, die Konzentration eines Analyten zu ermitteln. Die elementaren Zusammenhänge sollen zuerst für eine Interaktion der Stöchiometrie 1:1 erläutert werden (194; 195; 196), um dann auf komplexere kinetische Modelle (197; 198) sowie Versuchsaufbauten, die nicht der Ermittlung von Bindungskonstanten dienen, einzugehen.

2.4.3.1 Extraktion kinetischer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Betrachtet man die reversible Reaktion zweiter Ordnung zwischen den Biomolekülen A und B:



wobei A der injizierte Analyt, B der immobilisierte Interaktionspartner, und AB der auf der Oberfläche gebildete Komplex ist, so lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, k_a , über

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A]_{frei} \times [B]_{frei} \quad (2.8)$$

und die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, k_d , über

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \times [AB] \quad (2.9)$$

definieren. Während der Injektion des Analyten treten sowohl Assoziation wie auch Dissoziation auf, die Nettokomplexbildung der Injektionsphase lässt sich damit als Differenz beider Gleichungen ausdrücken:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A]_{frei} \times [B]_{frei} - k_d \times [AB] \quad (2.10)$$

Die im Biosensor gemessene relative Anbindung R ist proportional zur Protein-Oberflächenkonzentration

$$R = k_p \Gamma \quad (2.11)$$

wobei Γ die Oberflächenkonzentration (Masse/Fläche) und k_p der Proportionalitätsfaktor ist, für den ein für die meisten Proteine gültiger Wert von etwa $1 \frac{RU \times mm^2}{pg}$ gefunden wurde (199). Für eine distinkte Interaktion und damit gegebene Molekulargewichte

ist Γ und damit R proportional zu $[AB]$. Für den immobilisierten Reaktionspartner B gilt außerdem

$$[B]_{frei} = [B]_{total} - [AB] \quad (2.12)$$

wobei die zur Verfügung stehende Konzentration $[B]_{total}$ mit der maximal möglichen Anbindung R_{max} korreliert. Gleichung 2.10 lässt sich damit umformen zu

$$\frac{d[R]}{dt} = k_a \times [A]_{frei} \times (R_{max} - R) - k_d \times R \quad (2.13)$$

wobei zu erwähnen ist, dass durch das Arbeiten im Durchfluss die Konzentration von A , $[A]_{frei}$ über den gesamten Zeitraum der Injektion konstant gehalten wird. Während der Postinjektionsphase tritt lediglich Dissoziation des Analyten auf, für diesen Bereich der Messung folgt dann aus Gleichung 2.9 analog:

$$-\frac{dR}{dt} = k_d \times R \quad (2.14)$$

Für diese Differentialgleichung existiert die einfache Lösung:

$$R(t) = R_0 \times e^{-k_d \times t} \quad (2.15)$$

der Komplexzerfall erfolgt also exponentiell.

Zur Auswertung von Bindungsdaten werden die erhaltenen Messwerte gegen die Gleichungen 2.13 und 2.14 gefittet (Abb. 2.15). Zur Demonstration wurde hier bewusst ein eher schlechtes Beispiel ausgewählt. Während $[A]_{frei}$ bekannt sein muss und über den gesamten Messzeitraum praktisch konstant gehalten wird, können so experimentell Werte für k_a , k_d und R_{max} ermittelt werden. Um die Validität der Messungen zu erhöhen, ist es üblich, Messwerte für mehrere $[A]_{frei}$ gleichzeitig auszuwerten. Außerdem ist es möglich, wie im Beispiel gezeigt, die Injektions- und die Postinjektionsphase gleichzeitig zu fitten, sodass auch hier nur ein Wert für jede Konstante erhalten werden kann.

Für die Postinjektionsphase besteht außerdem die Option, $\ln(R)$ gegen die Zeit aufzutragen und k_d gemäß Gleichung 2.15 als Steigung dieser Kurve auszulesen (Abb. 2.16).

Im gezeigten Beispiel ist zu erkennen, dass die Komplexdissoziation nicht sauber nach Gleichung 2.15 abläuft, sondern sich mit der Zeit verlangsamt.

2.4.3.2 Extraktion thermodynamischer Gleichgewichtskonstanten

Neben der Bestimmung der kinetischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ist es möglich, auch die *Gleichgewichtsassoziations-* bzw. *-dissoziationskonstante* der Wechselwirkung zu messen. Für die oben betrachtete Reaktion

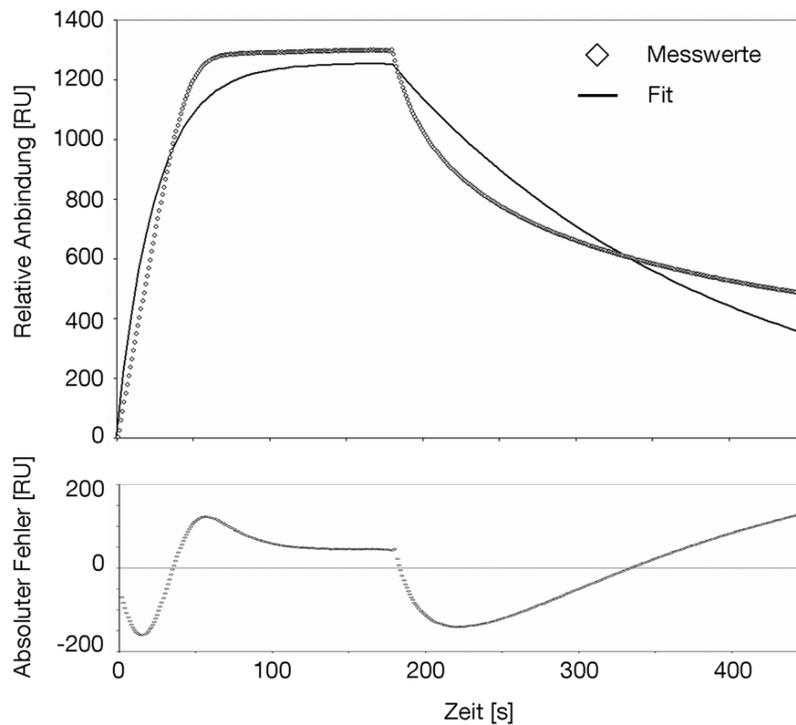
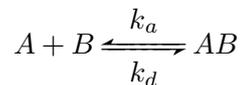


Abbildung 2.15: Demonstration des in die BIAevaluation Software integrierten Fittings. Die Injektionsphase wird an Gleichung 2.13, die Postinjektionsphase an Gleichung 2.14 gefittet. Zusätzlich ist der absolute Fehler des Fittings dargestellt.



sind diese gemäß dem Massenwirkungsgesetz definiert als

$$K_A = \frac{[AB]}{[A]_{frei} \times [B]_{frei}} \quad (2.16)$$

für die Assoziationskonstante und

$$K_D = \frac{[A]_{frei} \times [B]_{frei}}{[AB]} = \frac{1}{K_A} \quad (2.17)$$

für die Dissoziationskonstante.

Für die experimentelle Bestimmung der Gleichgewichtskonstante mit Hilfe der eingesetzten SPR-Biosensor-Technologie sollen zwei unterschiedliche Prinzipien vorgestellt werden:

Aus kinetischen Bindungsdaten K_A bzw. K_D können aus den kinetischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten berechnet werden, ohne dass das Gleichgewicht im Verlauf

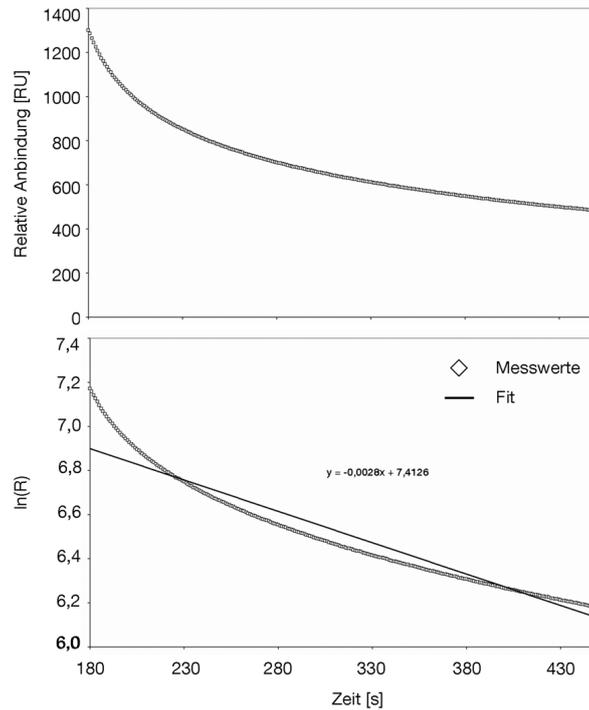


Abbildung 2.16: Darstellung der in der Postinjektionsphase gemessenen Komplexdissoziation in linearer (oben) wie in natürlich logarithmischer Darstellung (unten). Bei natürlich logarithmischer Auftragung ist die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation als Steigung auslesbar.

des Versuches erreicht wird. Im Gleichgewicht würde gelten, dass Assoziation und Dissoziation identisch sind. Es folgt aus Gleichungen 2.8 und 2.9:

$$k_a \times [A]_{frei} \times [B]_{frei} = k_d \times [AB] \quad (2.18)$$

was sich umformen lässt zu

$$\frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A]_{frei} \times [B]_{frei}} = K_A = \frac{1}{K_D} \quad (2.19)$$

Damit errechnet sich die Gleichgewichtskonstante einfach als Quotient der zugehörigen kinetischen Konstanten.

Aus Bindungsdaten im Gleichgewichtszustand Natürlich können die Gleichgewichtskonstanten auch ohne Zuhilfenahme der kinetischen Konstanten ermittelt werden. Gleichung 2.17 lässt sich dann analog obiger Überlegungen als

$$K_D = \frac{[A]_{frei} \times (R_{max} - R_{eq})}{R_{eq}} \quad (2.20)$$

formulieren, wobei R_{eq} die *im Gleichgewicht* gemessene relative Anbindung ist. Durch

Umformung erhält man

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \times [A]_{frei}}{K_D + [A]_{frei}} \quad (2.21)$$

Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der im Gleichgewicht gemessenen Anbindung R_{eq} und der freien Konzentration des injizierten Interaktionspartners. Für den Fall, dass die halbmaximale Anbindung $R_{eq} = \frac{1}{2}R_{max}$ erreicht wird, ergibt sich daraus $K_D = [A]_{frei}$.

Plottet man also die ausgelesene Anbindung im Gleichgewicht gegen die eingesetzte Konzentration von A, so kann K_D als $[A]_{frei}$ bei $R_{eq} = \frac{1}{2}R_{max}$ abgelesen werden (Abb. 2.17). Ein bei entsprechenden ELISA-Messungen auftretendes großes Problem ist, dass die freie Konzentration von A, $[A]_{frei}$, von der eingesetzten Konzentration von A abweicht, da ein gewisser Teil für die Komplexbildung von AB verbraucht wird. Dies kann im Biosensor praktisch ausgeschlossen werden, da durch das Durchflusssystem konstante Analytkonzentrationen in der Flusszelle aufrechterhalten werden.

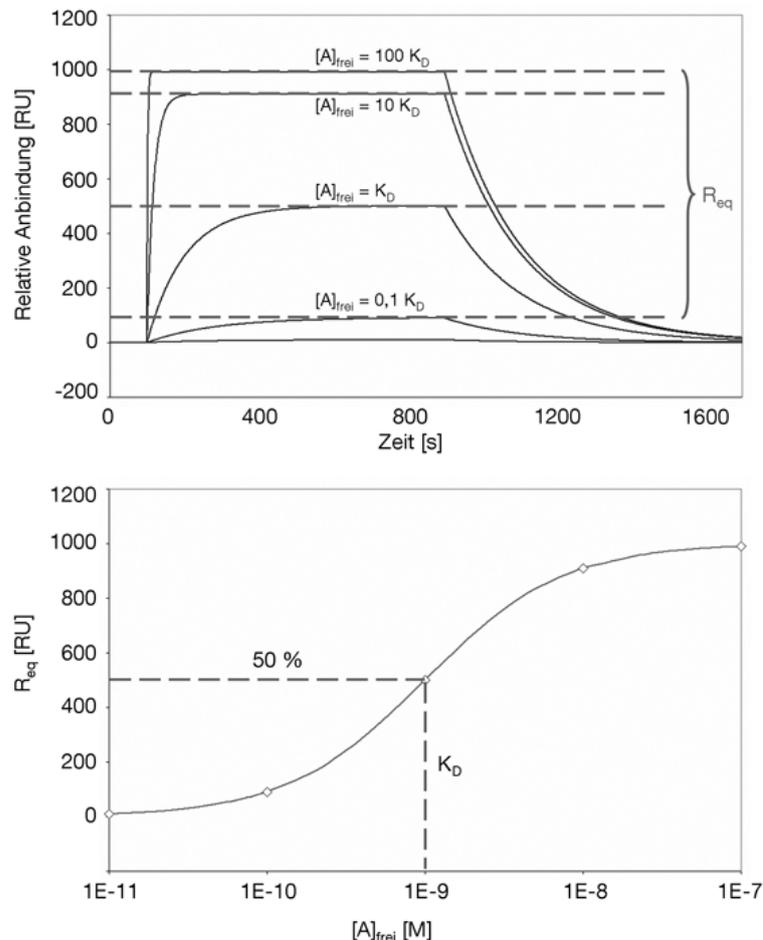
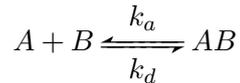


Abbildung 2.17: Demonstration der Bestimmung von K_D anhand der im Gleichgewichtszustand gemessenen relativen Anbindung

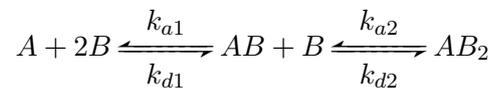
Voraussetzung für diese Art der Auswertung ist allerdings, dass sich das System auch tatsächlich im Gleichgewicht befindet. Die Dauer bis zum Erreichen des Gleichgewichtes ist von den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten abhängig und für einen großen Teil der vermessenen Interaktionen nicht realisierbar.

2.4.3.3 Komplexe Reaktionskinetiken

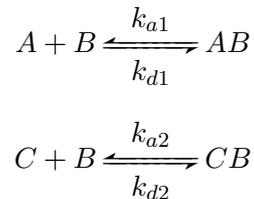
Obige Ausführungen gelten alle für den Fall der 1:1-Bindung, also für die Reaktion:



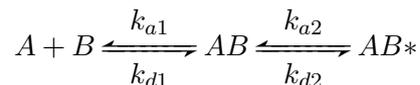
Diese Reaktionsgleichung würde eine bivalente Bindung nicht korrekt beschreiben, hier würde gelten:



Daneben gibt es zahlreiche Modelle für anders ablaufende Reaktionen, z.B. für konkurrierende Reaktionen bei einer heterogenen Oberfläche bzw. Analytlösung:



oder für zweistufige Reaktionen (197):



Messdaten können deshalb natürlich ebenso gegen Algorithmen gefittet werden, die komplexere Reaktionskinetiken als eine 1:1-Reaktion beschreiben. Darüberhinaus kann auch ein Drift der Basislinie oder ein Massentransfereinfluß mit eingerechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf diese Möglichkeit verzichtet. Dafür soll folgende Rationale angeführt werden:

1. Auch wenn man davon ausgehen kann, dass anti-DNA-Antikörper bevorzugt multivalent binden, ist der tatsächliche Bindungsmodus nicht bekannt. Bei IgGs ist er mono- oder bivalent, bei IgMs können bis zu zehn Valenzen zur Bindung beitragen. Schon für eine bivalente Bindung liegt die funktionelle Affinität dabei etwa um den Faktor 10^4 höher als die intrinsische, auf eine Valenz bezogene, Affinität der Antikörper. Für IgMs ist grob von Faktoren zwischen 10^6 und 10^7 auszugehen (70).

2. Der Zusammenhang zwischen intrinsischer und funktioneller Affinität ist komplex und von den jeweiligen geometrischen Gegebenheiten abhängig (200).
3. Die Kenntnis der intrinsischen Affinität ist zwar die theoretisch korrektere Beschreibung von Antikörpern unerlässlich, sie ist jedoch für den angestrebten Zweck nicht zu gebrauchen. Ausschlaggebend für die biologische Wirkung von anti-dsDNA, also ihre Pathogenität und ihre diagnostische Aussagekraft, sowie ihr Verhalten in diversen Bestimmungsmethoden ist die funktionelle Affinität - die Avidität - der Autoantikörper (68).

Die Ermittlung der intrinsischen Affinität aus Bindungsdaten, für die die tatsächliche Bindungswahl nicht bekannt ist, erscheint daher weder statthaft noch sinnvoll. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden deshalb grundsätzlich nach dem monovalenten Bindungsmodell ausgewertet, auch wenn das zugrundeliegende mathematische Modell eine bi- bzw. polyvalente Bindung nicht korrekt beschreibt. Die erhaltenen Werte spiegeln beobachtete, funktionelle Konstanten wider. Es soll hier nicht versäumt werden zu erwähnen, dass dies in der Literatur gängige Praxis ist, lediglich meist nicht explizit darauf hingewiesen wird. So beruht beispielsweise die Auswertung nach Scatchard (201) auf der Annahme einer monovalenten 1:1-Interaktion und wird trotzdem sehr häufig für die Bestimmung von Antikörper-Affinitäten herangezogen (202; 203; 204).

2.4.3.4 Bestimmung der Analytkonzentration

Die SPR-Biosensortechnologie kann neben der detaillierten Interaktionsanalyse auch für klassische Konzentrationsmessungen verwendet werden (205; 206; 207; 208; 209). Dafür kommen prinzipiell alle von anderen Festphasensystemen bekannten Formate in Betracht, oben genannte Vorteile (kein Label/Tracer, konstante Analytkonzentration durch Arbeiten im Durchfluss) greifen auch hier. Als Besonderheit können auch Gemische von Analyten mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften direkt quantifiziert werden, sobald die Anbindung vom Massentransport limitiert wird, was in der Praxis durch sehr niedrige Flussraten erreicht werden kann (192).

3 Ergebnisse und Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden mit dem Ziel erarbeitet, dem bereits vorhandenen Methodenspektrum zur Analytik von anti-dsDNA eine auf SPR-Biosensorik basierende, potentiell leistungsstärkere, Methode hinzuzufügen und deren Möglichkeiten und Limitationen zu evaluieren. Entsprechend gliedert sich der folgende Teil gemäß der logischen und meist auch chronologischen Abfolge dieses Prozesses:

1. Etablierung einer geeigneten Biosensorchipoberfläche und
2. Pilotversuche zu deren Eignung .
3. Einsatz des erhaltenen Systems zur Charakterisierung von monoklonalen anti-dsDNA Antikörpern.
4. Analyse von Seren von SLE-Patienten und Vergleich mit der etablierten Analytik.

3.1 Etablierung der antigenen Oberfläche

Bei dem verwendeten SPR-Biosensor des Herstellers Biacore handelt es sich um ein festphasengebundenes Analysensystem mit besonderen Anforderungen an den Aufbau der eingesetzten Oberfläche. Der zentrale Schritt bei der Etablierung einer neuen Methode ist dabei das Design der entsprechenden festen Phase. Grundsätzlich werden, wie oben erläutert, im hier verwendeten Biacore X System zwei lokal getrennte Bereiche des Chips parallel ausgelesen, eine mit Interaktionspartner belegte Messzelle und eine bis auf das Fehlen dieses Interaktionspartners sonst chemisch möglichst identische Referenzzelle (Abb. 3.1).

Dieses Vorgehen ermöglicht die Korrektur des Signals um sogenannte „Bulk-Effekte“, sprunghafte Signaländerungen zu Beginn und Ende der Assoziationsphase, welche durch leicht unterschiedliche Brechungsindices von Laufpuffer und Messlösung entstehen (197). Da diese Sprünge auf beiden Oberflächen gleich sind, lassen sie sich durch Subtraktion der Signale leicht entfernen. Erschwert wird dabei allerdings die Immobilisierung: da eine zuverlässige Diskriminierung der beiden sehr kleinen Oberflächenbereiche (mit einer Fläche von jeweils $1,2 \text{ mm}^2$) nur mit Hilfe der Mikrofluidik des Biosensors selbst möglich ist, muss der Immobilisierungsprozess im Durchflusssystem durchgeführt werden.

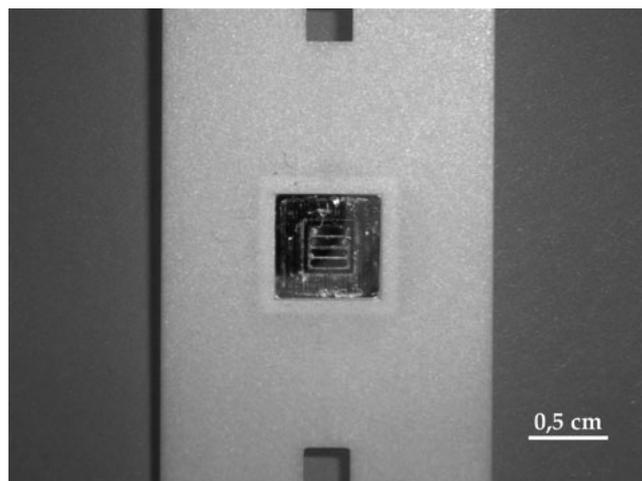


Abbildung 3.1: Fotografie eines Biosensorchips. In der Mitte des auf einen Plastikträger geklebten goldbeschichteten Glasplättchens sind vier längliche Bereiche sichtbar, welche getrennt voneinander angesteuert und ausgelesen werden können. Das Biacore X System nutzt davon nur maximal zwei.

Dabei kommt es zu gewissen Limitierungen. Das Volumen der eingesetzten Coating-Lösung ist bauartbedingt pro Injektion auf 100 μl beschränkt, was bei einer minimalen Flussrate von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ eine maximale Kontaktzeit von 100 Minuten zur Folge hat. Darüberhinaus ermöglicht das eingesetzte Modell nur eine Temperierung zwischen 4°C bis 40°C, wobei aufgrund des hohen Zeitaufwands ein Abweichen von der späteren Mess-temperatur, welche auf grundsätzlich 25°C festgelegt wurde, nicht wünschenswert ist. Eine weitere Voraussetzung ergibt sich daraus, dass die Biosensorchips nicht nur für eine, sondern seriell für möglichst viele Messungen verwendet werden sollten, wobei die antigene Oberfläche zwischen zwei Messzyklen mit geeigneten Waschlösungen vollständig regeneriert werden muss. Geeignete Wasch- bzw. Regenerationslösungen zeichnen sich je nach Anwendung durch hohe Ionenstärken, extreme pH-Werte oder einen hohen Detergenziengehalt aus, um gebundene Moleküle sicher von ihren Bindungspartnern zu lösen. Aus diesem Grund ist es notwendig, die antigene Oberfläche so zu entwerfen, dass eine sehr hohe Stabilität gewährleistet wird.

Zusammenfassend mussten also folgende Vorgaben beachtet werden:

1. Immobilisation geeigneter, optimalerweise klar definierter doppelsträngiger DNA.
2. Schneller Immobilisierungsprozess, welcher im Durchfluß und bei 25°C durchgeführt werden kann.
3. Hohe Stabilität der antigenen Oberfläche, welche für eine Reihe von Messungen in möglichst gleichbleibender Qualität zur Verfügung steht.

Sowohl das häufig für die Immobilisierung von DNA genutzte Biotin/Streptavidin System (z.B. (210)), als auch die Carbodiimid-katalysierte Amidkopplung von 5'-aminierten

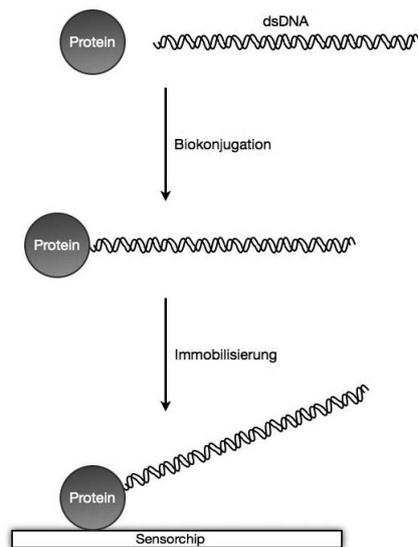


Abbildung 3.2: Grundprinzip der DNA-Immobilisierung unter Verwendung eines Protein-dsDNA-Coatingkonjugates

Oligodeoxynukleotiden (z.B. (211)) hatten sich in Vorversuchen bereits als nicht geeignet erwiesen. Durch die affinitätsbasierte Immobilisierung von biotinylierten ODNs auf präimmobilisiertem Streptavidin konnten zwar hohe Beladungsdichten erreicht werden. Die erhaltenen Oberflächen waren jedoch, trotz der extremen Affinität der Biotin/Streptavidin-Interaktion, nicht stabil genug, um die angestrebte hohe Zahl von Messzyklen zu überstehen. Demgegenüber war die für die Immobilisierung von Proteinen routinemäßig eingesetzte kovalente Immobilisierung unter Ausbildung einer Amidbindung für Oligonukleotide im Durchfluss nicht effektiv genug.

Die Grundidee der hier vorgestellten Strategie war deshalb, ein Protein-DNA-Konjugat zu synthetisieren, welches dann unter Verwendung des Proteinanteils als Immobilisationsanker gerichtet und kovalent auf einer geeigneten Oberfläche angebunden werden kann (Abb. 3.2).

3.1.1 Biokonjugation

Die ersten zu klärenden Fragen betrafen damit den grundsätzlichen Aufbau des Coatingkonjugates: Welches Protein ist geeignet? Wie kann DNA stabil mit einem Protein konjugiert werden? Welche DNA-Komponente soll verwendet werden?

Als Protein wurde humanes Transferrin (hTf) gewählt. hTf ist gut wasserlöslich, günstig, stabil, in hoher Reinheit verfügbar und beinhaltet eine hohe Anzahl von Lysin. Dessen aliphatische Aminogruppen eignen sich sowohl für die geplante Oberflächenimmobilisierung als auch für die Modifikation mit aminreaktiven Crosslinkern. Durch die Funktionalisierung mit verschiedenen Crosslinkern kann so potentiell eine ganze Reihe möglicher Kopplungschemien realisiert werden. Daneben ist hTf in hoher Kon-

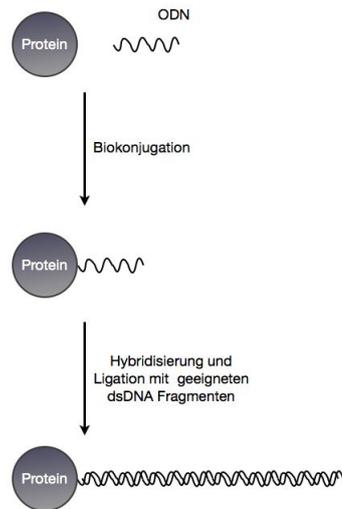


Abbildung 3.3: Grundprinzip der Herstellung des Protein-dsDNA-Coatingkonjugates

zentration (ca. 200 - 360 mg/dl) in humanem Serum vorhanden, sodass immunologische Reaktionen nicht zu erwarten sind.

Der zweite Punkt war bereits deutlich schwerer zu beantworten. Zwar ist die Konjugation von DNA mit Proteinen nicht sehr ungewöhnlich, jedoch werden hier meist Oligonukleotide verwendet (163; 212); für die Konjugation eines längeren, definierten DNA-Strangs an ein Protein sind mir keine Anwendungsgebiete bekannt. Deshalb sollte zunächst ein relativ kurz gehaltenes Oligonukleotid kovalent an Transferrin gekoppelt werden. Das entstehende Produkt sollte - eine geeignete Kopplungschemie vorausgesetzt - stabil sein und sich, aufgrund seiner dem ursprünglichen hTf (Molekulargewicht ca. 80 kDa) nicht zu stark unterschiedlichen Masse (Molekulargewicht eines einzelsträngigen 24-mers ca. 7,8 kDa), gut analysieren lassen. Das gekoppelte Oligonukleotid könnte dann in einem nächsten Schritt mit einem komplementären Strang hybridisiert und über einen passend entworfenen Überhang an ein restriktionsverdautes längeres dsDNA-Fragment ligiert werden, wobei das Design beider Stränge und des Überhangs praktisch frei wählbar ist (Abb. 3.3). Die Frage nach einer geeigneten DNA-Komponente soll dabei ausgiebig im nächsten Abschnitt behandelt werden.

Für die kovalente Kopplung von Oligonukleotiden an Proteine sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, wobei diese meist für Antikörper oder Detektionsenzyme, wie die Alkalische Phosphatase und die Meerrettichperoxidase, ausgelegt sind. Verbreitet sind z.B. die Reaktion von Sulfhydryl-modifizierten Oligonukleotiden mit Maleinimid-modifizierten Proteinen (213; 214) oder ein Crosslinking von Aminfunktionen mit Glutaraldehyd (215), HERMANSON weist unter anderem auf die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den ebenfalls Sulfhydryl-funktionalisierten Komponen-

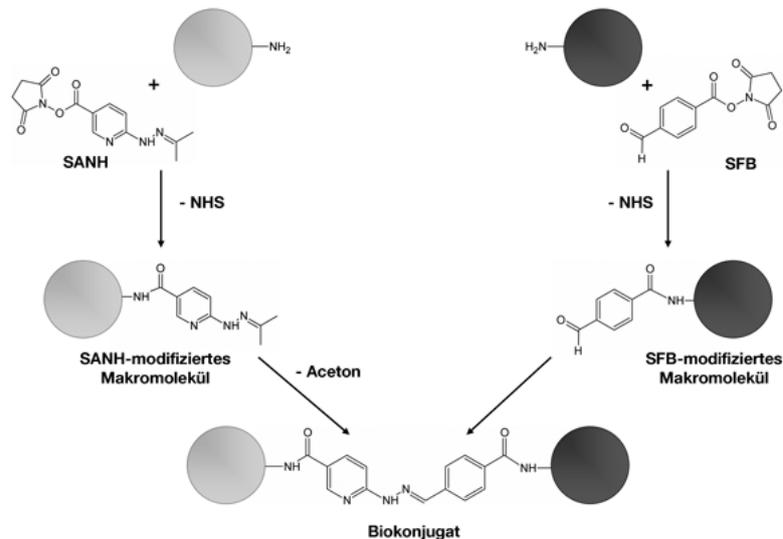


Abbildung 3.4: Prinzip der Biokonjugation von zwei Makromolekülen mit den beiden Crosslinkern SANH und SFB

ten hin (216). Attraktiver erschien die von KOZLOV et al. vorgestellte **Kopplung von Aldehyd- und Hydrazin-modifizierten Komponenten**. Beide reaktiven Gruppen sind in der Regel in natürlichen Biopolymeren nicht vorhanden, werden also erst durch chemische Modifikation kontrolliert eingefügt und sind quantifizierbar. Die entstehenden Produkte sind unter geeigneten Bedingungen stabil, reagieren aber schnell zu einem stabilen Hydrazon, sobald sie miteinander in Kontakt kommen (217; 216). Sowohl für die Einführung von Aldehyden als auch für Hydrazin sind aminreaktive Crosslinker kommerziell verfügbar (patentiert von SCHWARTZ et al. (218; 219), als Hydralink-Technologie vermarktet von Solulink¹). Das Prinzip der chemischen Modifikation mit den beiden aminreaktiven Crosslinkern SANH (für Hydrazin) und SFB (für Aldehyd), sowie die folgende Kopplungsreaktion ist in Abb. 3.4 dargestellt.

Eine eigene Modifikation des Oligonukleotids war in dieser Arbeit nicht notwendig, da dieses bereits während der kommerziellen Synthese mit einem Aldehyd-modifizierten Phosphoramidit am 5'-Ende versehen werden kann. Damit musste nur die Modifikation von hTf mit Hydrazin-Funktionalitäten durch den bifunktionalen Crosslinker SANH durchgeführt werden. Zusätzlich wurde dieses jedoch auch biotinyliert, um sich für den späteren Immobilisierungsprozeß alle Möglichkeiten offen zu halten. Für das Aldehydfunktionalisierte Oligonukleotid, CHO-ODN, wurde, um eine stabile Hybridisierung mit seinem Gegenstrang zu ermöglichen, eine Länge von 24 Basen gewählt, die Wahl der Sequenz war praktisch beliebig (Abb. 3.5).

Für die Biotinylierung wurde ein kommerzielles Kit verwendet und der Erfolg der Modifikation wurde nicht überprüft, da von einer problemlosen Umsetzung ausgegangen werden konnte. Zur Einführung von Hydrazinfunktionen wurde das erhaltene bio-

¹<http://www.solulink.com>

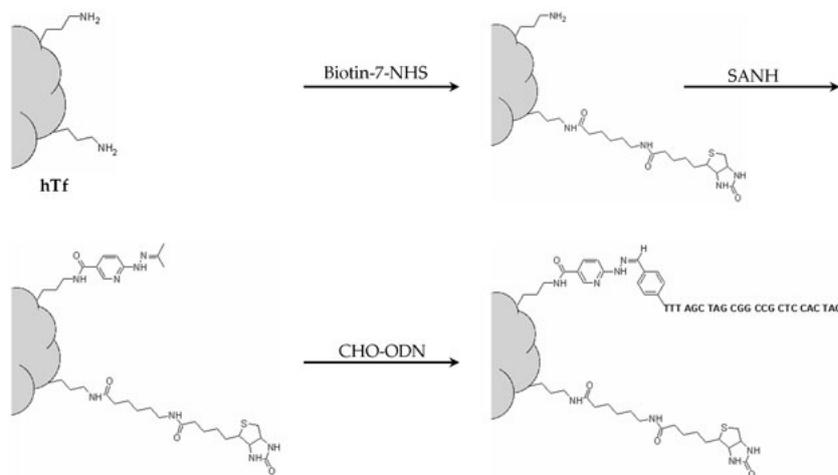


Abbildung 3.5: Syntheschema des biotinylierten Transferrin-Oligonukleotid-konjugates modifiziert nach BUHL et al. (220)

tinylierte hTf dann mit 30 molaren Äquivalenten SANH reagiert. Im Gegensatz zur Biotinylierung sollte das Ausmaß dieser Modifizierung quantifiziert werden. Zum einen bestand die Gefahr, bei der Biotinylierung zu viele verfügbare Aminfunktionen verbraucht zu haben, außerdem sollte die Menge des zu koppelnden CHO-ODN an die vorhandenen Hydrazine angepasst werden. Eine Quantifizierung kann durch Umsetzung mit 4-Nitrobenzaldehyd erreicht werden. Das entstehende Hydrazonderivat absorbiert im Gegensatz zum freien bzw. mit Aceton geschützten Hydrazin bei 390 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $24'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (216), sodass die Konzentration der eingefügten Hydrazine photometrisch leicht ermittelt werden kann. Bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration konnten so zwischen 0,8 und 3,6 Äquivalente SANH eingeführt werden.

Für den ersten Versuch einer Kopplung an DNA wurde hTf benutzt, welches mit durchschnittlich ca. 2,3 Hydrazinfunktionen pro Proteinmolekül modifiziert war. Dieses wurde mit einem auf den Proteingehalt bezogenen 3,7-fachen Überschuss an CHO-ODN umgesetzt, was 1,6 Äquivalenten pro Hydrazinfunktion entspricht. Hierbei kam es zu einer stark ausgeprägten Kopplungsreaktion (Abbildung 3.6). Im SDS-PAGE ist ein heterogenes Produkt (hTf-ODN1) sichtbar, welches aus einer Mischung von unverbrauchtem hTf und höhermolekularen, schwer zu diskriminierenden Produkten bestand.

Durch Färbung eines Geles mit relativ hohen Konzentrationen Ethidiumbromid konnte außerdem der DNA-Gehalt von hTf-ODN1 bestätigt werden (Abbildung 3.7).

Das Experiment wurde zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt, wobei die Modifikationsrate Hydrazin/Protein diesmal 3,6 betrug. Für die Kopplung wurde, bezogen auf die Hydrazinkonzentration, nur ein Äquivalent CHO-ODN benutzt. Unter diesen Be-

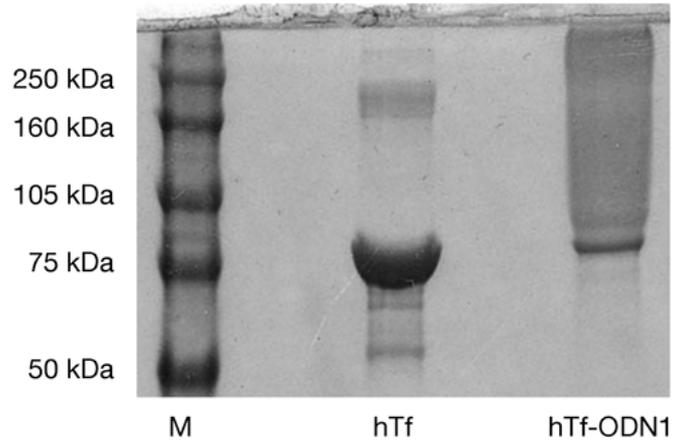


Abbildung 3.6: hTf und hTf-ODN1 im 7,5 % SDS-PAGE. Färbung mit Coomassie Brilliantblau.

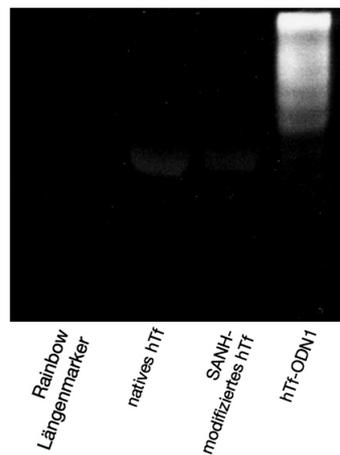


Abbildung 3.7: hTf, SANH-modifiziertes hTf und hTf-ODN1 im 7,5 % SDS-PAGE. Färbung mit Ethidiumbromid.

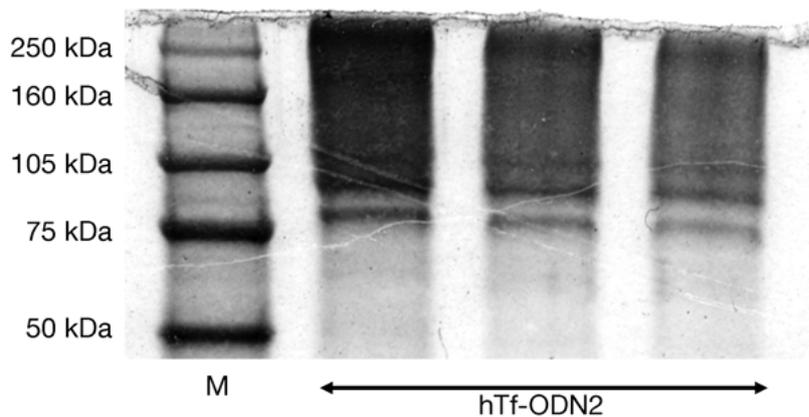


Abbildung 3.8: hTf-ODN2 im 7,5 % SDS-PAGE. Färbung mit Coomassie Brilliantblau. Es wurden von links nach rechts 4, 2,5 und 1,5 μ l Lösung aufgetragen.

dingungen lassen sich nun diskrete Banden erkennen, die vermutlich auf die Kopplung von hTf mit einem, zwei oder mehreren CHO-ODN zustande kommen (Abbildung 3.8). Allerdings neigte das Produkt im SDS-PAGE zum Schmieren.

Im Sinne einer eindeutigen Analytik, und um die Zahl der möglichen späteren Ligationsprodukte zu begrenzen, wurde die Herstellung eines 1:1-Konjugates aus hTf und CHO-ODN angestrebt. Hierzu wurde biotinyliertes hTf mit lediglich zehn Äquivalenten SANH reagiert, was in einer Modifikationsrate von nur 0,83 Hydrazinfunktionen pro Proteinmolekül resultierte. Für die nachfolgende Konjugation wurden dann auch nur 0,24 Äquivalente CHO-ODN pro Hydrazin eingesetzt. Das Produkt hTf-ODN3 wurde anschließend über FPLC aufgereinigt (Abbildung 3.9).

Der Vergleich mit Injektionen von ungekoppeltem hTf und CHO-ODN zeigt, dass die Kopplungsprodukte sauber von unverbrauchtem CHO-ODN getrennt werden können. Obwohl die Hauptpeaks der Chromatogramme von nativem hTf und hTf-ODN3 nicht übereinstimmen (obwohl es sich wohl in beiden Fällen um unkonjugiertes, natives hTf handelt), was vermutlich auf einen schleichenden Qualitätsverlust der Chromatographiesäule zurückzuführen ist, ist deutlich zu erkennen, dass die Komponenten von hTf-ODN3 zu kürzeren Retentionszeiten und damit höheren Molekülgrößen verschoben sind. Um die Identität der Kopplungsprodukte zu bestätigen, wurden Proben ausgewählter Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt. Da die Probe durch die Chromatographie stark verdünnt worden war und keine ausreichende Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen für die Visualisierung der Banden mit Coomassie Brilliantblau erwartet wurde, erfolgte die Detektion im Westernblot mit einem hTf-spezifischen HRP-konjugierten Antikörper. Hierbei zeigt sich in einigen Fraktionen (22, 23, evtl. 27) eine distinkte Bande über dem immer anwesenden unverbrauchten hTf (Abbildung 3.10). Diese stimmt in ihrer Lage grob mit der untersten Bande in den vorherigen Gelen überein (Abbildung 3.8). Da keinerlei höhermolekulare Produkte zu erkennen sind,

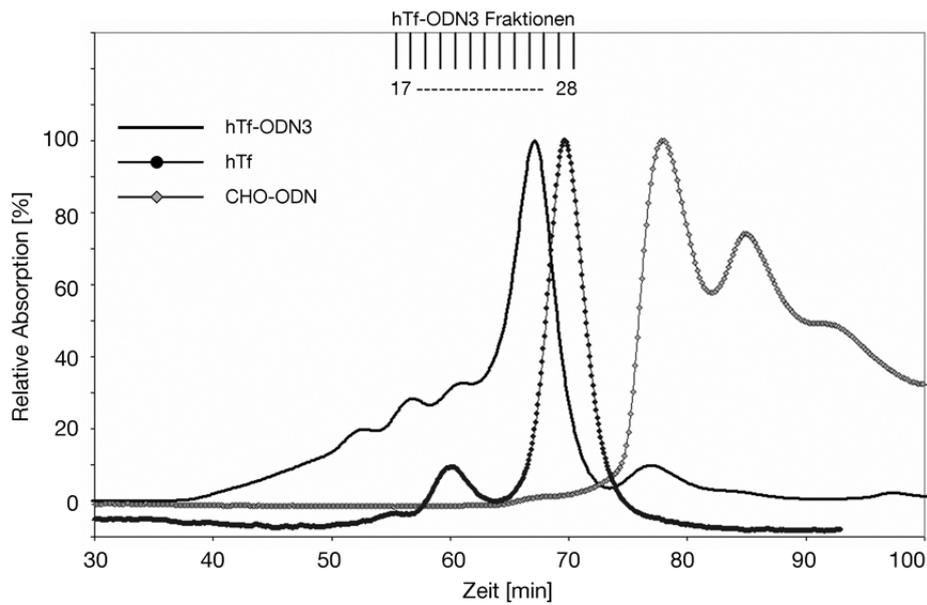


Abbildung 3.9: Gelchromatographische Auftrennung von hTf-ODN3 im Vergleich mit nicht gekoppeltem hTf und CHO-ODN. Von hTf-ODN3 wurden 0,25 ml-Fractionen gesammelt (Detektion bei 280 nm).

wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass es sich bei dem gereinigten hTf-ODN3 um eine Mischung von ungekoppeltem hTf und dem Konjugat von hTf mit CHO-ODN im Verhältnis 1:1 handelte.

Um Verluste zu vermeiden, wurden die Fraktionen 9 bis 24 vereinigt und mit einer Vivaspin 2 30.000 MWCO Ultrazentrifugationseinheit auf etwa 200 μ l aufkonzentriert. Nicht gekoppeltes hTf, das im Produkt zweifellos in hohen Mengen vorhanden ist, stört hier nicht, da es in späteren Reinigungsschritten entfernt wird. Alle hTf-ODN-Präparationen, welche für die folgenden Messungen verwendet wurden, wurden entsprechend hergestellt.

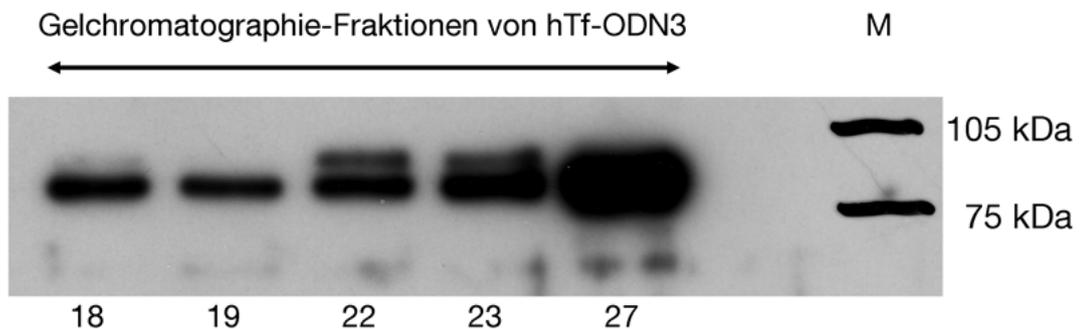


Abbildung 3.10: Ausgewählte Gelchromatographie-Fractionen von hTf-ODN3. Die Auftrennung erfolgte im 7,5 % SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting. M, Protein-Längenmarker

3.1.2 Präparation und Ligation antigener dsDNA

Ein besonderes Problem stellte nach Auswahl eines geeigneten Proteins und erfolgreicher Kopplung an ein ODN nun die dritte offene Frage - die Auswahl und die Präparation des eigentlichen Antigens, doppelsträngiger DNA, dar. Wie oben erläutert, wird für bereits etablierte Methoden dsDNA aus verschiedensten Quellen herangezogen (vgl. Abschnitt 2.3), sodass a priori keine prinzipiellen Einschränkungen für die Wahl des Substrates gegeben waren. Lediglich eine Verunreinigung mit ssDNA und DNA-assoziierten Proteinen (v.a. Histonen), sollte aufgrund der dann zu befürchtenden Kreuzreaktivitäten mit nicht dsDNA-spezifischen Autoantikörpern vermieden werden. Auf der anderen Seite musste die Präparation einen geeigneten Überhang für die Ligation an das hTf-ODN-Konjugat aufweisen. Dies kann z.B. durch Restriktionsverdau von gereinigter humaner DNA mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen erreicht werden. Bei Verwendung von präparierter humaner DNA ist man jedoch mit dem Problem konfrontiert, dass eine sehr inhomogene Präparation erhalten wird, die nur schwer zu charakterisieren ist. Noch gravierender ist die Tatsache, dass die meisten Restriktionsendonukleasen (RENs) palindromische Sequenzen erkennen, also solche Abschnitte, welche auf beiden Strängen, jeweils von 5' nach 3' gelesen, identisch sind. Kommen die so verdauten Fragmente in Kontakt mit DNA-Ligase, ist zu erwarten, dass sie eine Selbstligation eingehen, welche in Konkurrenz zur Ligation an das Konjugat steht. Auch zu Zyklisierungen kann es dabei kommen (Abb. 3.11).

Dieses Problem ist aus der Gentechnologie bei der Insertion von dsDNA in einen bakteriellen Vektor bekannt. In diesem Kontext kann es durch die Wahl geeigneter molarer Verhältnisse zwischen Plasmid und Insert, der Dephosphorylierung des Inserts oder durch ähnliche Strategien gelöst werden. Dies funktioniert jedoch nur aufgrund der Anwesenheit bakterieller Reparaturenzyme bzw. weil Bakterien mit falsch oder nicht ligierten Plasmiden im weiteren Verlauf der Klonierung aussortiert werden, sodass die bekannten Strategien hier nicht ausreichend waren.

Die einfache, wie effektive Lösung des Problems zeigt Abbildung 3.12. Zum einen wurde nicht humane DNA als Substrat verwendet, sondern ein definierter Abschnitt per PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer waren jeweils am 5'-Ende um 12 Basen verlängert, von denen die endständigen 6 Basen als reine Platzhalter dienten. Die zwischen diesem Platzhalter und der eigentlichen Primersequenz liegenden 6 Basen enthielten die Nukleotidsequenz für einen gezielten Restriktionsverdau mit der REN *BssSI*. Dieses Enzym hat die Besonderheit, dass seine Erkennungssequenz nicht palindromisch ist. Dies hat zur Folge, dass nach Abverdau der Strangenden und Reinigung des Produktes Religationen praktisch ausgeschlossen sind. Die entstandene dsDNA enthält an jedem Ende einen 5'-ACGA-3'-Überhang, welcher nicht mit sich selbst kompatibel ist.

Als Templat wurde ein Abschnitt des humanen HFE-Gens verwendet, von dem ein 231 bp langes Fragment amplifiziert wurde. Durch die Verlängerung um 12 bp an je-

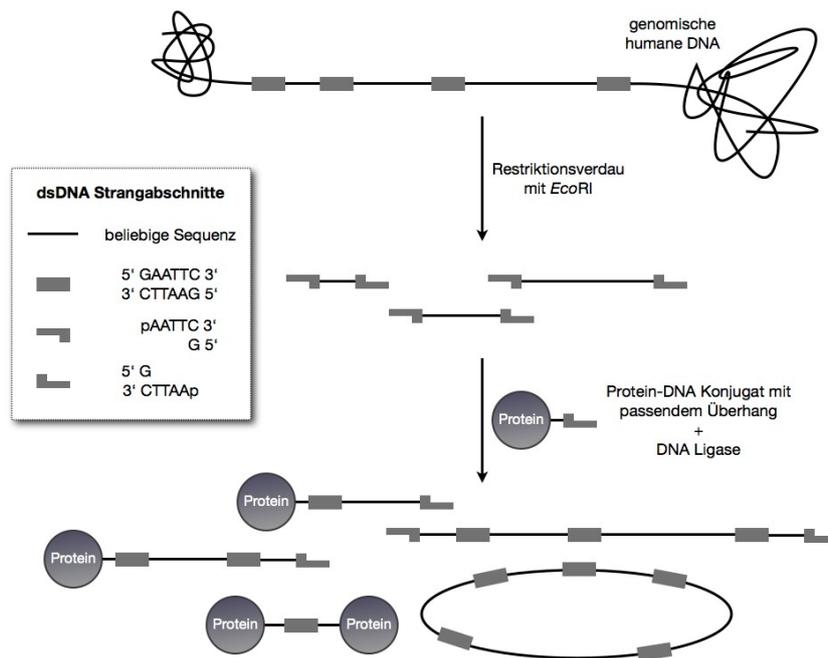


Abbildung 3.11: Der Verdau von genomischer humaner DNA mit RENs, welche palindromische Sequenzen erkennen, gezeigt am Beispiel von *EcoRI*, führt zu einer Vielzahl verschiedener Produkte, welche sich nach Zugabe von DNA-Ligase und hTf-DNA-Konjugat völlig unkontrolliert neu verbinden.

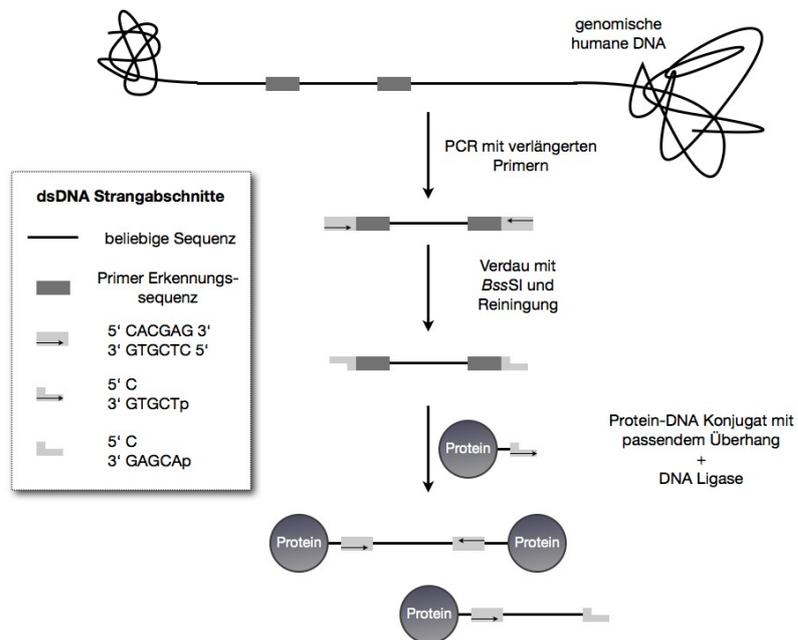


Abbildung 3.12: Die gezielte Einführung der nicht-palindromischen Erkennungssequenz der REN *Bss*SI in beide Enden eines definierten PCR-Produktes zusammen mit dem nachfolgenden Restriktionsverdau führen zu einem homogenen Produkt, welches, einmal aufgereinigt, bei Ligationsreaktionen keinerlei Nebenprodukte bilden kann.

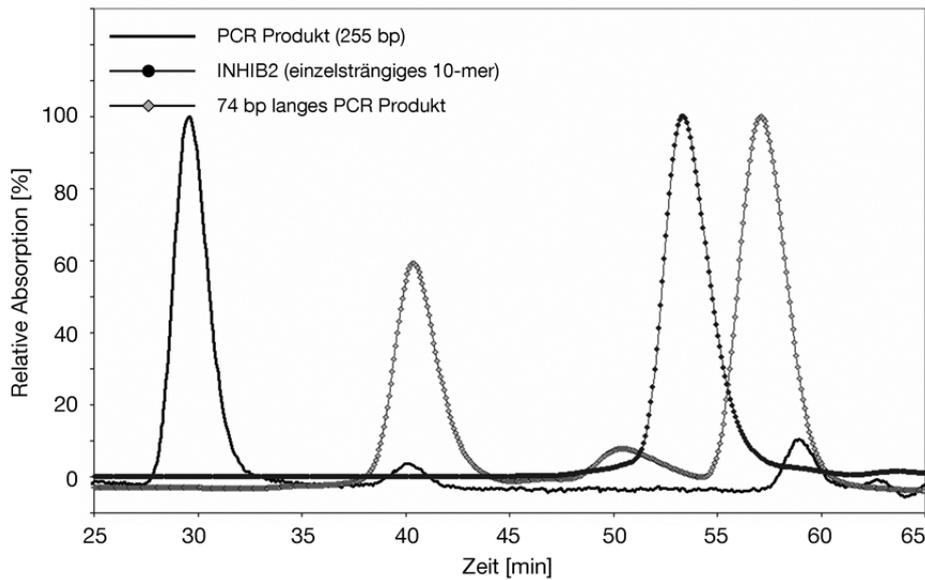


Abbildung 3.13: Gelchromatographische Auftrennung verschiedener DNA Spezies (Detektion bei 280 nm).

dem Ende wurde somit ein 255 bp langes Produkt erhalten, welches in guter Reinheit und Ausbeute dargestellt werden konnte. Dieses wurde anschließend mit *Bss*SI verdaut, wobei - kompletten Verdau vorausgesetzt - ein 233 bp langer Strang mit je einem vierbasigen Überhang an jedem 5'-Ende entstehen sollte. Da die abverdauten Strangenden lediglich eine Länge von 7 bp mit vierbasigem Überhang besitzen, sollten sie leicht entfernt werden können und bei der Ligation an das Protein-ODN-Konjugat nicht mit diesem in Konkurrenz treten. Abbildung 3.13 zeigt das Laufverhalten des unverdauten DNA-Strangs im Vergleich mit sowohl einem 74 bp langen PCR-Produkt und einem 10 Basen langen einzelsträngigen ODN bei der gelchromatographischen Auftrennung. Wie man sieht, ist das 255-bp-PCR-Produkt schon vom 74-bp-PCR-Produkt (bei 55 min, der zweite Peak wird durch nicht verbrauchte Primer verursacht) basisliniengetrennt. Die Entfernung der abverdauten Strangenden sollte damit sauber möglich sein.

Um den Einbau der *Bss*SI-Erkennungssequenz, den erfolgreichen Restriktionsverdau, sowie die korrekte Funktionalität des Überhangs zu bestätigen, wurde das erhaltene PCR-Produkt mit *Bss*SI verdaut und an ein Oligonukleotid ligiert, welches so konstruiert war, dass es unter Ausbildung einer Haarnadel-Struktur den für die Ligation an das *Bss*SI-verdaute Produkt notwendigen 5'-TCGT-Überhang bilden sollte. Hierfür wurden etwa 6,5 pmol verdautes PCR-Produkt, entsprechend 13 pmol reaktive Enden, sowie abweichend von der angegebenen Standardprozedur 100 pmol hairpin-ODN eingesetzt. Wie Abb. 3.14 zeigt, waren alle Schritte erfolgreich. Das PCR-Produkt hat die korrekte Länge (255 bp) und ist nach Restriktionsverdau sichtbar kürzer. Durch Zugabe von Ligase und ein passendes ODN lässt es sich wieder verlängern, sodass der gewünschte 5'-Überhang entstanden zu sein scheint. Lediglich das Entstehen von zwei alternativen

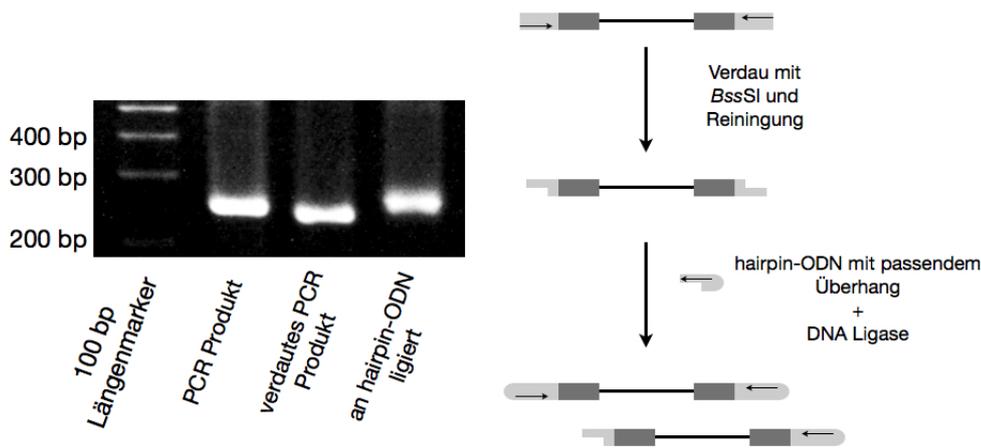


Abbildung 3.14: Überprüfung des korrekten Restriktionsverdaus mit BssSI - Schema und Agarosegel der entsprechenden Produkte

Ligationsprodukten (an nur einem oder an beiden Strangenden) konnte nicht bestätigt werden. Möglicherweise kommt es bei dem eingesetzten 7,7-fachen Überschuss von hairpin-ODN bereits zu einer vollständigen Umsetzung an beiden Enden, oder die beiden Spezies sind im benutzten Gelsystem nicht sauber diskriminierbar.

Auch wenn dies in der vorliegenden Arbeit nicht weiter ausgenutzt wurde, ermöglicht es dieses generische Konzept, prinzipiell jede funktionierende PCR-Reaktion durch simples Verlängern der Primer für die Herstellung von DNA-Sequenzen zur gezielten Ligation an den hTf-Anker zu funktionalisieren. Auf diese Art und Weise kann die Struktur, also die Länge und die Sequenz des dsDNA-Antigens innerhalb gewisser Grenzen beliebig alteriert werden. Es sollte dann lediglich darauf geachtet werden, dass die *BssSI*-Erkennungssequenz nirgends in der amplifizierten Sequenz vorhanden ist.

Das PCR-Produkt wurde anschließend in verschiedenen Verhältnissen mit hTf-ODN3 ligiert. Der Ansatz enthielt außerdem as-ODN, ein Oligonukleotid, welches zum gekoppelten CHO-ODN komplementär ist und mit diesem den passenden Überhang für die Ligation an das verdaute PCR-Produkt ergibt. Die Produkte wurden anschließend im 2.5% Agarosegel analysiert (Abb. 3.15). Dabei waren, abhängig von der hTf-ODN-Konzentration, zwei Banden bei einer apparenten Laufhöhe von ca. 400 und 500 bp sichtbar. Diese wurden auf die Ligation von hTf-ODN3 an ein (Produkt bei 400 bp) bzw. an beide Enden (Produkt bei 500 bp) des PCR-Produktes zurückgeführt (vergleiche Abb. 3.12). In Abwesenheit von hTf-ODN3 sind keinerlei Produktbanden sichtbar.

Beachtenswert sind außerdem die beiden Produktbanden bei einer Laufhöhe von knapp unter 300 bp. Für diese beiden Nebenprodukte liegt leider keine Erklärung vor. Der ursprüngliche, in der Publikation der Daten vorgebrachte Gedanke, es handle sich um die Religation der abverdauten Strangenden an ein bzw. beide Enden des Stranges (220), erscheint bei näherer Betrachtung nicht schlüssig. Wie beim Vergleich mit Abb.

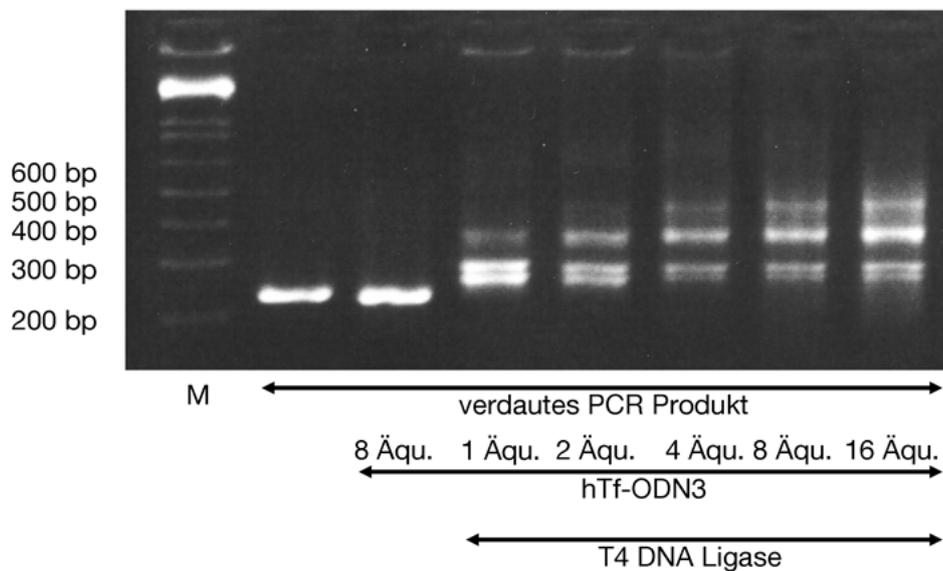


Abbildung 3.15: 2,5 % Agarosegel nach Ligation von hTf-ODN an das verdaute PCR-Produkt in verschiedenen Verhältnissen mit Kontrollen. M, 100 bp Längenmarker. Modifiziert nach BUHL (220)

3.14 deutlich zu sehen ist, stimmt die Länge nicht überein. Eine weitere, plausible Möglichkeit wäre, dass sich in der hTf-ODN3-Präparation trotz der durchgeführten FPLC-Reinigung (Abb. 3.9) noch Reste von ungekoppeltem CHO-ODN befinden. Dieses, hybridisiert mit as-ODN, würde bei Ligation an das PCR-Produkt eine Verlängerung von 233 bp (plus 4 Basen Überhang an jedem Strangende) auf 261 bp (plus 4 Basen Überhang am verbleibenden Ende) bzw. 289 bp (bei Ligation an beide Enden) bewirken, also grob mit der Lage beider Banden übereinstimmen. Nicht ins Bild passt dabei jedoch die offensichtliche Abnahme dieser Nebenprodukte bei steigenden ODN-hTf3-Konzentrationen. Ihre Identität bleibt damit letztendlich ungeklärt. Da aber jegliche DNA-Produkte, welche nicht an hTf gekoppelt sind, beim späteren Immobilisationsprozess auf den Biosensorchip unreaktiv ab gespült werden, stellt ihre Präsenz kein Problem dar. Für die routinemäßige Herstellung von hTf-dsDNA Ligat wurde für alle folgenden Versuche ein vierfaches molares Verhältnis von hTf-ODN zum PCR Produkt gewählt.

Um zu verhindern, dass bei der folgenden Immobilisierung zuviel unligiertes hTf-ODN3 auf der Chipoberfläche befestigt, und die Dichte an dsDNA Antigen damit unnötig erniedrigt wird, wurde das Produkt über die FPLC grob aufgereinigt (Abb. 3.16). Für die Chipbeladung wurden die vor dem PCR-Produkt eluierenden Fraktionen gesammelt, mit einer Vivaspin 30.000 MWCO Ultrafiltrationseinheit auf etwa 100 μ l aufkonzentriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

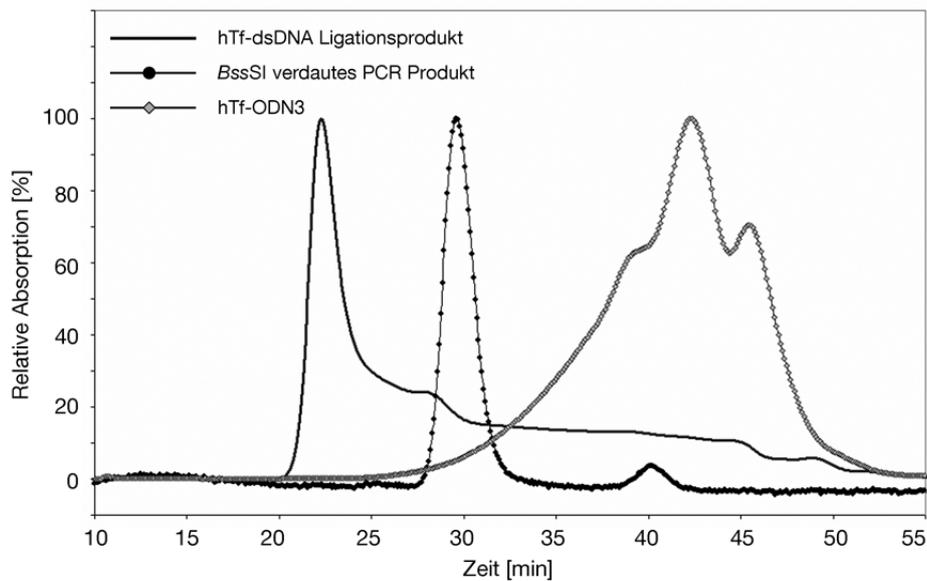


Abbildung 3.16: Gelchromatographische Auftrennung des Ligationsproduktes von hTf-ODN3 und PCR-Produkt im Vergleich mit den nicht ligierten Komponenten (Detektion bei 280 nm).

3.1.3 Immobilisierung auf der Biosensor-Oberfläche

Das entstandene "Coatingkonjugat" aus biotinyliertem hTf und kovalent daran befestigter dsDNA sollte anschließend dem ursprünglichen Ziel gemäß auf einem Biosensorchip immobilisiert werden. Die von Biacore propagierte und von den meisten Nutzern der SPR-Biosensortechnologie präferierte Methode hierfür ist die sogenannte "Aminkopplung", die Carbodiimid-katalysierte Knüpfung von Peptidbindungen zwischen Carboxylfunktionen der Chipoberfläche und Aminfunktionen des Proteins (221). Die Standardprozedur für die Immobilisierung von Proteinen im Durchfluss (Flussrate 5-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) besteht aus (1) Aktivieren der Oberfläche - Erzeugung von NHS-Estern mit einer Mischung von 0,2 M EDC und 0,05 M NHS für 5-10 Minuten, (2) Immobilisieren des Proteins durch Überspülen mit der Proteinlösung für 5-10 Minuten und (3) Deaktivieren der nicht verbrauchten NHS-Ester mit einer 1 M Lösung von Ethanolamin (Abb. 3.17) (222).

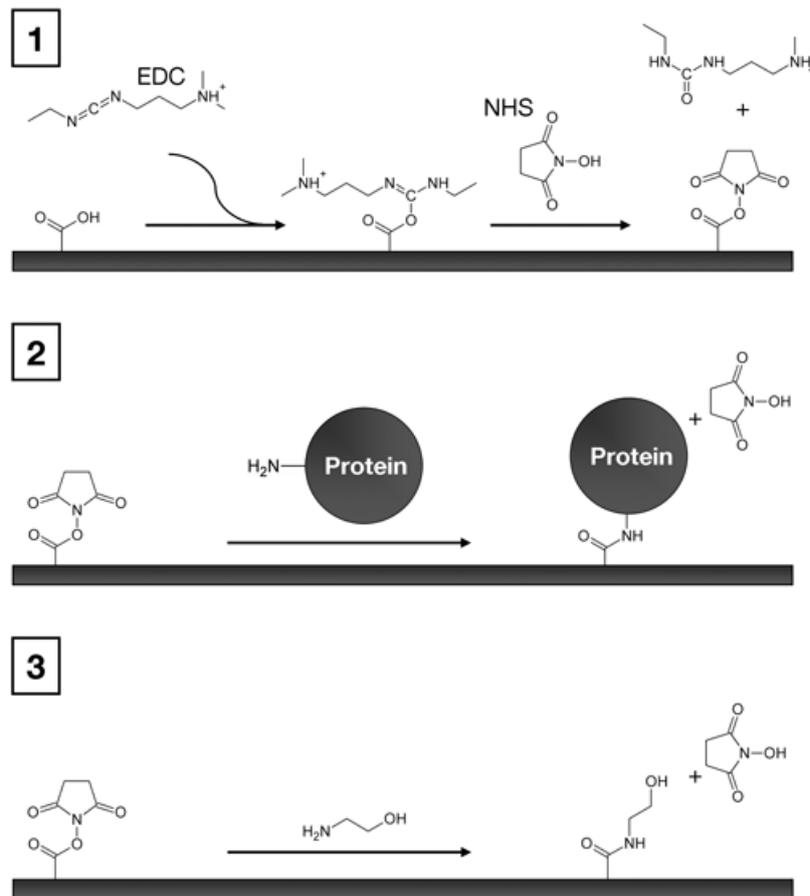


Abbildung 3.17: Die drei Einzelschritte der Aminkopplung sind (1) Aktivierung der Oberfläche mit EDC und NHS, (2) Immobilisierung von Proteinen an die reaktiven NHS-Ester, (3) Entfernen überschüssiger NHS-Ester mit Ethanolamin.

Versuche, das hTf-dsDNA-Konjugat entsprechend der Standardprozedur auf mit Carboxymethyldextran beschichteten Goldchips (Sensorchip CM5) zu immobilisieren, waren jedoch nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Eine plausible Erklärung hierfür ist, dass sowohl die CMD-Oberfläche als auch DNA bei allen zur Knüpfung der Peptidbindung geeigneten pH-Werten negativ geladen sind und sich gegenseitig abstoßen. Eine Vermittlung durch positiv geladene Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Mizellen, wie von SEIDEL et al. berichtet, führte jedoch auch zu keiner Besserung (211).

Aus diesem Grund wurden anschließend Sensorchips verwendet, die mit CMD beschichtet sind, an dem Streptavidin kovalent präimmobilisiert ist (Sensorchip SA). Über die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung konnte hTf-dsDNA (das ja zusätzlich biotinyliert wurde) so sehr effizient gebunden werden (Abb. 3.18). Die gewünschte kovalente Verknüpfung von hTf-dsDNA mit der Oberfläche (CMD und Streptavidin) wurde durch anschließendes Überspülen mit den Crosslinkern EDC und NHS entsprechend Abbildung 3.17 erreicht. Dadurch werden Carboxylfunktionen der Oberfläche aktiviert,

und können sofort mit Aminen aus hTf, das sich nun bereits fixiert in räumlicher Nähe befindet, reagieren. Dieses Immobilisierungsprotokoll verbindet damit die Effizienz des Biotin/Streptavidin-Capturings, das trotz gleicher Ladungen von Coatingkonjugat und Oberfläche sehr gut funktioniert, mit der Stabilität der Aminkopplung. Ob das dem Capturing nachgeschaltete Crosslinking tatsächlich in einer höheren Stabilität der Oberfläche resultiert, wurde dabei nicht systematisch untersucht. Die Referenzoberfläche wurde auf die gleiche Art und Weise mit biotinyliertem hTf beladen, ist also bis auf das Fehlen von DNA sonst chemisch identisch.

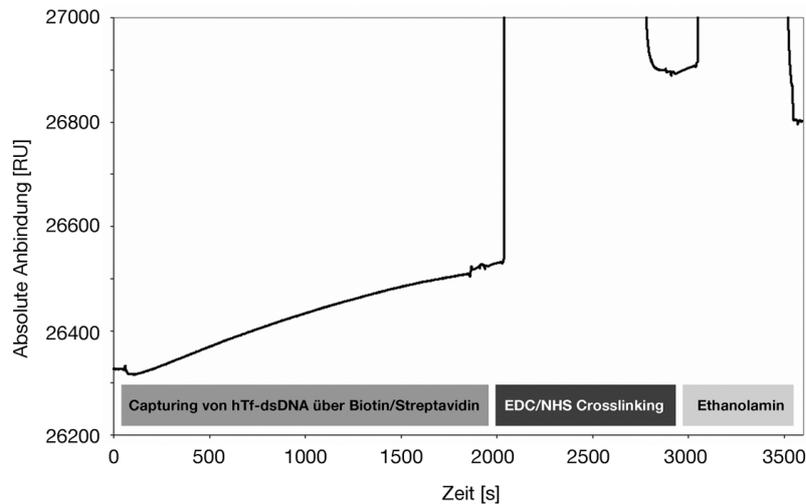


Abbildung 3.18: Typische Immobilisierung von hTf-dsDNA auf einem Sensorchip SA

3.1.4 Zusammenfassung

Im ersten Teil des Projektes wurde eine für Messungen mit dem SPR-Biosensor geeignete Oberfläche realisiert, die kovalent mit doppelsträngiger DNA beschichtet ist. Hierfür musste ein Weg gefunden werden, die Immobilisierung an Beschränkungen des Gerätes anzupassen. Dies schließt eine kurze zur Verfügung stehende Coatingzeit bei möglichst 25 °C, sowie das Arbeiten im Durchfluss ein. Um für viele Messungen zur Verfügung zu stehen, mussten die Oberflächen regenerierbar konzipiert werden, weshalb eine kovalente Immobilisierung angestrebt war.

Die Immobilisierung erfolgt über biotinyliertes humanes Transferrin als Immobilisierungsanker. Dies wurde unter Verwendung des heterobifunktionalen Crosslinkers SANH mit Hydrazin-Funktionen modifiziert und anschließend mit einem 5'-Aldehyd-modifizierten ODN umgesetzt. Durch die Wahl geeigneter Reagenzienverhältnisse konnte ein 1:1-Konjugat aus Protein und Oligonukleotid erzeugt werden.

Das Produkt wurde in einem nächsten Schritt mit einem längeren dsDNA-Strang verbunden. Hierfür wurde ein PCR-Produkt erzeugt, in das an beiden Enden die Erkennungssequenz für das nichtpalindromische Restriktionsenzym *BssSI* eingefügt wurde.

Nach Verdau mit selbigem war eine gezielte Verbindung der beiden Komponenten mit T4 DNA-Ligase möglich.

Für die Immobilisierung wurde das komplette Konstrukt im Durchfluss auf Streptavidin-vorbeschichteten Biosensorchips affinitätsbasiert gebunden und anschließend mit den kovalenten Crosslinkern EDC und NHS fixiert. So konnte eine effiziente, schnelle und trotzdem stabile Oberflächenbeladung bewerkstelligt werden.

3.2 Pilotversuche zur Evaluierung der antigenen Oberfläche

Nachdem erfolgreich ein Protein-dsDNA-Coatingkonjugat hergestellt und auf Biosensorchipoberflächen immobilisiert werden konnte, sollte die Eignung des aufgebauten Systems zur Analyse von anti-dsDNA in ersten Pilotversuchen überprüft werden. Hierzu wurden ähnliche Bedingungen benutzt, wie sie zuvor von METZGER et al. erfolgreich zur Charakterisierung von SHBG eingesetzt wurden (161): eine Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ und ein Injektionsvolumen von 45 μl . Lediglich die Dissoziationsphase wurde aus Gründen der Zeitersparnis von 600 s auf 300 s verkürzt und als Laufpuffer wurde eine Variante des standardmäßig für Biacore-Messungen eingesetzten HBS-EP, HBS-EP250 eingesetzt. Dieser enthält, verglichen mit HBS-EP, eine von 150 mM auf 250 mM erhöhte Konzentration an NaCl, um unspezifische elektrostatische Anbindung an die immobilisierte dsDNA zu vermindern. Seren wurden grundsätzlich im Verhältnis 1:100 mit Laufpuffer verdünnt (1 Teil Serum + 99 Teile Laufpuffer).

3.2.1 Antikörperkontrollen & Referenzoberfläche

Wenn auch keine umfassende Validierung des Messsystems angestrebt war, sollte, um nicht Artefakte zu messen, doch schon während der ersten Phase der Messungen eine minimale Qualitätskontrolle eingeführt werden. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein zu diesem Zeitpunkt verfügbarer muriner anti-dsDNA IgG, HYB331-01. Dieser wurde von HEEGAARD et al. entwickelt und umfassend charakterisiert (223). Er bindet mit hoher Affinität an dsDNA und mit niedrigerer Affinität an ssDNA. Als kritische Negativkontrolle wurde der monoklonale murine IgM F7-26 eingesetzt. Dieser Antikörper findet sonst aufgrund seiner hohen Spezifität für ssDNA Verwendung zur Diskriminierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen (224; 225; 226; 227). Typisch für den Prozess der Apoptose ist das Auftreten von großen Mengen ssDNA, sodass apoptotische Zellen mit F7-26 flowzytometrisch, immunhistochemisch oder immunzytochemisch zuverlässig von nekrotischen Zellen unterschieden werden können, welche im Gegensatz dazu dsDNA freisetzen. Auf dem vorliegenden Biosensorchip war das Entstehen von ssDNA-Bereichen zu befürchten. Sowohl durch die stets vorhandenen Scherkräfte als auch die zur Regeneration eingesetzten aggressiven Lösungen ist eine Trennung der beiden DNA-Stränge denkbar,

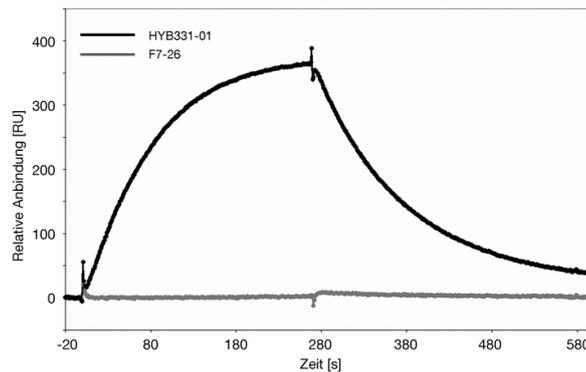


Abbildung 3.19: Sensorgramm der Kontrollen HYB331-01 (positiv) und F7-26 (negativ), jeweils mit einem 1:100 verdünnten Kontrollserum auf eine Endkonzentration von 0,01 mg/ml verdünnt.

um nicht zu sagen auf Dauer wahrscheinlich. Da für HYB331-01 zwar Affinitätswerte publiziert wurden, für F7-26 jedoch nur die angeblich hohe Spezifität für ssDNA bekannt war, wurden beide Antikörper in der gleichen Massenkonzentration von 0,01 mg/ml zu einem 1:100 mit Laufpuffer verdünnten, anti-dsDNA-negativen Kontrollserum addiert. Dabei kam es zu einer starken Anbindung von HYB331-01, während der Einzelstrang-spezifische F7-26 keinerlei Reaktivität zeigte (Abb. 3.19). Auch wenn dies nicht als Garantie für das alleinige Vorhandensein von dsDNA gelten kann, ist es doch ein klarer Hinweis für eine gute Qualität der antigenen Oberfläche.

Wie oben erläutert, stellt die relative Anbindung, welche in den Sensorgrammen zeitaufgelöst dargestellt wird, jeweils das Differenzsignal der beiden Flusszellen FC1 und FC2 dar, von denen eine mit dem dsDNA-Coatingkonjugat, die andere lediglich mit dem Carrier hTf beladen ist. Eine Anbindung von Proben an die Referenzzelle würde dafür sprechen, dass Analytkomponenten unspezifisch an die Chipoberfläche binden. Dies ist aus mehreren Gründen eine realistische Gefahr: zum einen ist auf der Oberfläche sowohl negativ geladenes CMD, sowie positiv geladenes Streptavidin in nicht bekanntem Verhältnis immobilisiert, zum anderen ist die Serummatrix komplex und enthält zahlreiche potentiell störende Komponenten. Um zu verhindern, dass nur Artefakte vermessen werden, wurden für die beiden Kontrollantikörper, sowie für ein negatives Kontrollserum und ein positives Serum einer SLE-Patientin die Signale der einzelnen Flusszellen getrennt ausgewertet (Abb. 3.20).

Hierbei legte keine der vier Proben eine nennenswerte Reaktivität gegenüber der nur mit hTf beladenen Referenzzelle zu Tage.

3.2.2 Die gemessene Anbindung wird durch Immunglobuline verursacht

Auch wenn nun sichergestellt war, dass die gewählte hTf-Referenzoberfläche für die Korrektur des gemessenen Bindungssignals um Bulkeffekte geeignet ist, musste durch

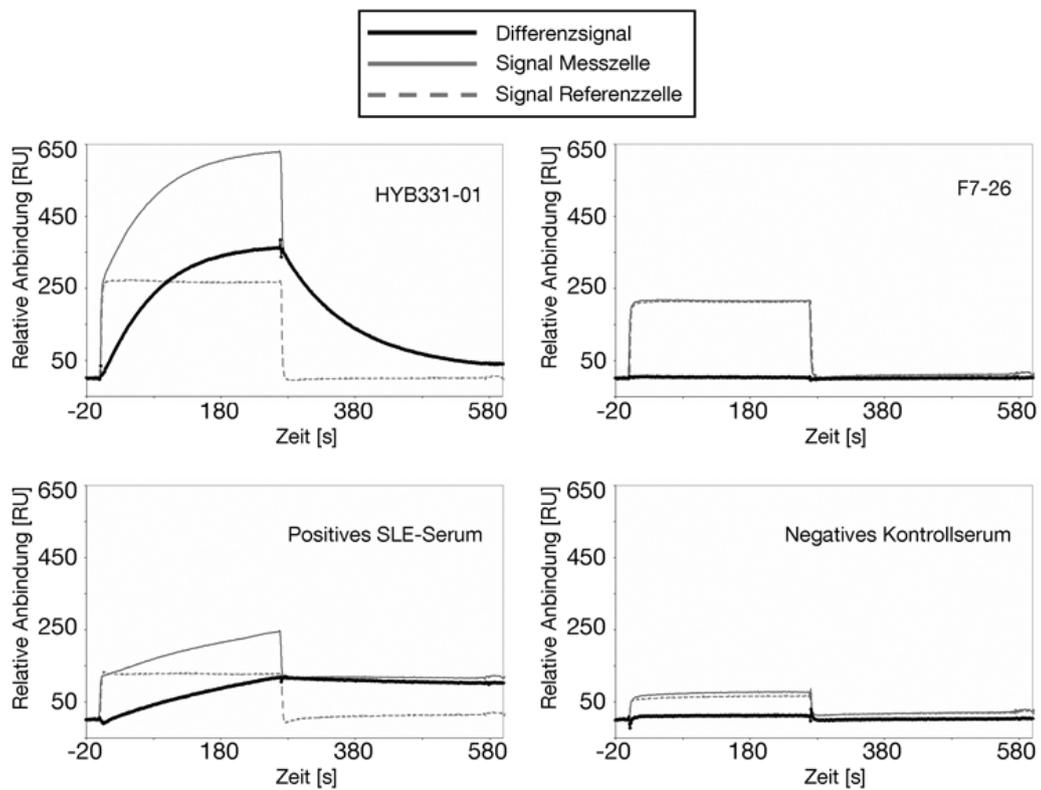


Abbildung 3.20: Die getrennte Auswertung der von beiden Flusszellen erhaltenen Signale demonstriert die Spezifität der Anbindung.

geeignete Versuche sichergestellt werden, dass die gemessene Bindung wirklich durch anti-dsDNA verursacht war. Da die Änderung des Resonanzwinkels letztlich durch eine Änderung des Brechungsindex im dielektrischen Medium und damit durch eine reine Änderung der an der Oberfläche gebundenen Masse hervorgerufen wird, ist in den Biosensorgrammen per se keinerlei Information über den Mechanismus der Anbindung oder die Natur des bindenden Agens enthalten. Im vorliegenden Fall war zu befürchten, dass nicht zur Ig-Fraktion gehörende Bestandteile des Serums an dsDNA binden, entweder auf spezifische (Transkriptionsfaktoren, Polymerasen etc.) oder auf unspezifische Art und Weise (ionische Wechselwirkung mit positiv geladenen Proteinen). Es wurden deshalb einige ausgewählte Seren, sowie die biologische Referenzpräparation der WHO, Wo/80, mit Hilfe **isotypspezifischer anti-human-Ig-Agarose** gezielt von Immunglobulinen befreit und die verbleibende Anbindung der Lösungen untersucht (Abb. 3.21).

Hierbei legte die Positivkontrolle, also das von allen drei relevanten Isotypen IgG, IgM und IgA befreite Serum, in allen Fällen nur eine sehr geringe Reaktivität an den Tag. Im Gegensatz dazu banden alle nicht abgereicherten Negativkontrollen, also die ohne Agarose behandelten Seren, jeweils am meisten, deutlich messbar, an. Die Kurven für Proben, in denen jeweils zwei relevante Isotypen entfernt waren, also noch ein Isotyp präsent war, lagen jeweils zwischen den beiden Extremen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass das gemessene Signal durch die spezifische Anbindung von anti-dsDNA-Autoantikörpern an die mit hTf-dsDNA belegte Messoberfläche verursacht wird. Zusätzlich war für einige Proben eine deutliche Dominanz von anti-dsDNA des IgM-Isotyps (in Seren k-1, a-1), für andere des IgG-Isotyps erkennbar (Seren c-1, n, b-7). Nennenswerte Mengen IgA-anti-dsDNA konnten in keiner der Proben identifiziert werden, obwohl diese auch bei SLE-Patienten prinzipiell beschrieben sind. Für die anderen Proben war eine deutliche Dominanz eines Isotyps nicht sichtbar, was unter Umständen auf die a priori niedrige Anbindung dieser Seren zurückgeführt werden kann.

3.2.3 **Kompetition**

Um die Spezifität des anti-dsDNA-Assays weiter zu bestätigen, wurden die 1:100 verdünnten SLE-Seren a-1, b-3 und b-6 mit verschiedenen Konzentrationen DNA aus Lachssperma vor der Vermessung präinkubiert. Die Anbindung konnte dabei in allen drei Fällen konzentrationsabhängig inhibiert werden (Abb. 3.22 A). Serum b-6 wurde analog mit dem einzelsträngigen Oligonukleotid ODN1 (26 Basen) und dem doppelsträngigen Oligo ODN1/2 (24 bp mit 4 Basen Überhang) inhibiert (Abb. 3.22 B). Diese, verglichen mit der in den gängigen anti-dsDNA-Labortests eingesetzten dsDNA relativ kurzen Oligos, sind damit in ihrer Länge offenbar schon ausreichend für die Bindung von anti-dsDNA. Zwischen der einzel- und doppelsträngigen Form ist dabei kein deutlicher Unterschied sichtbar.

Desweiteren wurde für Serum a-1 unmittelbar nach Ende der Assoziationsphase mit

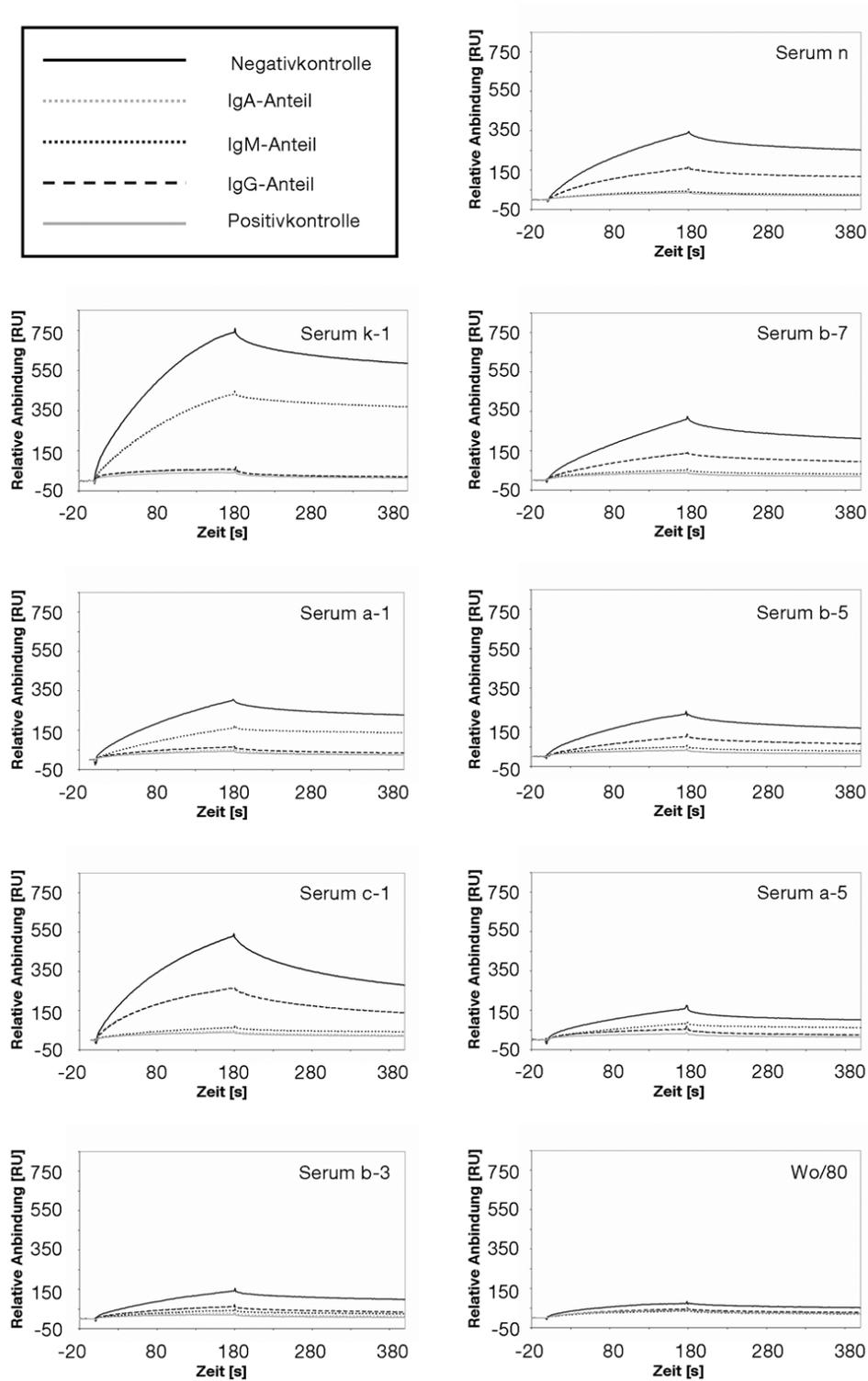


Abbildung 3.21: Isotypverteilung in ausgewählten Seren und dem WHO-Standard Wo/80. Gezeigt sind die Bindungskurven von 1:100-Verdünnungen der Proben nach spezifischem Entfernen der einzelnen Isotypen.

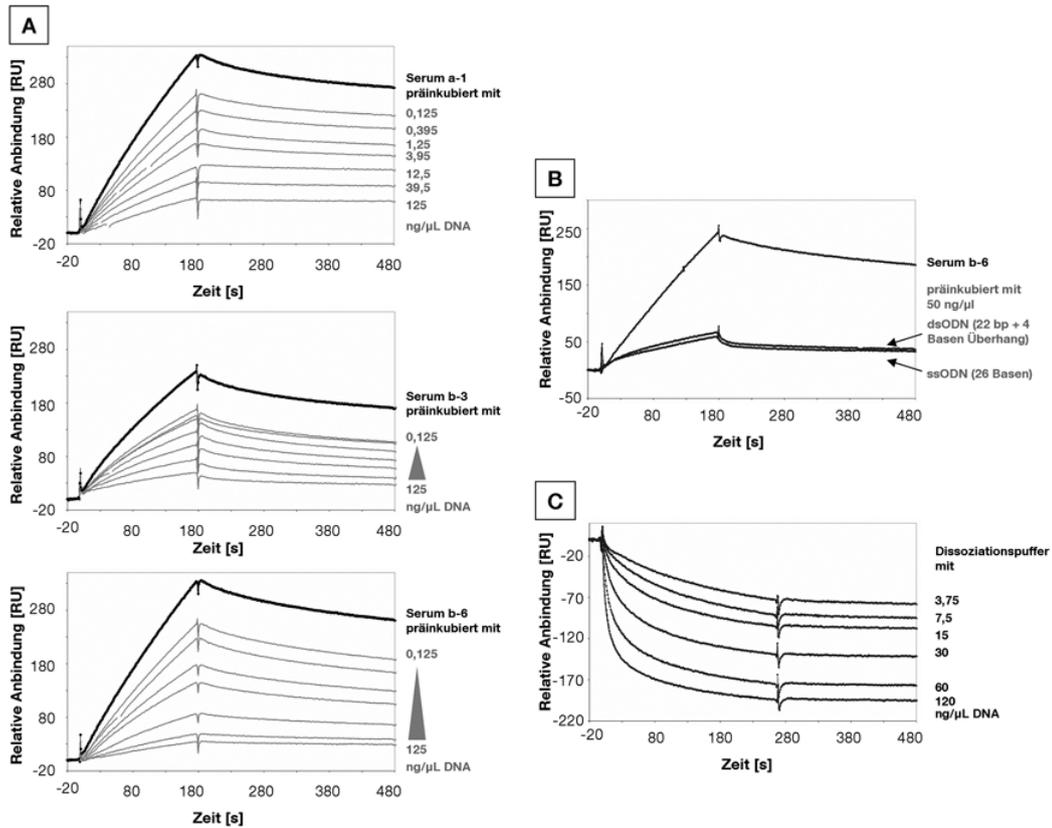


Abbildung 3.22: SPR-Sensorgramme. (A), Inhibition von anti-dsDNA durch Präinkubation von SLE-Seren mit Lachssperma-DNA. (B), Inhibition von anti-dsDNA durch Präinkubation eines SLE-Serums mit einem ss- und dsODN. (C), beschleunigte Immunkomplexdissoziation mit Lachssperma-DNA im Dissoziationspuffer.

verschiedenen Mengen Lachssperma-DNA versetzter Laufpuffer injiziert (Abb. 3.22 C). Die Dissoziation der anti-dsDNA von der Chipoberfläche wird dabei konzentrationsabhängig stark beschleunigt. Dieser Effekt deutet auf ein starkes "back-binding" bzw. "re-binding" der Antikörper hin, d.h. sie binden nach erfolgter Dissoziation des Immunkomplexes erneut an die immobilisierte DNA, was durch die Konkurrenz mit DNA im Laufpuffer vermindert wird. Dieses Verhalten führt zu einer erniedrigten apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante und ist im vorliegenden Versuchsaufbau in hohem Maße zu erwarten und kaum zu verhindern. Verantwortlich dafür ist wohl die hohe "intrinsische" Epitopdichte der DNA. Da anti-dsDNA nicht, wie proteinogene Antigene, über ein einzelnes Epitop pro Molekül verfügt, sondern anti-dsDNA praktisch an jeder Position des Phosphodiester-Rückgrats binden können, treffen diese nach Dissoziation mit hoher Wahrscheinlichkeit schnell auf eine neue Bindungsstelle.

3.2.4 Messung von Serumproben

Ein möglicher Einsatz des Biosensors ist die Analyse von Patientenproben zu diagnostischen Zwecken. Um die Eignung hierfür festzustellen, wurden 42 Serumproben von SLE-Patienten auf einem einzigen Chip vermessen, und mit den Ergebnissen der Seren von 18 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen und 39 gesunden Probanden verglichen. Schon graphisch stellt sich eindeutig dar, dass beide Gruppen gut voneinander diskriminiert werden können (Abb. 3.23 A und B). Um die erhaltenen Kurven systematischer auswerten zu können, wurden die relativen Anbindungen jeweils am Ende der Assoziationsphasen ausgelesen (vgl. Abb. 3.23 C). Als Wert für die Fähigkeit des Tests, zwischen den beiden Patientenkollektiven zu unterscheiden, kommen dabei Sensitivität und Spezifität in Betracht. Dafür wird ein Grenzwert definiert, d.h. ein bestimmter Wert (hier eine Relative Anbindung in RU), oberhalb dessen der gemessene Wert als indikativ für einen bestimmten Zustand (hier SLE) betrachtet wird. Dieser wurde für den Biosensor ursprünglich als Mittelwert plus zwei Standardabweichungen aller Kontrollen als 25 RU berechnet (220). Wertet man nun alle darunter liegenden Kontrollen als richtig negativ (true negative, TN), darüber als falsch positiv (FP), alle darunter liegenden SLE-Seren als falsch negativ (FN), darüber als richtig positiv (TP), so lassen sich Sensitivität und Spezifität aus der Anzahl der in den entsprechenden Kategorien befindlichen Proben wie folgt berechnen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{TP}{TP + FN}$$

d.h. die Sensitivität ist der Anteil der richtig gemessenen positiven Proben, während

$$\text{Spezifität} = \frac{TN}{TN + FP}$$

d.h. die Spezifität ist der Anteil der richtig negativ gemessenen Kontrollen (228).

Mit 25 RU als Grenzwert ergaben sich dabei die Werte von 98,2 % (Spezifität) und

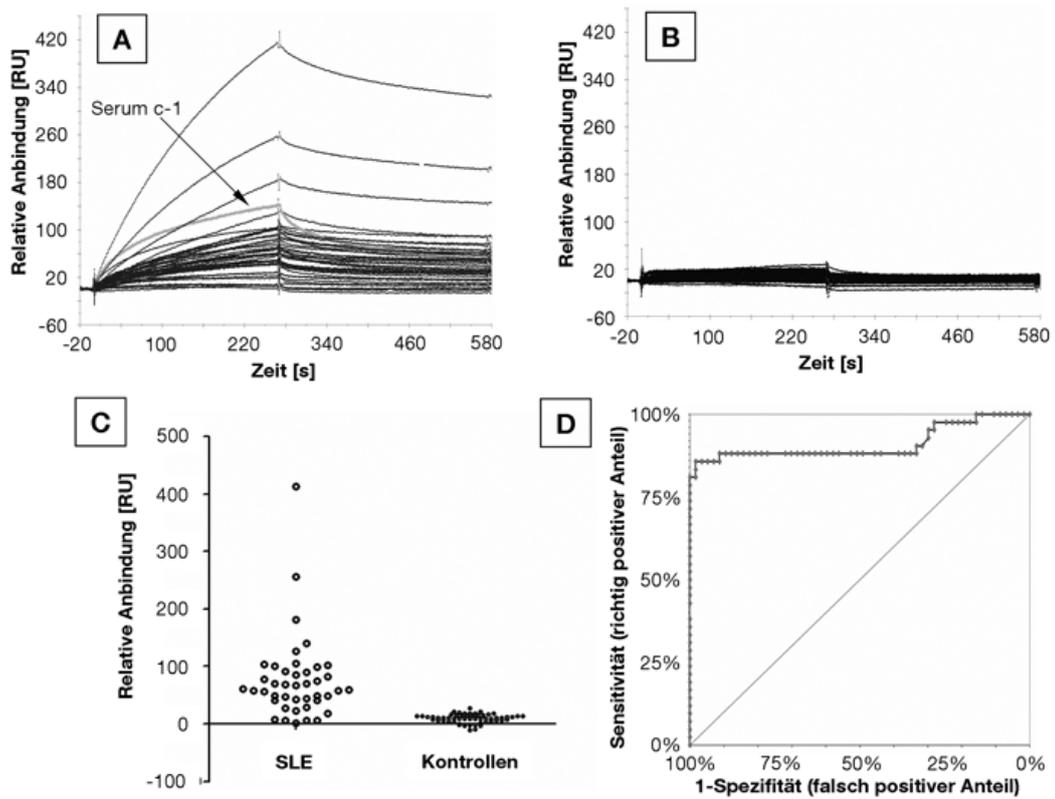


Abbildung 3.23: Sensorgramme der 1:100 verdünnten SLE-Seren (A) und Kontrollen (B), ausgelesene Anbindungswerte im Vergleich (C), sowie ROC-Plot der beiden Gruppen (D).

83,3 % (Sensitivität). Ein noch umfassenderes Bild der Testqualität ergibt der **Receiver Operating Characteristic Plot** (229). Dabei handelt es sich um die graphische Auftragung aller grundsätzlich möglichen Sensitivität/Spezifität Paare gegeneinander für alle denkbaren Grenzwerte (Abb. 3.23 D). Aus dem Graphen kann dann ein optimaler Kompromiss zwischen dem Erhalt falsch positiver und falsch negativer Werte gefunden werden. Für den Biosensor zeigte sich dabei, dass sich durch Senkung des Grenzwerts auf 22 RU die Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität auf 85,7 % steigern lässt. Als weiteres Qualitätsmerkmal kommt die Fläche unter der ROC-Kurve in Betracht, die hier mit 0,911 (bei einem maximal möglichen Wert von 1 bei perfekter Diskriminierung) als sehr gut zu bewerten ist.

Grundsätzlich lässt sich damit behaupten, dass das Prinzip des aufgebauten Biosensors funktioniert und dieser zum diagnostischen Testen bei Verdacht auf SLE eingesetzt werden kann. Als kritisch ist jedoch zu bewerten, dass die ausgewählten Positivproben auf eine gewisse Art und Weise vorselektiert waren, in dem Sinne, dass sie zum überwiegenden Teil auch ein positives Ergebnis im Farr-Assay erzeugt hatten (vgl. Tab. 3.2).

Ein genauerer Blick auf die erhaltenen Ergebnisse offenbart einige Zusatzinformationen. Zum einen kann der direkte Vergleich der gemessenen Zahlenwerte mit dem Farr-Assay erfolgen (Abb. 3.24). Idealerweise sollte hier ein linearer Zusammenhang bestehen, was jedoch nicht der Fall ist ($r^2 = 0,05$ bei linearer Regression, nicht gezeigt). Beschränkt man sich auf die rein qualitative Aussage, ob ein Ergebnis als positiv oder negativ zu bewerten ist, so stimmen beide Tests in weiten Teilen überein. Im Biosensor negativ bei positivem Farr RIA sind ausschließlich Serumproben von Patient i. Auch unter den SPR-positiven, Farr-negativen Seren finden sich neben den Patienten d, j und m, wiederum gleich mehrere Proben von Patient g. Es drängt sich also der Verdacht auf, dass es sich bei Abweichungen zwischen den beiden Methoden nicht um zufällige Schwankungen, sondern um systematische Unterschiede handelt. Während zwar beide Systeme prinzipiell alle vorhandenen anti-dsDNA-Isotypen messen, werden solche vom IgM-Typ im Biosensor aufgrund ihrer im Vergleich zu IgG etwa fünfmal höheren Masse stärker gewichtet. Dazu kommt, dass im SPR-System auch schwächere Interaktionen beobachtet werden können, außerdem ist die Anbindungsstärke direkt abhängig von den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion.

Interessant ist auch ein optischer Vergleich der Anbindungskurvenformen. Im Gegensatz zu Seren von APS-Patienten, die sich auf einem mit $\beta 2$ -Glykoprotein I gecoateten Chip deutlich unterschiedlich verhalten (173), sind die Kurvenformen der SLE-Proben relativ ähnlich. Der verbleibende Anteil der Anbindung nach 300 s Dissoziation (Tab. 3.2) schwankt hier lediglich zwischen etwa 40 und 88% (APS: ca. 10 - 80%), auch die Kurvenformen der Assoziationsphasen unterscheiden sich kaum. Nur wenige einzelne Proben (vgl. c-1 in Abb. 3.23 A) zeichnen sich durch schnellere Assoziations- und Dissoziationsraten aus. Hier stellt sich die Frage, ob dies als diagnostisch relevant an-

Identifikator	SPR-Bindungsvariablen		
	Farr-assay [U/ml]	Relative Anbindung [RU]	Restbindung [%]
a-1	100,9	181,6	79,8
a-2	44,0	102,7	75,1
a-3	31,0	85,5	79,1
a-4	27,2	83,0	73,4
a-5	19,7	57,2	80,6
b-1	94,9	78,2	75,7
b-2	105,0	101,3	87,7
b-3	91,0	69,9	70,4
b-4	112,0	69,4	67,1
b-5	175,0	91,6	67,8
b-6	263,6	127	69,6
b-7	364,0	105,3	70,0
b-8	99,2	69,9	55,4
b-9	80,0	60,5	59,2
b-10	57,5	60,0	53,8
c-1	75,0	140,8	40,3
c-2	52,4	103,2	51,0
d-1	6,5	66,5	76,5
d-2	7,0	58,5	74,0
d-3	9,1	58,3	82,2
e	17,0	48,1	43,2
f-1	122,0	74,7	40,3
f-2	36,0	42,0	40,0
g-1	6,3	41,4	65,7
g-2	4,1	18,6	44,1
g-3	6,7	27,2	63,6
g-4	6,8	89,9	66,4
g-5	7,1	99,6	64,0
g-6	18,1	44,8	63,2
h-1	86,9	47,1	65,2
h-2	70,4	48,4	65,1
h-3	49,0	41,0	67,1
i-1	15,1	23,1	45,5
i-2	12,0	7,8	n.b.
i-3	11,8	1,1	n.b.
i-4	19,6	6,8	n.b.
j	5,2	49,1	51,3
k-1	42,1	412,7	78,8
k-2	26,1	256,7	78,9
l-1	4,2	6,3	n.b.
l-2	< 5	6,5	n.b.
m	6,9	28,6	54,9

Tabelle 3.2: Anti-dsDNA Konzentrationen in Seren von SLE-Patienten, bestimmt mit dem Farr RIA, sowie SPR-Bindungsvariablen "Relative Anbindung" am Ende der Assoziationsphase und "Resbindung" nach 300 s Dissoziation. n.b., nicht bestimmt.

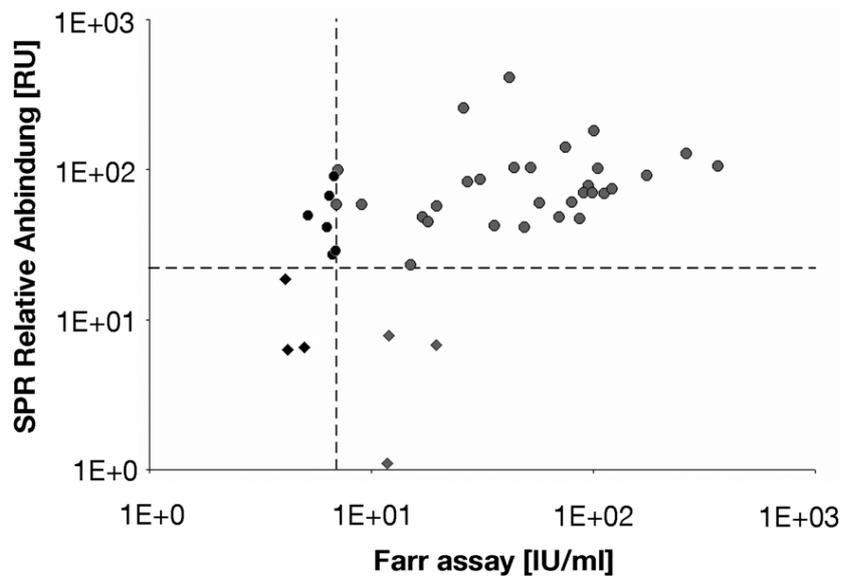


Abbildung 3.24: Vergleich der im Biosensor beobachteten relativen Anbindung von SLE-Seren mit den im Farr RIA erhaltenen Werten.

gesehen werden kann. Eine Verlangsamung der Dissoziation und die damit verbundene "Angleichung" der Kurven gilt als typische "makroskopische" Auswirkung des bereits erwähnten Rebinding-Effekts und könnte damit ein Artefakt sein.

3.2.5 Wiederholpräzision

Um einen ersten Eindruck der Wiederholpräzision des Systems zu bekommen, wurde Serum c-1 an vier aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt elfmal injiziert (Abb. 3.25). Dabei reichte der Variationskoeffizient der Anbindungen innerhalb eines Tages von 1,2 bis 2,0 %, während er über alle Messwerte 8,0 % betrug. Der Frage, ob hier ein Abwärtstrend im Sinne eines Verlustes von Antigen, oder eine reine Schwankung beobachtet wurde, wurde an dieser Stelle nicht nachgegangen.

3.2.6 Zusammenfassung

Im zweiten Teil des Projektes wurde die Tauglichkeit des im ersten Teil entwickelten Biosensors für die Messung von anti-dsDNA Autoantikörpern demonstriert. Antikörper-positiv- sowie -negativkontrollen zeigen das gewünschte Bindungsverhalten. Weder gereinigte Antikörper noch verdünnte Seren binden in nennenswertem Ausmaß auf die als Referenz vorgesehene hTf-Oberfläche.

Durch eine isotypspezifische Abreicherung von Antikörpern aus Seren mit anschließender Analyse auf dem anti-dsDNA Biosensor konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Anbindung tatsächlich durch Immunglobuline verursacht wird und nicht durch unspezifische Effekte zustande kommt.

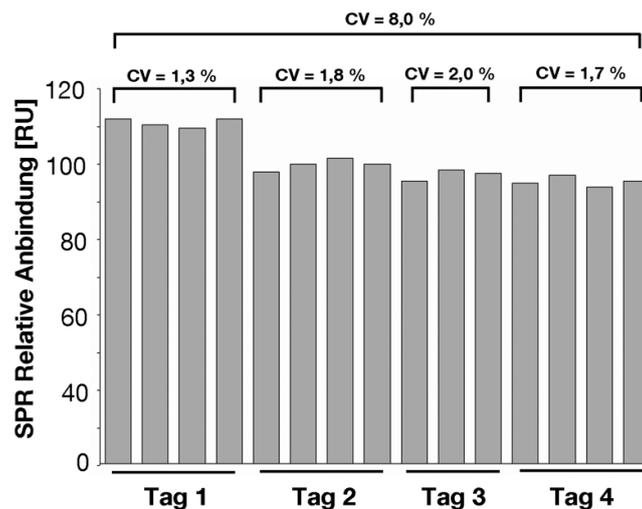


Abbildung 3.25: Relative Anbindung der 1:100-Verdünnung von Serum c-1, an 4 aufeinanderfolgenden Tagen auf einem Chip gemessen. CV, Variationskoeffizient.

Eine kleine Pilotstudie zeigt außerdem, dass das System gut geeignet ist, um die Seren von SLE-Patienten von denen nicht an SLE erkrankter Personen zu unterscheiden. Ein klinisch-diagnostischer Einsatz ist damit möglich.

3.3 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Im Anschluss an die erfolgreich durchgeführten Pilotmessungen wurde der Biosensor vor dem Hintergrund der Assaykalibrierung bzw. -standardisierung für die Charakterisierung monoklonaler anti-dsDNA Antikörper benutzt. Bedenkt man die Wichtigkeit der korrekten anti-dsDNA Bestimmung für den Prozess der SLE-Diagnose, ist es äußerst erstaunlich, wie unvollständig dieses Thema bisher gelöst wurde.

Das übliche Vorgehen zur Quantifizierung von Autoimmunantworten ist, ein Patientenserum mit bekanntem Autoantikörpergehalt zur Generierung einer internen Standardkurve zu benutzen, anhand derer der Autoantikörpergehalt einer unbekanntes Probe in auf den Standard bezogenen "Units" bestimmt werden kann (230). Dieses Vorgehen erscheint auf den ersten Blick vernünftig, da der Grundsatz, zur Kalibration eines Testsystems eine zum Analyten identische Referenzsubstanz einzusetzen (231), hier aus offensichtlichen Gründen nicht erfüllbar ist. Wie oben ausgeführt, war der in kommerziellen Testsystemen bisher verwendete Kalibrator die biologische Referenzpräparation Wo/80 der WHO, ein humanes Serum eines einzelnen Patienten mit polyklonaler Reaktivität gegen dsDNA (6). Bei kritischer Betrachtung, ist Wo/80 hier höchstens als Positivkontrolle, jedoch nicht als Kalibrator einzusetzen. SIMON et al. nennen folgende Gründe, die gegen den Einsatz polyklonaler Seren zur Kalibration von Immunoassays

sprechen (230):

1. Die häufig mangelhafte Monospezifität birgt die Gefahr, ein auf Kreuzreaktivitäten basierendes Signal zu messen.
2. Die im polyklonalen Serum vorhandenen Autoantikörper unterscheiden sich hinsichtlich Spezifität/Kreuzreaktivität, Affinität, Isotyp und Konzentration, was zu abweichenden Ergebnissen in unterschiedlichen Assays führen kann.
3. Die verfügbare Menge ist grundsätzlich stark limitiert.

Punkt 3 wird häufig durch Rekalibration umgangen, jedoch macht der auch von FELTKAMP et al. eingebrachte Vorschlag, nationale, regionale oder lokale Standards durch Kalibration mit Wo/80 zu etablieren, wenig Sinn, wenn man Punkt 2 bedenkt: da verschiedene Testsysteme verschiedene Subgruppen von anti-dsDNA messen und diese auch unterschiedlich gewichten (232), wird ein sekundärer Standard, der auf einem bestimmten analytischen System kalibriert wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einem anderen System völlig disparate Ergebnisse liefern. So kann zum Beispiel ein IgM-dominiertes Serum im Farr-Assay potentiell zu sehr hohen Messwerten führen, während anti-dsDNA vom IgM Isotyp im CLIF überhaupt nicht erfasst werden.

Neben Isotyp, Konzentration und Affinität, spielt die Reaktivität gegen ssDNA eine wichtige Rolle. Während, wie oben detailliert ausgeführt, Autoantikörper gegen dsDNA, welche auch ssDNA binden, durchaus diagnostisch relevant sind, sind Autoantikörper gegen ssDNA, welche nicht an dsDNA binden, nicht krankheitsspezifisch für SLE (233).

Daher sollten an einen geeigneten Kalibrator damit folgende Anforderungen gestellt werden:

1. Er ist über einen langen Zeitraum in gleichbleibender Qualität verfügbar.
2. Seine Eigenschaften, also Isotyp, Spezifität/Kreuzreaktivität, Affinität und Konzentration sind bekannt, gleichbleibend, und in eindeutigen Werten ausdrückbar.

Ein solcher Kalibrator würde dazu führen, dass nicht mehr die Eignung des Standards zur Kalibrierung eines bestimmten Testsystems überprüft werden muss, sondern im Gegenteil die Eignung eines Testsystems überprüft werden kann, Antikörper mit bestimmten, bekannten Eigenschaften zu erfassen. Damit könnten im Umkehrschluß Aussagen über die Zusammensetzung von anti-dsDNA positiven Patientenseren möglich werden.

Die folgenden Ergebnisse stellen den Versuch dar, drei verfügbare monoklonale anti-dsDNA unter Verwendung des SPR-Biosensors möglichst umfassend zu charakterisieren. Monoklonale Antikörper erfüllen die oben formulierten Anforderungen in hervorragender Weise.

3.3.1 Messung im Farr-Assay

Um einen ersten Eindruck von den Eigenschaften der monoklonalen Antikörper zu erhalten, wurden diese im Farr-Assay gemessen. Der oben beschriebene Farr-Assay ist eine sehr gängige Methode zur Detektion von anti-dsDNA. Wie bereits erläutert, deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass er selektiv nur hochavide Immunglobuline erfasst (5; 234). Die beiden kommerziell erhältlichen anti-dsDNA IgG, dsDNA-mAb32 und dsDNA-mAb33, werden als Kalibratoren für anti-dsDNA-Assays vertrieben und dafür jeweils mit einer Aktivitätsangabe in IU/ml versehen, die auf der Kalibration gegen Wo/80 in einem nicht näher beschriebenen ELISA beruht. Demzufolge weist dsDNA-mAb32 eine Aktivität von $1,4 \times 10^5$ IU/ml bei einer Proteinkonzentration von 0,43 g/l auf, während dsDNA-mAb33 eine Aktivität von $2,2 \times 10^5$ IU/ml bei einer Konzentration von 0,075 g/l hat.

Zur Messung wurden die Antikörper jeweils in ein mehrfach negativ getestetes Kontrollserum verdünnt und in Triplikaten vermessen. Gemäß den Aktivitätsangaben des Herstellers war mit Messwerten von 1400 bzw. 140 IU/ml für dsDNA-mAb32 (1/100 und 1/1000 verdünnt) und 2200 bzw. 220 IU/ml für dsDNA-mAb33 (1/100 und 1/1000 verdünnt) zu rechnen. Die Proteinkonzentrationen der beiden Antikörper lagen dabei zwischen 0,075 µg/ml und 4,3 µg/ml. Da für HYB331-01, den bereits für die Pilotmessungen als Positivkontrolle eingesetzten Maus IgG, keine Aktivitätsangabe verfügbar war, wurde er in vergleichbaren Konzentrationen von 5 µg/ml und 0,5 µg/ml eingesetzt. Überraschenderweise wurde nur bei dsDNA-mAb32 ein positives Ergebnis erhalten (Tab. 3.3), und zwar bei beiden eingesetzten Konzentrationen. Außerdem war der erhaltene Aktivitätswert deutlich niedriger als erwartet.

	Proteinkonzentration [µg/ml]	Aktivität laut Herstellerangaben [IU/ml]	gemessene Aktivität im Farr-Assay [IU/ml]
dsDNA-mAb32	4,3	1400	39,6 ± 0,63
	0,43	140	11,1 ± 0,39
dsDNA-mAb33	0,75	2200	-
	0,075	220	-
HYB331-01	5	-	-
	0,5	-	-

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Messung drei monoklonaler anti-dsDNA im Farr-Assay. Die Aktivitäten sind als Mittelwert ± eine Standardabweichung dargestellt.

Während eine Abweichung zu den im ELISA durch Kalibration gegen Wo/80 ermittelten Werten zwar erwartet wurde, war das Ausmaß jedoch größer als erwartet. Nicht nur, dass für dsDNA-mAb33 gar kein messbares Ergebnis erhalten wurde, so waren die Werte von dsDNA-mAb32 auch extrem niedrig. Dieses Bindungsverhalten sollte durch eine umfassende Charakterisierung, wie sie im Folgenden versucht wurde, verstanden werden.

3.3.2 Analyse im Biosensor

Eine der Schlüsselkompetenzen der SPR-Biosensorik stellt die durch Aufzeichnung von biologischen Interaktionen in Echtzeit ermöglichte Bestimmung von kinetischen Bindungsdaten dar. Der Sensor wurde deshalb zur umfangreichen kinetischen Vermessung der drei monoklonalen Antikörper verwendet.

Zur Messung wurden drei Biosensorchips nach beschriebener Prozedur hergestellt. Die Antikörper wurden in Laufpuffer seriell 1+1 verdünnt, und zwar HYB331-01 von 0,255 - 16,4 nM (Abb. 3.26 A-1), 0,064 - 16,4 nM (A-2) und 0,255 - 16,4 nM (A-3), dsDNA-mAb32 von 0,448 - 14,4 nM (B-1), 0,897 - 14,4 nM (B-2) und 0,448 - 14,4 nM (B-3), sowie dsDNA-mAb33 von 0,0781 - 2,50 nM (C-1), von 0,156 - 2,50 nM (C-2) und 0,0781 - 2,50 nM (C-3). Abbildung 3.26 zeigt die bei den Biosensormessungen erhaltenen Sensorgramme.

Durch rein optische Auswertung konnten hier bereits die folgenden Beobachtungen festgehalten werden:

1. Die Qualität der aufgenommenen Daten scheint im Verlauf der Zeit (von Chip 1 nach Chip 3) abzunehmen. Dies könnte auf ein Stabilitätsproblem des Coating-konjugates hindeuten.
2. Während HYB331-01 und dsDNA-mAb33 relativ schnell assoziieren und dissoziieren, verhält sich dsDNA-mAb32 deutlich langsamer.

Um weitere Aussagen treffen zu können, wurden die Messdaten an die im Theorieteil besprochenen Algorithmen zur Beschreibung der kinetischen Abläufe der Interaktion gefittet. Obwohl es sich bei der beobachteten dsDNA-anti-dsDNA Interaktion mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine bivalente Wechselwirkung handelt, wurden hierfür die Algorithmen für 1:1-Interaktionen benutzt. Die erhaltenen Konstanten sind als beobachtete, "makroskopische" Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten zu betrachten, und stimmen möglicherweise nicht mit ihren "mikroskopischen" Pendants überein. Als Rechtfertigung für diese auf den ersten Blick zweifelhafte Vorgehensweise soll die Argumentation von SCHUCK et al. zitiert werden. Diese weisen explizit darauf hin, dass ein Fitting mit komplexeren mathematischen Modellen zwar möglich, jedoch nicht zu empfehlen ist. Die so erhaltenen Ergebnisse sind für gewöhnlich nicht robust und können um mehrere Größenordnungen variieren. Insbesondere vor in kommerzielle Software implementierte Modelle für bivalente Interaktionen oder zum Ausgleich von Massentransportphänomenen wird gewarnt (235). Dies entspricht ausnahmslos den in der vorliegenden Arbeit gemachten Erfahrungen.

Wie oben beschrieben, erfolgt der Komplexzerfall exponentiell, d.h. bei natürlich logarithmischer Auftragung der Anbindungswerte der Postinjektionsphase sollte eine Gerade erhalten werden. Wie Abb. 7.1 im Anhang zeigt, ist besonders bei hohen Dissoziationsraten ein Abflachen, also eine Verlangsamung im Laufe der Zeit zu sehen.

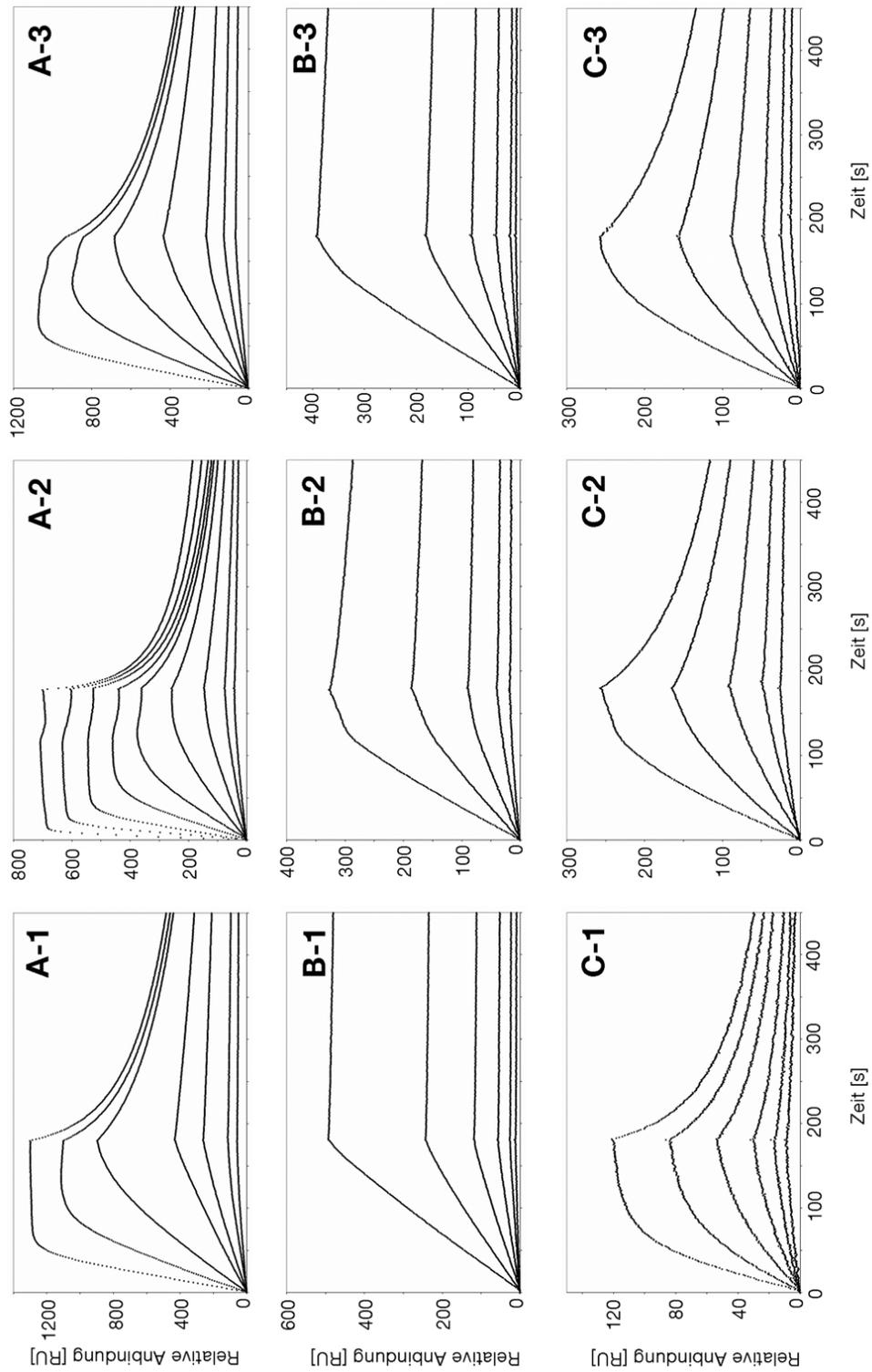


Abbildung 3.26: SPR-Sensorgramme für die Injektion von HYB331-01 (A), dsDNA-mAb32 (B) und dsDNA-mAb33 (C) jeweils auf Chip 1-3

Hierfür kommen eine Reihe von Erklärungen, wie heterogene Oberflächen bzw. Antikörperpräparationen, komplexe Kinetiken multivalenter Bindungspartner oder Massentransportprobleme in Frage (236). Als sehr wahrscheinlich schien das Auftreten von Rebinding-Effekten, also des erneuten Assoziierens vorher dissoziierter Antikörper. Zur Minimierung von auf Rebinding-Effekten beruhenden Fehlern ist es üblich, nur die initiale Phase der Dissoziation zu berücksichtigen (237). Für die hier durchgeführte nichtlineare Regressionsanalyse wurden deshalb nur die ersten 20 Sekunden der Postinjektionsphase verwendet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.4, während das Fitting selbst sowie die absoluten Fehler im Anhang (Abb. 7.3 - 7.11) dargestellt sind.

k_d [$1/s \times 10^{-2}$]	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Mittelwert
HYB331-01	1,35	1,56	0,584	$1,16 \pm 0,514$
dsDNA-mAb32	0,0295	0,0949	0,0358	$0,0534 \pm 0,0361$
dsDNA-mAb33	1,12	0,505	0,319	$0,648 \pm 0,419$

Tabelle 3.4: Durch nichtlineares Fitting der Bindungskurven erhaltene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der vermessenen anti-dsDNA.

Die Qualität der Regression ist dabei sehr unterschiedlich, und vor allem bei schneller Kinetik und höheren Konzentrationen, insbesondere für HYB331-01 als schlecht zu bewerten. Außerdem fällt auf, dass die Dissoziation von dsDNA-mAb32 deutlich langsamer verläuft als die der beiden anderen Antikörper. Unter Annahme der erhaltenen k_d -Werte wurden anschließend die Injektionsphasen der Bindungskurven gefittet. Auch hier ist die Fittingqualität analog zur Assoziation recht unterschiedlich (Abb. 7.12 - 7.20) und dsDNA-mAb32 zeigt auch hier die langsamste Kinetik (Tab. 3.5).

k_a [$1/Ms \times 10^6$]	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Mittelwert
HYB331-01	3,90	10,2	1,94	$5,35 \pm 4,32$
dsDNA-mAb32	0,0843	0,479	0,265	$0,276 \pm 0,198$
dsDNA-mAb33	4,39	2,26	2,69	$3,11 \pm 1,13$

Tabelle 3.5: Durch nichtlineares Fitting der Bindungskurven erhaltene Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten der vermessenen anti-dsDNA.

Die gemäß Gleichung 2.19 durch Teilen der kinetischen Konstanten gebildeten Gleichgewichtskonstanten (Tab. 3.6) sind für die drei Antikörper praktisch gleich und liegen im niedrigen nanomolaren Bereich.

K_D [$M \times 10^{-9}$]	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Mittelwert
HYB331-01	3,46	1,53	3,01	$2,67 \pm 1,01$
dsDNA-mAb32	3,50	1,98	1,35	$2,28 \pm 1,11$
dsDNA-mAb33	2,55	2,23	1,19	$1,99 \pm 0,711$

Tabelle 3.6: Aus den gemessenen kinetischen Konstanten berechnete Dissoziationsgleichgewichtskonstanten der anti-dsDNA.

3.3.3 Analyse mittels Gelretardation

Die Validität der in SPR-Experimenten aus kinetischen Bindungsdaten ermittelten thermodynamischen Bindungskonstanten wird häufig kritisiert. Die Existenz systematischer Unterschiede zu anderen in Frage kommenden Methoden, wie Gleichgewichtsdialyse oder Kalorimetrie ist kaum zu verleugnen: zum einen spielen sich die beobachteten Bindungsvorgänge nicht in Lösung, sondern an festen Oberflächen ab, was zu einer Änderung der kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der Interaktion führen kann. Zum anderen ist auch eine strukturelle Änderung der immobilisierten Komponente durch die jeweils angewandte Oberflächenchemie denkbar. Aus diesem Grund war es angestrebt, die erhaltenen Affinitätsdaten mit einer unabhängigen und vorzugsweise in Lösung arbeitenden Methode zu bestätigen. Hierfür schienen Gelretardationsexperimente gut geeignet. Die **Gelretardation** (*Electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) beruht auf der Trennung von freier DNA und DNA-Protein Komplexen durch Gelelektrophorese aufgrund einer durch die Bindung von Proteinen verursachten verringerten elektrophoretischen Mobilität der DNA (Abb. 3.27). Dadurch wird eine qualitative und quantitative Untersuchung der Interaktion ermöglicht (238; 239).

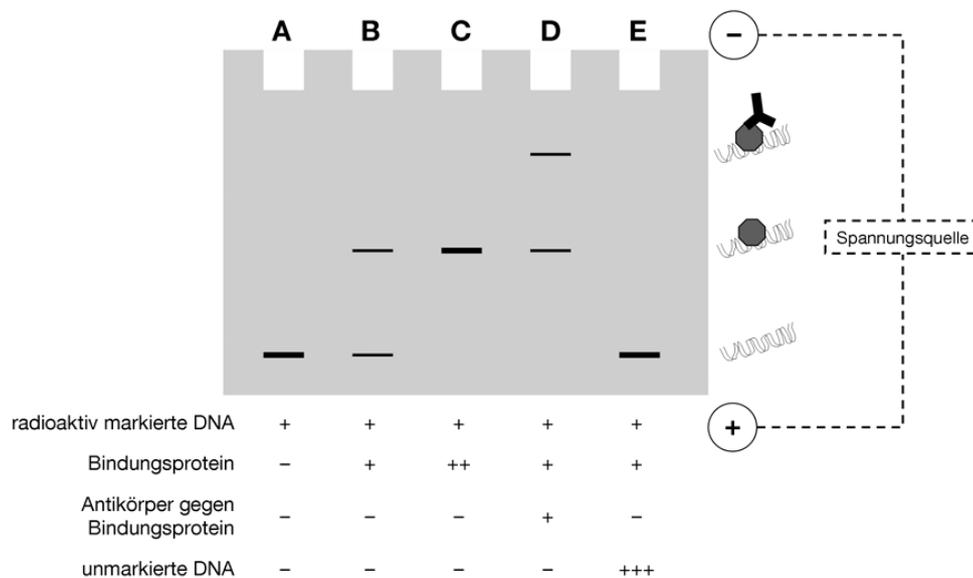


Abbildung 3.27: Das Prinzip des EMSA beruht auf der elektrophoretischen Trennung von freier DNA und DNA-Protein Komplexen. A, freie DNA. B, die DNA wird durch das bindende Protein retardiert. C, das Ausmaß der Retardierung ist von den Mengenverhältnissen der Komponenten und deren Affinität abhängig und quantifizierbar. D, durch Addition eines gegen das Bindungsprotein spezifischen Antikörpers kann der Komplex weiter retardiert werden (supershift). E, die Bindung an den markierten DNA-Strang ist durch einen Überschuss an unmarkierter DNA inhibierbar.

Für die Analyse der mAb-dsDNA Immunkomplexe wurde radioaktiv markierte ds-

DNA in zwei Konzentrationen eingesetzt. Eine höhere Konzentration (< 700 pM) ermöglichte die Visualisierung der Bindungsstöchiometrie, während eine geringere Konzentration (< 70 pM) aus noch zu erläuternden Gründen für die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D der Interaktionen nötig war. Als Bindungsproteine wurden wiederum die drei monoklonalen DNA-Antikörper dsDNA-mAb32, dsDNA-mAb33 und HYB331-01 in variierenden Konzentrationen verwendet. Alle drei Antikörper konnten die DNA retardieren, wobei konzentrationsabhängig mehrere Banden zu sehen sind (Abb. 3.28 A-C). Die Bindung ist jeweils inhibierbar.

Für die Interpretation dieses Bandenmusters sollen die spezifischen Charakteristiken von DNA als Antigen herangezogen werden. Binden Antikörper in einer sequenzunabhängigen Art und Weise an das Phosphodiester-Rückgrat, so stellt die DNA aufgrund ihrer repetitiven Struktur zahlreiche Epitope in hoher Dichte zur Verfügung. Diese Epitope liegen auch nicht sauber räumlich nebeneinander, sondern überlappen sich beliebig, die Bindung ist dann praktisch an jeder Stelle möglich. Dies führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Bindung von mehr als einem Antikörper pro DNA-Molekül, wobei jeder neue Antikörper die elektrophoretische Mobilität der DNA weiter verringert. Der Unterschied zum supershift liegt lediglich darin, dass nicht das Bindungsprotein von den neu gebundenen Antikörpern erkannt wird, sondern die DNA selbst. Daneben ist - sofern die Länge des DNA-Stranges einen gewissen Wert überschreitet - mit der bivalenten Anbindung von IgG-Molekülen zu rechnen.

Im Gegensatz zu den Publikationen von KHAN et al. (240; 241), die pUC18-Plasmide und aus Lymphozyten isolierte DNA für ähnliche Experimente benutzten, erlaubt die Verwendung des relativ kurzen (255 bp) und definierten PCR-Fragments als Sonde nicht nur die Detektion eines generellen Shifts, sondern auch die saubere Unterscheidung zwischen Immunkomplexen unterschiedlicher Stöchiometrie. Im vorliegenden Fall kann von einer Bindung von mindestens sechs Antikörpern pro Strang ausgegangen werden. Betrachtet man die räumlich-geometrischen Verhältnisse mit einem Abstand von etwa 140 \AA zwischen den Paratopen eines IgG Moleküls (242) und einer DNA Länge von etwa 870 \AA bei 255 bp (38), erscheint dies durchaus realistisch.

Wie z.B. von FAIRALL et al. für ein DNA-bindendes Peptid gezeigt, kann die Gelretardation auch für die Bestimmung von K_D herangezogen werden (243). Für den Fall dass

$$[A] \ll [K_D] \quad (3.1)$$

mit A als Antigen, gilt

$$[Y]_{frei} = [Y]_{total} \quad (3.2)$$

wobei Y den Antikörper bezeichnet. Also kann aus dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 2.17) hergeleitet werden, dass

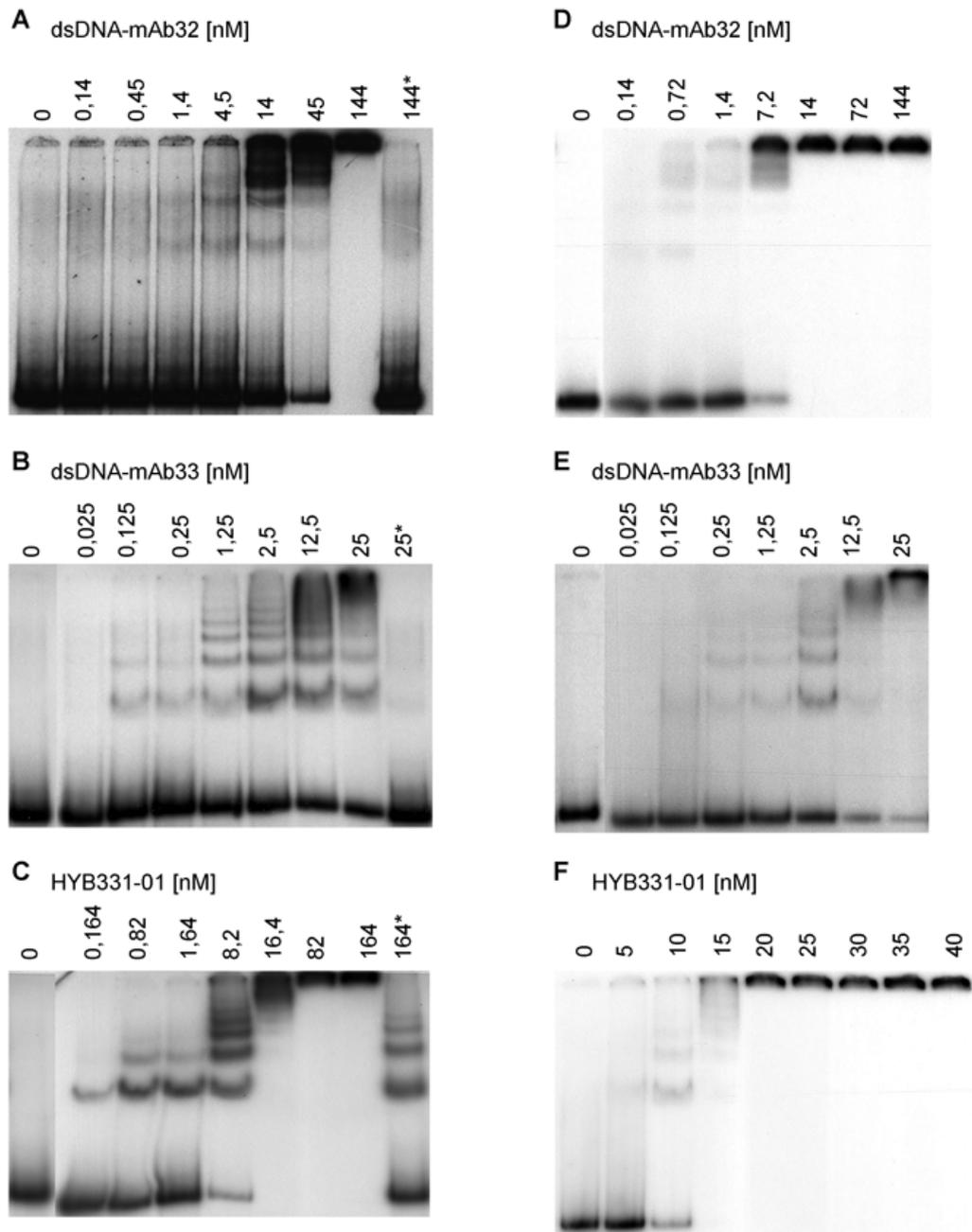


Abbildung 3.28: Charakterisierung von mAb-dsDNA Immunkomplexen und Ermittlung der halbmaximalen Bindung durch Gelretardation. (A)-(C), native PAGE von mAb-dsDNA-Immunkomplexen nach Inkubation mit einer höheren dsDNA-Konzentration (< 700 pM). (D)-(F), native PAGE von mAb-dsDNA-Immunkomplexen nach Inkubation mit einer niedrigeren dsDNA-Konzentration (< 70 pM). Über den Bahnen sind die jeweiligen mAb Konzentrationen angegeben. * bezeichnet die Inhibition mit 300 nM nicht markierter dsDNA Sonde.

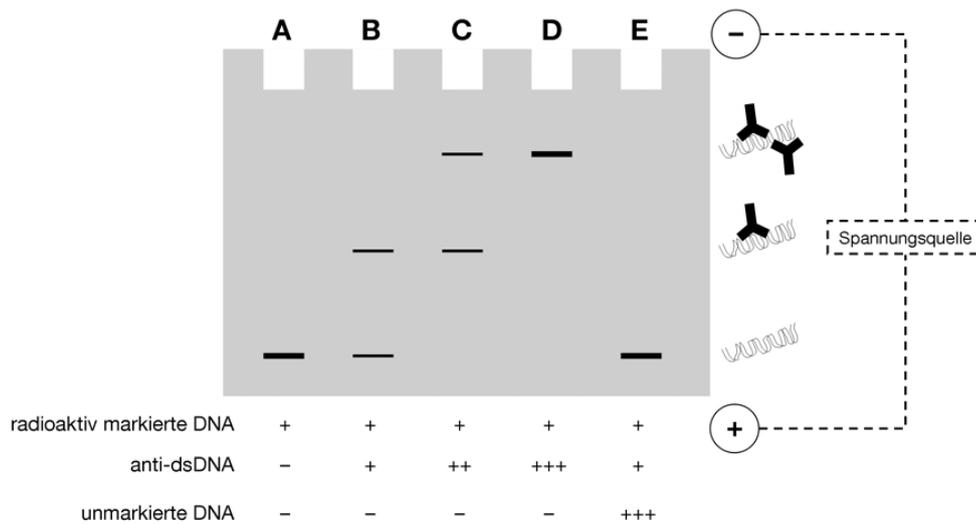


Abbildung 3.29: Interpretation der EMSA-Ergebnisse. A, freie DNA. B, C, D die DNA wird durch anti-dsDNA konzentrationsabhängig geschiftet. E, die Bindung an den markierten DNA-Strang ist durch einen Überschuss an unmarkierter DNA inhibierbar.

$$K_D = [Y]_{total} \times \frac{[A]_{frei}}{[AY]} \quad (3.3)$$

d.h. für den Fall, dass 50 % der eingesetzten DNA mit Antikörper komplexiert und damit in ihre Migration retardiert ist, gilt

$$[A]_{frei} = [AY] \quad (3.4)$$

und damit

$$K_D = [Y]_{total} \quad (3.5)$$

Folglich kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D als eingesetzte Antikörperkonzentration, welche einen Shift der Hälfte der eingesetzten DNA, bewirkt abgelesen werden. Diese Beziehung gilt jedoch streng genommen nur für Wechselwirkungen mit einer 1:1-Stöchiometrie. Es stellt sich damit die Frage, welchen Einfluss die eindeutig demonstrierte Abweichung davon auf das Ergebnis hat.

Bezieht man eine Bindung von mehr als einem Antikörper pro DNA-Molekül mit ein, lässt sich Gleichung 2.17 generalisieren zu

$$\beta_n = \frac{[A] \times [Y]^n}{[AY_n]} \quad (3.6)$$

wobei n die pro DNA-Strang gebundene Zahl an Antikörpern und β die kumulative

Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Reaktion ist. Betrachtet man die Reaktion zwischen dem DNA-Strang und mehreren Antikörpern als mehrstufige Reaktion:



mit der Gleichgewichtskonstante K_{D1} ,



mit der Gleichgewichtskonstante K_{D2} , und so fort bis



mit der Gleichgewichtskonstante K_{Dn} , so kann β wie folgt definiert werden (244):

$$\beta_n = \prod_{i=1}^n K_{Di} \quad (3.10)$$

Im vorliegenden Fall gilt die Besonderheit, dass es sich im Grunde genommen bei den Einzelreaktionen um völlig identische Reaktionen handelt, die über die Affinität des eingesetzten Antikörpers Y definiert werden. Geht man also unter Vernachlässigung einer möglichen sterischen Hinderung durch bereits gebundene Antikörper vereinfachend davon aus, dass sich die Bindungseigenschaften von Y im Verlauf der mehrstufigen Reaktion nicht ändern, so ist

$$K_1 = K_2 = \dots = K_n = K_D \quad (3.11)$$

und damit

$$\beta_n = K_D^n \quad (3.12)$$

also

$$K_D = \sqrt[n]{\beta_n} \quad (3.13)$$

Auch hier gilt, dass bei Bindung von 50 % [A], [A] gleich $[AY_n]$ ist, also

$$\beta_n = [Y]_{frei}^n \quad (3.14)$$

womit

$$K_D = \sqrt[n]{[Y]_{frei}^n} = [Y]_{frei} \quad (3.15)$$

Somit stellt die von einer 1:1-Reaktion abweichende Stöchiometrie kein Problem für die Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante dar.

Ein weiteres zu klärendes Problem ist die Frage, ob die Voraussetzung $[A] \ll [K_D]$ tatsächlich gilt, bzw. wie groß der durch zu hohe DNA-Konzentrationen eingebrachte Fehler ist. Es gelte unter Berücksichtigung der Stöchiometrie

$$[Y]_{total} = [Y]_{frei} + n [AY_n] \quad (3.16)$$

wobei ein Shift von 50% der eingesetzten DNA festgestellt werden soll und $[Y]_{total}$ für die Bestimmung von K_D herangezogen wird. Die beobachtete, "makroskopische" Gleichgewichtskonstante, K_D^* , wird auf Basis der vorhergehenden Überlegungen mit $[Y]_{total}$ gleichgesetzt wird. Korrekterweise gilt damit

$$K_D^* = [Y]_{total} = K_D + n [AY_n] \quad (3.17)$$

d.h. die gemessenen Werte sind tendenziell zu groß. Der absolute Fehler errechnet sich als

$$\Delta K_D = K_D^* - K_D = K_D + n [AY_n] - K_D = n [AY_n] \quad (3.18)$$

und der auf K_D bezogene relative Fehler als

$$\frac{\Delta K_D}{K_D} = n \times \frac{[AY_n]}{K_D} \quad (3.19)$$

Für den hier betrachteten Fall des halbmaximalen Shifts, also den Voraussetzungen dass $[A]_{frei} = [AY_n]$ und $[A]_{total} = [A]_{frei} + [AY_n]$, ist

$$\frac{\Delta K_D}{K_D} = \frac{n}{2} \times \frac{[A]_{total}}{K_D} \quad (3.20)$$

Geht man für $[A]_{total}$ von der tatsächlich verwendeten Konzentration von < 70 pM, sowie für von K_D einem auf den SPR-Daten beruhenden Schätzwert von 1 nM aus, so lässt sich der relative Fehler als Funktion von n darstellen (Abb. 3.30).

Eine Stöchiometrie von $n > 10$ scheint aufgrund der oben besprochenen Größenverhältnisse als sehr unwahrscheinlich. Zusammenfassend werden mit der beschriebenen Versuchsanordnung also tendenziell höhere Werte für K_D gemessen, diese bewegen sich allerdings in einem tolerierbaren Rahmen. Abbildung 3.28 D-F zeigt die Titration von radioaktiv markierter dsDNA ($[A]_{total} < 70$ pM) mit ansteigenden Konzentrationen der monoklonalen Antikörper. Für dsDNA-mAb32 wurde der halbmaximale Shift der DNA bei $1,4 \text{ nM} < [Y]_{total} < 14 \text{ nM}$, für dsDNA-mAb33 bei $2,5 \text{ nM} < [Y]_{total} < 25 \text{ nM}$ und für HYB331-01 $5 \text{ nM} < [Y]_{total} < 20 \text{ nM}$ beobachtet.

Diese Werte zur Bestätigung der Biosensormessungen sind mehr als semiquantitative denn als quantitative Ergebnisse zu betrachten. Es wurden aufgrund des hohen Aufwands weder Mehrfachbestimmungen noch eine densitometrische Auswertung durchgeführt. Unter Beachtung der Tatsache, dass bereits Abweichungen von bis zu Faktor

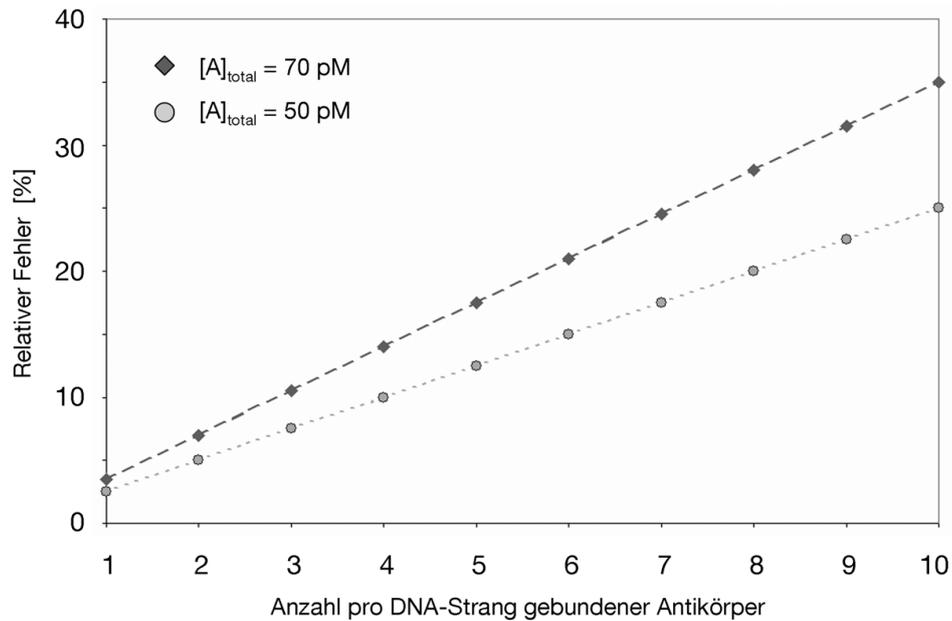


Abbildung 3.30: Der in den durchgeführten EMSA-Messungen zu erwartende relative Fehler von K_D als Funktion von n , der pro Anzahl pro DNA-Strang bindender Antikörper.

500 zwischen SPR-Biosensormessungen von K_D und in Lösung erhaltenen Werten berichtet wurden (245), und dass Affinitäten von Antikörpern grundsätzlich über einen sehr weiten Bereich von mehreren Größenordnungen (ca. $K_D = 10^{-7}$ bis 10^{-11} M) variieren, sind die Werte jedoch in vernünftiger Übereinstimmung mit den im Biosensor erhaltenen Daten (Tab. 3.6), umso mehr wenn man bedenkt, dass die Affinität eine temperaturabhängige Größe ist und die gute Temperaturkontrolle des Biosensors (Temperaturdrift $< 3 \times 10^{-3}$ °C/min (246)) bei den EMSA-Experimenten nicht vollständig gewährleistet werden konnte.

3.3.4 Biosensormessungen im kompetitiven Format

Um einige, der SPR-Biosensor-Technologie inhärente Probleme zu überwinden, wurde von NIEBA et al. vorgeschlagen, kompetitive Messungen zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten zu nutzen (245). Die untersuchte Interaktion spielt sich dabei während einer Vorinkubation in Lösung - also ohne mögliche Fehler durch die Nutzung einer festen Phase - ab, während der Biosensor einzig zur Messung der freien Konzentration eines Interaktionspartners genutzt wird. Das Prinzip wird häufig für die Affinitätsbestimmung mit ELISAs genutzt (247), ist im Biosensor jedoch noch vorteilhafter, da markierungsfrei gearbeitet werden kann (kein möglicher Fehler durch Nutzung eines Tracers), sowie die freie Konzentration des gemessenen Analyten im Durchflusssystem konstant gehalten wird. Obwohl diese Vorgehensweise keine Bestimmung kinetischer

Konstanten erlaubt, schien sie als sehr nützlich für die weitere Validierung der aus diesen errechneten Gleichgewichtskonstanten. Die Methode ist quasi unabhängig, arbeitet aber mit derselben vorhandenen Technologie. Daneben erlaubt dieses Prinzip die Bestimmung von Kreuzreaktivitäten gegen verschiedene Analyten unter Nutzung ein und derselben Messoberfläche.

Zur Ermittlung von Reaktivitätsprofilen gegen unterschiedliche DNA-Spezies wurden die drei monoklonalen Antikörper in fixen Konzentrationen (ausreichend hoch für auswertbare Biosensorgramme) mit variierenden Mengen verschiedener ODNs versetzt und bis zum Erreichen des Gleichgewichtes bei Raumtemperatur inkubiert (hierfür wurde eine Stunde als ausreichend angesehen). Die Reaktivität der dann nicht an DNA gebundenen, freien Antikörper wurde anschließend im Biosensor bestimmt.

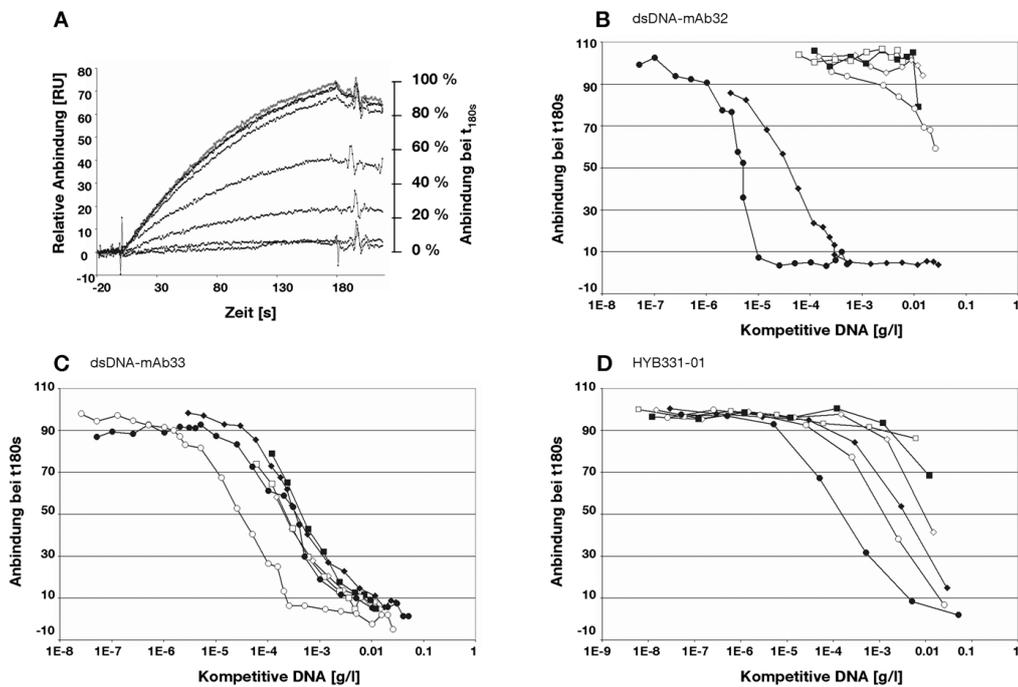


Abbildung 3.31: Reaktivität der monoklonalen anti-dsDNA gegen verschiedene DNA-Spezies. Deren Bindung an die Chipoberfläche wird durch Präinkubation mit ss- und dsODNs verschiedener Länge inhibiert. (A), eine feste Konzentration Antikörper (oberste Kurve) wird mit ansteigenden Konzentrationen der Oligonukleotide präinkubiert und anschließend in den Biosensor injiziert (darunter liegende Kurven). Die Anbindung nach 180 s Assoziation wird als prozentuale Fraktion des Signals des nicht inhibierten Antikörpers ausgelesen. Die Anbindung von (B) dsDNA-mAb32, (C) dsDNA-mAb33 und (D) HYB331-01 wurde gegen die Konzentrationen von einzel- (offene Symbole) sowie doppelsträngiger (geschlossene Symbole) DNA der Länge 10 (Quadrate), 24 (Rauten) sowie 42 (Kreise) Basen bzw. Basenpaare aufgetragen.

Dabei legten die Antikörper deutlich unterschiedliche Reaktivitäten gegen die ver-

schiedenen DNA-Spezies zu Tage (Abb. 3.31). Während dsDNA-mAb32 nur von den doppelsträngigen Oligos nennenswert inhibiert wurde, war die Bindung von dsDNA-mAb33 an alle Kompetitoren sehr ähnlich, mit einer etwas höheren Affinität zum 42 Basen langen, einzelsträngigen Oligo. HYB331-01 wurde jeweils stärker von den doppelsträngigen und längeren Spezies inhibiert.

Diese Spezifitätsprofile sollten für die Auswahl von Kalibratoren unbedingt beachtet werden. Zwar lässt sich hier im klassischen Sinn nicht von unerwünschten Kreuzreaktivitäten sprechen, da die Bindung von anti-dsDNA gegen ssDNA primär nicht illegitim ist. Trotzdem scheint ein Antikörper mit echter Spezifität gegen Doppelstränge (wie dsDNA-mAb32) für einen Einsatz als Kalibrator geeigneter als ein Antikörper mit tendenziell höherer Affinität gegen Einzelstränge (wie dsDNA-mAb33), idealerweise könnte mit einer Kombination mehrerer Kalibratoren bzw. Kontrollen gearbeitet werden. In jedem Fall ist die Kenntnis der Spezifitäten von Vorteil.

Interessant ist auch der Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen von PAPALIAN et al. (58). Diese stellten bei ähnlichen, ebenfalls kompetitiven Experimenten mit SLE-Seren und verschiedenen DNA-Spezies einen sprunghaften Anstieg der Inhibitionseffizienz bei einer DNA-Länge zwischen ca. 20-25 bp und 40-50 bp fest und führten dies auf die räumlichen Minimalanforderungen für eine bivalente Bindung zurück. Da dieses Phänomen zumindest für dsDNA-mAb33 klar nicht zu beobachten war, scheint dies keine generelle Eigenschaft von anti-dsDNA zu sein.

Die Messungen wurden jeweils mit den beiden stärksten Inhibitoren, sowie mit dem für die Chipbeladung eingesetzten 255bp-PCR-Produkt in Triplikaten wiederholt. Die resultierenden sigmoidalen Kurven wurde anschließend an eine 4-Parameter-Funktion gefittet (Abb. 7.2 im Anhang). Die erhaltenen Testmittelpunkte zeigt Tabelle 3.7.

DNA inhibitor	Testmittelpunkte der Inhibitionskurven in $g/L \times 10^{-6}$		
	dsDNA-mAb32	dsDNA-mAb33	HYB331-01
255bp PCR Produkt	6,84	362	153
42bp dsODN	3,40	95,2	173
24bp dsODN	21,3	-	-
42 Basen ssODN	-	21,8	929

Tabelle 3.7: Testmittelpunkte der Inhibitionskurven von monoklonalen anti-dsDNA unter Verwendung verschiedener DNA Spezies

Die Testmittelpunkte, also die für eine 50 %-Inhibition benötigten DNA-Konzentrationen, sind sehr wertvoll für den Vergleich der Reaktivitäten verschiedener DNA-Spezies mit einem Antikörper. Fraglich ist allerdings zum einen, ob aus diesen Werten entsprechend den Überlegungen zur Gelretardation auch Gleichgewichtskonstanten abgeleitet werden können und zum anderen, ob sie nützlich sind für den Affinitätsvergleich zwischen den Antikörpern.

Beide Fragen sind klar zu negieren. Bei der Gelretardation wurde K_D als Konzentrati-

on des Antikörpers, welche einen halbmaximalen Shift der eingesetzten DNA verursacht, ausgedrückt. Hier liegen die Verhältnisse umgekehrt, K_D müsste als Konzentration der DNA, welche eine halbmaximale Inhibition des eingesetzten Antikörpers verursacht, ausgedrückt werden. Eine entsprechende Vereinfachung von Gleichung 3.6 ist allerdings nicht möglich, da im Gegensatz zum Verhältnis $\frac{[A]_{frei}}{[AY_n]}$, welches beim halbmaximalen Shift 1 betrug, hier das Verhältnis $\frac{[Y]_{frei}}{[AY_n]}$ nicht bekannt, und mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht gleich 1 ist.

Daneben offenbart der Vergleich der Testmittelpunkte bei Inhibition mit dem 255bp-PCR-Produkt einen Unterschied von bis zu Faktor ~ 56 zwischen den Antikörpern, während in der Gelretardation und in den Biosensorexperimenten vergleichbare Werte erhalten wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es im Biosensor trotz der hohen Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einem Flusszellenvolumen von 0,06 μl , wodurch eine maximale Lösung/Oberflächen-Kontaktzeit von 0,12 s vorgegeben wird, zu substantieller Dissoziation der beiden schnell dissoziierenden Antikörper dsDNA-mAb33 und HYB331-01 kommt. Dadurch würden fälschlicherweise höhere Konzentrationen an freiem Antikörper und dadurch niedrigere Affinitäten zum Inhibitor abgeleitet. Allerdings kommt es rein rechnerisch aus Gleichung 2.15 in 0,12 Sekunden bei den im Biosensor gemessenen k_d -Werten (Tab. 3.4) nur zu einer Dissoziation von maximal $\sim 0,2\%$, so dass das Phänomen hier nicht vollständig verstanden werden kann. Kommt es jedoch schon während Sekundenbruchteilen im Biosensor zum Tragen, so ist es sicher auch von großem Einfluss in langsamer arbeitenden Messsystemen wie ELISAs und RIAs, wenn sie in kompetitiver Art und Weise durchgeführt werden. Der Nutzen solcher Messungen zur Bestimmung der Affinität von anti-dsDNA, wie etwa von SPATZ et al. veröffentlicht (248), wäre damit äußerst fraglich.

3.3.5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund fehlender anti-dsDNA Standards bzw. Kalibratoren wurde der entwickelte anti-dsDNA-Biosensor für die Messung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, sowie der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von drei monoklonalen anti-dsDNA-Antikörpern eingesetzt. In Gelretardationsexperimenten konnte die Validität der im Biosensor gemessenen K_D -Werte bestätigt werden, desweiteren offenbarten diese eine von der 1:1-Wechselwirkung klar abweichende Bindungsstöchiometrie.

Obwohl dadurch für alle drei Antikörper vergleichbare Gleichgewichtskonstanten ermittelt wurden, zeigte nur dsDNA-mAb32 eine Aktivität im Farr-Assay. Die weit verbreitete Erklärung hierfür, dass diese Methode nur zur Messung hochaffiner anti-dsDNA geeignet ist, kann damit in Frage gestellt werden. Eine schlüssige Ursache für dieses Phänomen ist die deutlich geringere Dissoziationsgeschwindigkeit von dsDNA-mAb32, welche die Stabilität des Komplexes während der nötigen Wasch- und Zentrifugationsschritte, also in einem von Gleichgewichtsbedingungen abweichenden Zustand, gewähr-

leistet. **Neben der Affinität von Antikörpern scheint damit auch ihre Kinetik entscheidend für einen Einsatz als Kalibrator zu sein.**

Eine weitere Charakterisierung der Antikörper konnte durch kompetitive Biosensormessungen erreicht werden. Durch Vorinkubation der Antikörper mit unterschiedlichen DNA-Spezies konnten Spezifitätsprofile erstellt werden. Hierfür wurden exemplarisch einzel- und doppelsträngige Oligonukleotide verschiedener Länge verwendet.

3.4 Messung klinischer Realproben

Im letzten Teil des Projektes wurde die Eignung des Gesamtverfahrens für diagnostische Zwecke untersucht. Im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Pilotmessungen wurden hierfür zwei wesentliche Punkte in der Vorgehensweise verändert. Zum einen kam ein anderes SLE-Kollektiv zum Einsatz, welches nicht auf der Basis anderer anti-dsDNA-Werte vorselektiert war, wie dies mit den im eigenen Hause gesammelten Proben unvermeidlich schien. Darüberhinaus waren die nun untersuchten Proben klinisch gut charakterisiert und bereits mit fünf verschiedenen anti-dsDNA Labormethoden gemessen, sodass Vergleichswerte zur Verfügung standen.

Neben der Verwendung anderer Serumproben wurde die Auswertung grundsätzlich modifiziert. Während oben beschriebene Pilotmessungen alle auf einem einzigen Chip durchgeführt, und die erhaltenen Anbindungswerte in RU angegeben wurden, sollte nun eine gewisse Kalibrierung mit eingeführt werden. Dies wurde in Form einer Ein-Punkt-Kalibration mit dem oben charakterisierten monoklonalen dsDNA-mAb32 realisiert, welcher in regelmäßigen Abständen, jeweils vor fünf Seruminjektionen injiziert wurde. **Die relativen Anbindungen der danach vermessenen fünf verdünnten Seren wurden am Ende der Injektionsphase in RU ausgelesen und als Anteil der Anbindung des Antikörperkalibrators berechnet.** Da dsDNA-mAb32, wie bereits erläutert, mit einer Aktivitätsangabe geliefert wird, konnten die Reaktivitäten der Seren damit in IU/ml ausgedrückt werden. Die genaue Vorgehensweise ist im experimentellen Teil erläutert, Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse zusammen mit anti-dsDNA-Messwerten aus anderen Assays. Als interessanteste klinische Information ist das Auftreten einer Lupusnephritis (DPGN) angegeben.

ID	Orgentec*	Bindazyme*	Farrzyme*	ELIA Phadia*	Farr-Assay*	Biosensor	DPGN
	Cut-off 20,0	Cut-off 30,0	Cut-off 30,0	Cut-off 20,0	Cut-off 7,0		
1	286,0	212,8	54,7	96,8	10,5	173,8	-
2	9,6	10,3	5,7	1,2	< 2,5	12,1	+
3	460,0	391,9	288,1	322,0	109,4	153,8	+
4	176,9	51,5	22,8	73,6	4,0	167,2	+

5	320,0	513,3	112,9	94,4	93,4	452,7	+
6	5,7	42,0	1,6	12,6	< 2,5	110,8	-
7	86,8	24,8	3,5	16,1	39,4	121,6	-
8	8,2	8,4	2,6	1,8	5,3	32,3	-
9	34,5	51,8	1,7	12,9	3,2	61,0	-
10	197,7	204,3	36,8	48,1	17,0	120,0	-
11	27,0	18,7	3,7	19,6	5,0	96,4	-
12	14,7	16,2	2,6	3,6	2,7	72,5	-
13	79,2	133,5	43,1	14,8	25,4	153,8	+
14	212,5	88,7	27,3	47,2	5,4	261,1	+
15	5,3	6,7	3,6	2,6	3,2	36,5	-
16	3,6	7,5	6,5	1,7	< 2,5	42,5	-
17	61,5	48,3	7,7	14,7	3,9	134,0	-
18	6,1	11,7	2,0	3,0	2,6	30,6	-
19	148,9	97,5	25,3	88,8	5,0	150,8	+
20	3,7	92,2	1,9	3,9	4,3	143,6	+
21	5,0	8,9	2,1	0,7	< 2,5	32,3	-
22	38,3	60,2	11,2	24,2	5,2	185,6	+
23	35,6	32,8	3,6	12,8	7,7	123,1	-
24	66,5	95,9	12,0	64,8	8,2	113,8	-
25	> 240,0	392,8	228,0	> 600,0	11,5	141,9	+
26	18,7	30,2	2,4	10,4	< 2,5	83,8	-
27	260,0	281,3	114,4	72,9	28,2	117,1	+
28	19,8	27,9	2,0	1,6	< 2,5	145,7	-
29	> 240,0	502,1	564,0	> 600,0	72,1	273,6	+
30	110,2	62,9	11,6	49,7	3,7	67,5	-
31	89,7	146,5	2,7	12,4	5,6	450,6	-
32	44,0	406,9	1,9	4,8	< 2,5	88,0	-
33	160,0	99,3	2,0	14,6	3,4	121,8	-

34	795,0	318,3	46,3	196,0	80,8	328,0	+
35	106,8	69,9	1,9	106,0	5,4	189,2	+
36	98,8	44,1	16,3	90,2	2,8	68,4	-
37	145,7	278,8	31,6	26,1	15,4	152,3	+
38	81,9	183,2	23,8	37,4	14,5	158,9	-
39	33,7	30,3	22,8	29,8	2,9	104,6	-
40	23,6	24,4	16,8	27,6	< 2,5	94,4	-
41	29,9	7,9	39,3	35,9	3,4	78,3	-
42	> 240,0	315,7	56,0	267,0	12,9	269,3	+
43	198,0	148,9	127,8	57,9	47,9	110,6	+
44	36,1	> 1000	105,9	13,4	7,2	69,4	+
45	75,1	169,6	260,1	18,6	20,9	162,7	+
46	486,0	158,9	30,2	34,0	6,6	308,4	-
47	557,0	244,1	25,3	22,2	7,6	142,9	+
48	8,2	13,9	20,7	0,3	< 2,5	65,2	-
49	48,4	43,2	33,5	13,2	< 2,5	84,7	-
50	65,4	68,3	24,3	4,4	3,8	495,7	+

Tabelle 3.8: SLE-Serumproben mit klinischen Angaben und anti-dsDNA-Werten aus verschiedenen Tests. Mit * bezeichnete Assays wurden nicht selbst gemessen, die Werte waren mit den Seren zur Verfügung gestellt worden. Anti-dsDNA-Werte aus den Biosensormessungen sind die Mittelwerte aus zwei Messungen. Alle Werte in IU/ml, bezogen auf Wo/80

Äquivalente Messungen wurden mit einem 40 Proben umfassenden Kontrollkollektiv durchgeführt. Dies war unterteilt in 20 Proben von augenscheinlich gesunden Spendern ohne Autoimmunopathien in der Vorgeschichte und 20 Proben von Patienten mit nicht mit SLE oder APS assoziierten Autoimmunerkrankungen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.9.

ID	Diagnose	Bindazyme	Farrzyme	Orgentec IgM	Biosensor
		Cut-off 30,0	Cut-off 30,0	Cut-off 20,0	
NS-1	-	13,6	9,2	11,1	80,2
NS-2	-	8,6	4,2	4,4	59,5

NS-3	-	11,6	4,5	3,9	59,9
NS-4	-	10,0	8,2	5,4	49,0
NS-5	-	9,4	3,8	1,2	48,3
NS-6	-	7,8	3,2	5,1	59,7
NS-7	-	7,9	2,6	5,3	53,4
NS-8	-	9,2	6,8	4,3	69,1
NS-9	-	10,3	5,5	2,5	67,0
NS-10	-	10,2	8,8	5,7	97,2
NS-11	-	9,5	5,2	5,4	49,3
NS-12	-	10,0	9,0	4,5	59,4
NS-13	-	11,1	13,6	10,3	69,0
NS-14	-	8,4	3,8	4,7	71,3
NS-15	-	10,9	10,0	6,2	68,7
NS-16	-	9,1	8,4	13,6	58,0
NS-17	-	10,2	8,6	1,5	85,8
NS-18	-	10,6	4,6	5,3	96,9
NS-19	-	10,6	8,5	4,6	90,0
NS-20	-	9,1	5,1	9,2	67,3
AIS-1	M. Wegener	9,0	2,6	neg.	57,3
AIS-2	M. Wegener	8,3	2,2	neg.	50,8
AIS-3	M. Wegener	9,8	5,1	3,6	74,3
AIS-4	M. Wegener	8,1	2,6	neg.	69,7
AIS-5	M. Wegener	11,6	5,7	neg.	72,1
AIS-6	M. Wegener	8,3	4,8	neg.	40,7
AIS-7	M. Wegener	9,2	3,1	neg.	68,5
AIS-8	RA	9,3	5,4	14,3	47,5
AIS-9	RA	9,9	4,7	15,3	70,1
AIS-10	RA	11,1	6,9	3,5	39,1
AIS-11	AIH/PBC	13,6	11,1	11,0	61,2

AIS-12	AIH/PBC	29,3	5,4	4,5	77,9
AIS-13	AIH/PBC	17,1	7,2	4,1	58,0
AIS-14	AIH/PBC	15,9	7,9	7,8	60,4
AIS-15	AIH/PBC	16,6	12,4	31,4	110,5
AIS-16	AIH/PBC	10,0	3,1	27,3	128,5
AIS-17	AIH/PBC	9,7	5,6	7,1	43,4
AIS-18	Myesth. grav.	9,1	6,6	8,7	80,3
AIS-19	Myesth. grav.	10,7	9,0	6,3	49,2
AIS-20	Myesth. grav.	8,8	3,1	neg.	31,9

Tabelle 3.9: Kontroll-Serumproben mit klinischen Angaben und anti-dsDNA-Werten aus verschiedenen Tests. M. Wegener, Morbus Wegener. RA, Rheumatoide Arthritis. AIH/PBC, Autoimmunhepatitis bzw. Primär biliäre Zirrhose. Myasth. grav., Myasthenia gravis. Alle Werte in IU/ml, bezogen auf Wo/80

In Abbildung 3.32 sind zwei graphische Darstellungen der Messergebnisse gezeigt. Die gute Differenzierung zwischen Serumproben von SLE-Patienten und den beiden Kontrollgruppen ist gut erkennbar. Die beiden Autoimmunseren mit den höchsten SPR-anti-dsDNA-Werten, AIS-15 und AIS-16, lieferten beide positive Ergebnisse im IgM-spezifischen anti-dsDNA-ELISA von Orgentec (Tab. 3.9). Dieser Fund ist insoweit nicht außergewöhnlich, da bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen bzw. im speziellen bei PBC, IgM im Serum generell erhöht ist (249) und auch über das Vorkommen von anti-dsDNA berichtet wurde (250).

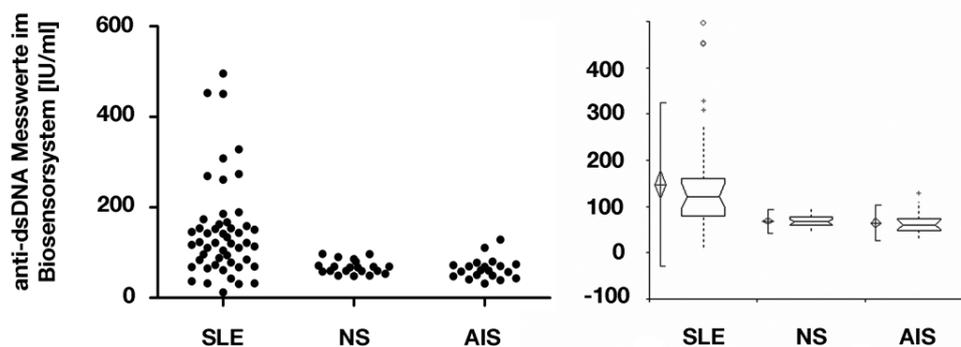


Abbildung 3.32: Dot-Plot und Box-Whisker-Plot der im anti-dsDNA Biosensor erhaltenen Messwerte für die Seren von SLE-Patienten und Kontrollgruppen in IU/ml bezogen auf den monoklonalen Standardantikörper dsDNA-mAb32

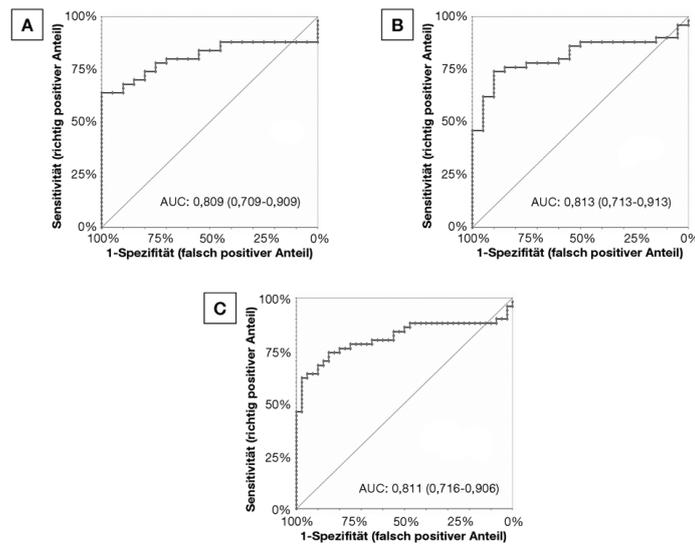


Abbildung 3.33: ROC-Kurven des anti-dsDNA Biosensors für verschiedene Szenarien. Als Kontrollgruppe wurden (A) nur die Seren gesunder Spender, (B) nur die Seren von Patienten mit irrelevanten Autoimmunerkrankungen, (C) die Seren beider Kollektive verwendet. Zusätzlich sind die AUC-Werte und deren 5-95 % Konfidenzintervalle dargestellt.

3.4.1 Diskriminierung zwischen SLE-Patienten und Kontrollgruppen

Für ein umfassendes Bild der Fähigkeit des Biosensors, zwischen Seren von SLE-Patienten und eines Kontrollkollektivs zu unterscheiden, wird ein weiteres Mal der oben bereits gezeigte ROC-Plot herangezogen, der den Zusammenhang zwischen Sensitivität und Spezifität für alle denkbaren Cutoffs einer Methode veranschaulicht (229). Ein Vergleich verschiedener Testsysteme kann dabei über die Fläche unter der Kurve (*Area Under the Curve*, AUC) erfolgen, welche im Idealfall 1, im schlechtesten Fall 0,5 beträgt.

Abbildungen 3.33 bis 3.35 zeigen ROC-Plots für verschiedene Szenarien. Aus obigen Messwerten (Tab. 3.8 und 3.9) wurden dafür verschiedene Positiv- und Negativgruppen gebildet.

Legt man die vollständigen Kollektive zugrunde, so beträgt die AUC 0,811 (Abb. 3.33 C), was als gut gewertet werden kann. Im Vergleich dazu liegen die von JÄKEL et al. für in Tab. 3.8 aufgeführten kommerziellen Tests ermittelten Werte zwischen 0,705 und 0,841, wenn auch für ein größere Gruppe von SLE-Patienten ($n = 100$) und ein anderes bzw. größeres Kontrollkollektiv (134). Anlehnend an die Arbeit von WASMUTH et al. zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms (251) wurden die in die Auswertung einbezogenen Patientenkollektive angepasst, wodurch sich die Performance des Biosensors ändert. Beschränkt man sich dabei nur auf die Normal- bzw. Autoimmunsere als Kontrolle, ist keine signifikante Veränderung feststellbar (Abb. 3.33). Im Gegensatz

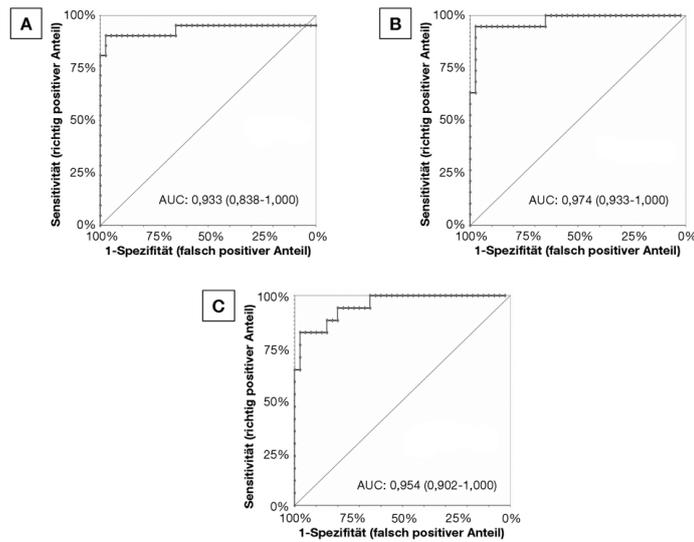


Abbildung 3.34: ROC-Kurven des anti-dsDNA Biosensors für verschiedene Szenarien. Als Positivgruppe wurden (A) nur die Seren von SLE-Patienten mit Glomerulonephritis, (B) nur die Seren von SLE-Patienten mit positivem Testresultat im Farr RIA, (C) nur die Seren von SLE-Patienten mit positivem Testresultat im Farrzyme-ELISA verwendet. Zusätzlich sind die AUC-Werte und deren 5-95 % Konfidenzintervalle dargestellt.

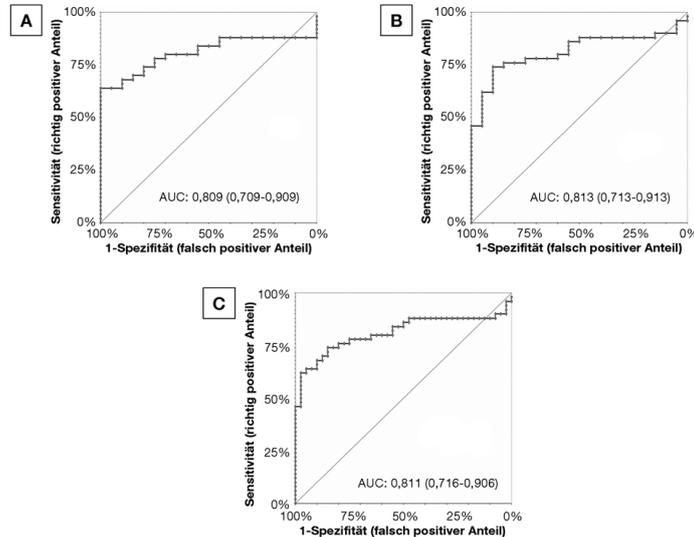


Abbildung 3.35: ROC-Kurven des anti-dsDNA Biosensors für verschiedene Szenarien. Als Positivgruppe wurden (A) nur die Seren von SLE-Patienten mit positivem Testresultat im ELIA, (B) nur die Seren von SLE-Patienten mit positivem Testresultat im Bindazyme-ELISA, (C) nur die Seren von SLE-Patienten mit positivem Testresultat im Orgentec-ELISA verwendet. Zusätzlich sind die AUC-Werte und deren 5-95 % Konfidenzintervalle dargestellt.

dazu diskriminiert der Biosensor deutlich besser, wenn nur ausgewählte SLE-Seren beachtet werden. Sehr gute Werte von 0,933 - 0,974 erhält man dabei bei Beschränkung auf Patienten mit Glomerulonephritis bzw. mit positiven anti-dsDNA Werten im Farr RIA oder im Farrzyme-ELISA, zwei relativ restriktiven Tests (Abb. 3.34). Ein Ausschluss von Patienten mit negativen Werten in den verbleibenden drei Testsystemen führt wiederum zu keiner signifikanten Änderung (Abb. 3.35).

Ein Teil der SLE-Patienten wird vom anti-dsDNA Biosensor also nicht erfasst. Dies sind bevorzugt solche ohne Nephritis bzw. mit negativen Ergebnissen auch in anderen, vor allem restriktiven Tests. Da davon auszugehen ist, dass sich die meisten der Patienten einer Pharmakotherapie unterziehen und damit ein tatsächlicher Rückgang von anti-dsDNA verbunden ist, kann dies als plausibles Ergebnis betrachtet werden.

3.4.2 Methodenvergleich

Neben der Auswertung und Beurteilung der qualitativen Information positiv/negativ sollte auch das in der Einheit IU/ml erhaltene quantitative Ergebnis des anti-dsDNA Biosensors mit den Ergebnissen der anderen Assays verglichen werden. Hierfür wurden nur die in Tabelle 3.8 dargestellten Werte der 50 SLE-Patienten verwendet, da für die Kontrollseren zum einen keine ausreichenden Daten zur Verfügung standen und diese außerdem fast ausschließlich sehr niedrige, als negativ zu bewertende Werte lieferten. Die SLE-Seren hingegen decken für alle Tests einen weiten Bereich von negativ bis stark positiv ab.

Trägt man die in zwei Methoden erhaltenen Messwerte in einem Graphen gegeneinander auf, entsteht bei idealer Übereinstimmung der beiden Messmethoden eine Gerade durch den Nullpunkt mit der Steigung 1. Durch Regression lassen sich dann relativ einfach Aussagen über Abweichungen treffen. In Abbildung 3.36 wird der anti-dsDNA so gegen die angegebenen Vergleichswerte verglichen. Für die Regression wurde dabei die für klinisch-chemische Methodenvergleiche übliche Methode von PASSING & BABLOK (252) zugrunde gelegt.

Wie erwartet, zeigt sich hier sehr deutlich die im Theorieteil ausführlich besprochene mangelnde Vergleichbarkeit der Methoden. Im Vergleich zu A-C wurde gar kein linearer Zusammenhang festgestellt. Zu A, B und D besteht eine konstante Abweichung, während im Vergleich zu C-E die Steigung der Regressionsgeraden sehr weit von 1 zu höheren Werten abweicht. Letzteres ist so zu interpretieren, dass der Biosensor grundsätzlich höhere Werte misst als der sehr restriktive und unter harschen Bedingungen durchgeführte Farrzyme-ELISA, der ELIA von Phadia bzw. der Farr-RIA.

Beim Methodenvergleich nach BLAND & ALTMAN (Abbildung 3.37) ist auf der Abszisse den Mittelwert jeweils zweier Messverfahren (Biosensor versus kommerzielle Methode) dargestellt. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Messwerten der beiden Messverfahren aufgetragen. Bei den Methoden C-E zeigt sich durch die Differenz zwischen gemeinsamem Mittelwert und der Nulllinie ein weiteres Mal die bereits

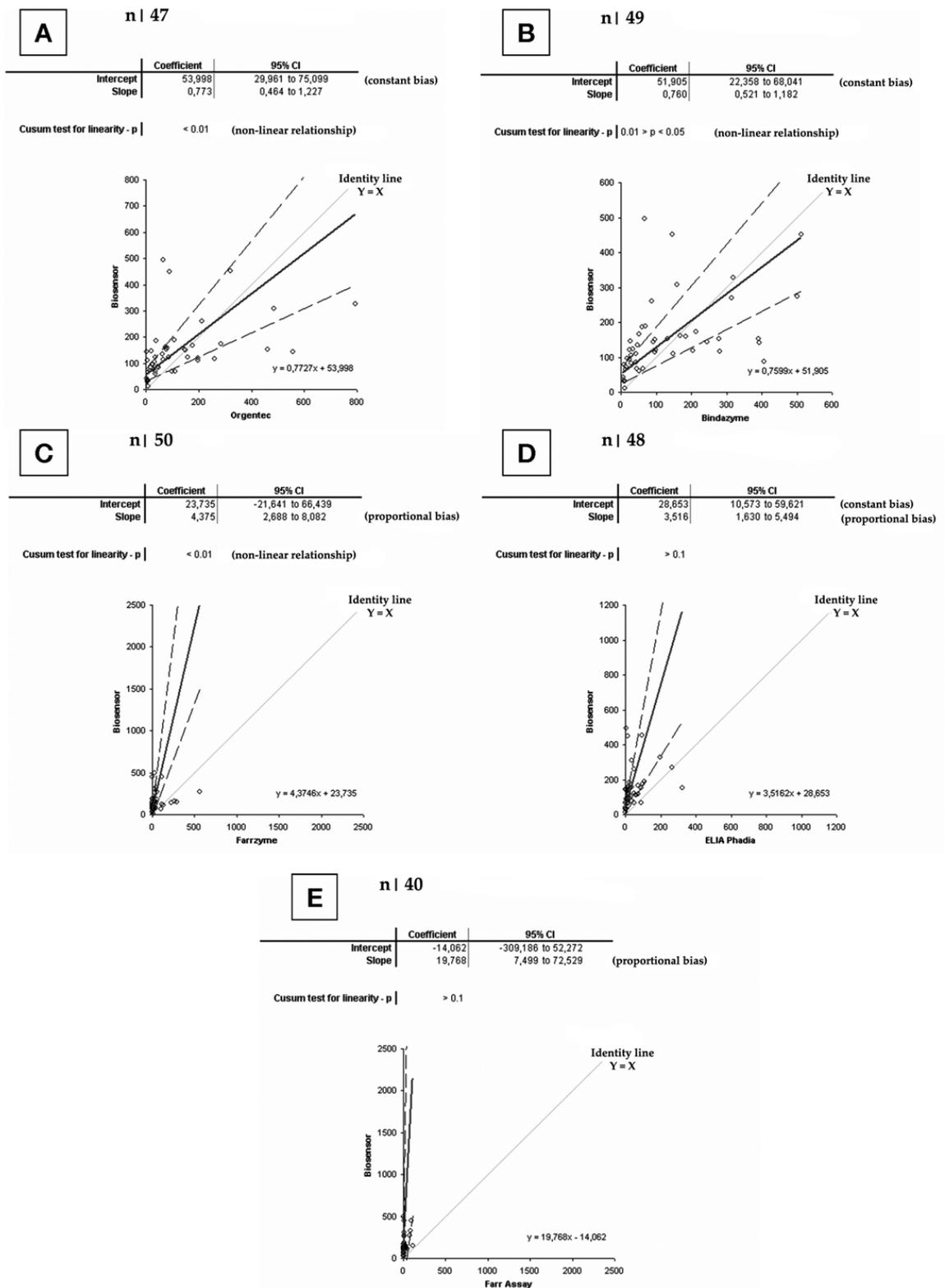


Abbildung 3.36: Regression nach PASSING & BABLOK bei Vergleich des anti-dsDNA Biosensors gegen A, den Orgentec-ELISA; B, den Bindazyme-ELISA; C, den Farrzyme-ELISA; D, den ELIA von Phadia und E, den Farr-RIA. Durchgehende Linie, Regressionsgerade. Gestrichelte Linien, 95 %-Konfidenzintervall für die Regression (nicht für einzelne Messwerte!).

	Mittelwert [RU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Chip 1 (n = 61)	305,6	23,9	7,8 %
Chip 2 (n = 6)	463,0	26,9	5,8 %
Chip 3 (n = 6)	393,2	44,5	11,3 %
Chip 4 (n = 13)	321,4	11,0	3,4 %
Chip 5 (n = 34)	431,8	55,8	12,9 %

Tabelle 3.10: Anbindungswerte des Kalibrators dsDNA-mAb32

durch die erhöhte Steigung in der Regression nach PASSING & BABLOK festgestellte systematische Abweichung. Die Streuung erhöht sich bei höheren Messwerten. Dies ist besonders eindrucksvoll beim Vergleich gegen den Farr-Assay sichtbar, wo im Biosensor grundsätzlich höhere Werte gemessen werden.

3.4.3 Verhalten des Kalibrators

Abbildung 3.38 zeigt die relativen Anbindungen der Injektionen des Kalibrators dsDNA-mAb32. Außerdem wurden einige Injektionen des oben beschriebenen Antikörpers dsDNA-mAb33, der keine echte Doppelstrangspezifität an den Tag gelegt hatte (vgl. Abb. 3.31), getätigt. Die mit dsDNA-mAb32 erhaltenen Mittelwerte und Abweichungen sind in Tabelle 3.10 angegeben.

Dabei wird deutlich, dass es trotz der einheitlichen Herstellungsprozedur der verschiedenen Chips zu deutlichen Abweichungen ihrer Bindungskapazität kommt. Der Einsatz eines Kalibrators ist damit unabdinglich, um die ansonsten schlechte **Interassay-Präzision** (VK = 19,9 %) auszugleichen. Darüberhinaus ist die Bedeutung der Kalibration auf Wo/80, wie auf jedes andere zu diesem Zweck herangezogene *Serum*, aus bereits ausführlich erläuterten Gründen äußerst zweifelhaft.

Die **Intraassay-Präzision** reicht von gut bis mäßig, wobei sie sich in einem für die Autoimmundiagnostik akzeptablen Rahmen bewegt. Auch hier zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Chips. Die Oberfläche von Chip1, der chronologisch als erster mit frisch angefertigtem hTf-dsDNA-Coatingkonjugat hergestellt wurde, überdauerte etwa 400 Messungen und zeigte dabei ein relativ konstantes Bindungsverhalten, während bei Chip5 ein gewisser Abwärtstrend festgestellt werden kann. Da bereits bei der Vermessung der monoklonalen Antikörper (Abschnitt 3.3) ein gewisser Alterungsprozess beobachtet wurde, scheint es wahrscheinlich, dass eine systematische Optimierung der hTf-dsDNA Qualität die Präzision der Biosensormessungen weiter verbessern könnte.

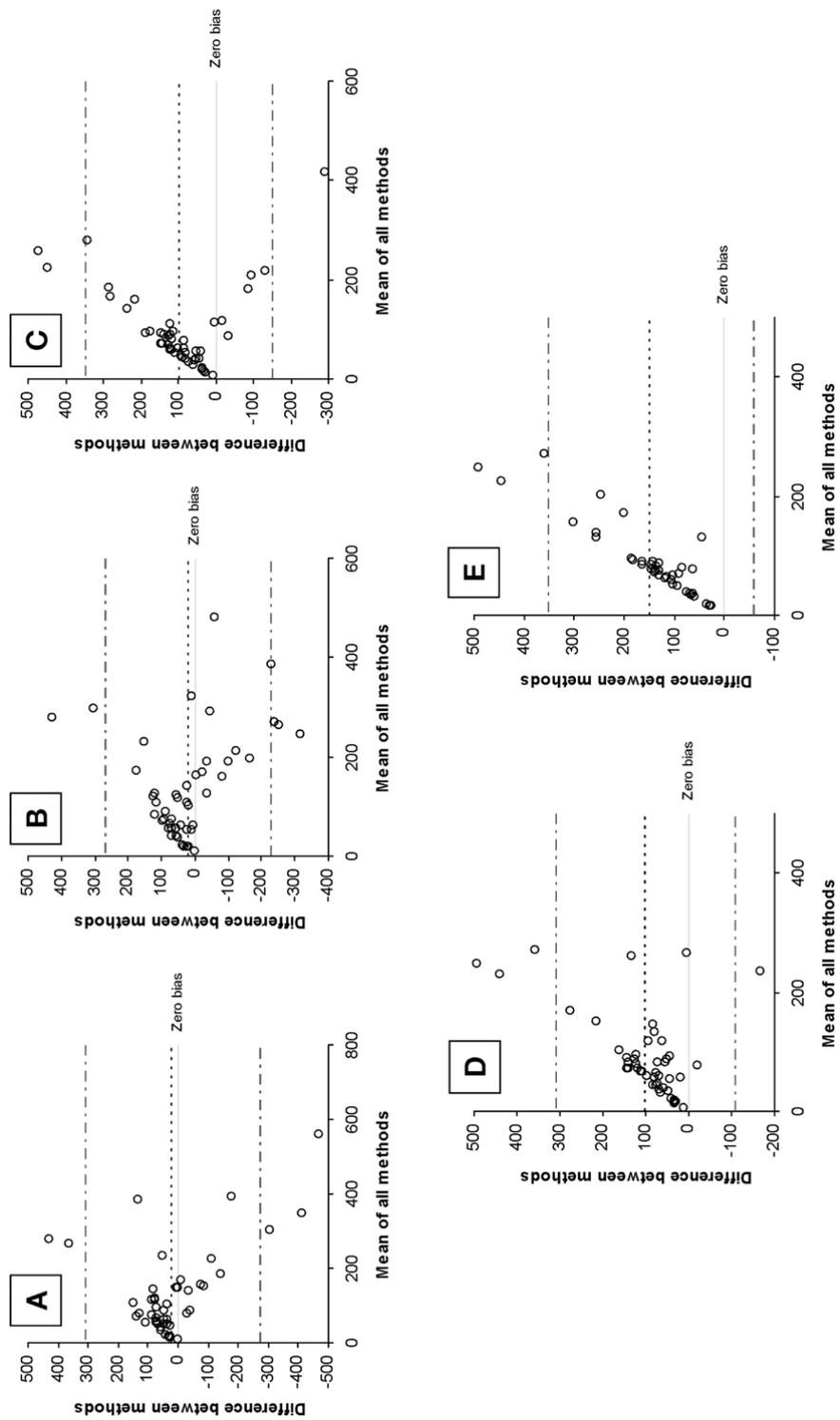


Abbildung 3.37: Darstellung nach BLAND & ALTMAN zum Vergleich der anti-dsDNA Biosensor Messwerte mit den in anderen Assays erhaltenen Daten. A, Orgentec-ELISA; B, Bindazyme-ELISA; C, Farrzyme-ELISA; D, ELIA von Phadia; E, Farr-RIA.

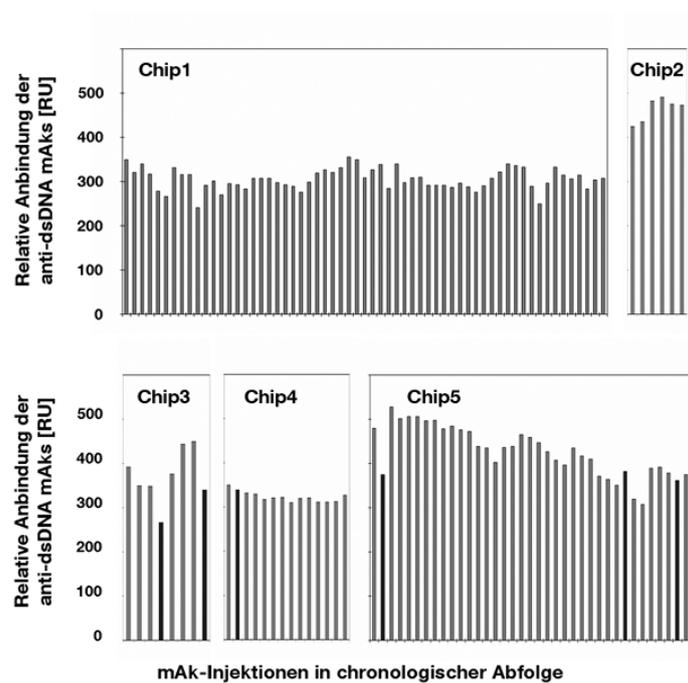


Abbildung 3.38: Relative Anbindungen der Injektionen von dsDNA-mAb32 (hellgraue Balken) und dsDNA-mAb33 (dunkelgrau) auf fünf Biosensorchips

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges, auf SPR-Biosensorik beruhendes Messverfahren zur **Detektion von anti-dsDNA-Autoantikörpern** etabliert und evaluiert. Das Auftreten von anti-dsDNA im Serum ist spezifisch für den Systemischen Lupus Erythematodes, eine schwerwiegende Autoimmunerkrankung mit potentiell letalen Folgen. Der Nachweis dieser Autoantikörper ist von hohem Wert sowohl für die Erstdiagnose als auch für das spätere Monitoring, da sich Krankheitsexazerbationen häufig durch einen Anstieg der anti-dsDNA-Spiegel ankündigen.

Im ersten Teil des Projektes stand der Aufbau einer geeigneten, mit dsDNA beschichteten Sensoroberfläche im Vordergrund. **Als instrumentelle Plattform sollte ein Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensor mit austauschbaren Messoberflächen im Chipformat benutzt werden.** Damit waren wesentliche Teile des Sensors, wie Transducer, Mikrofluidik und Prozessor, bereits definiert. Eine weitere Voraussetzung ergab sich dadurch, dass die Biosensorchips regenerierbar gestaltet werden sollten, um für eine hohe Zahl von Messungen zur Verfügung zu stehen. Hierfür wurde eine **neue Biokonjugationsstrategie zur schnellen, effektiven und robusten Immobilisierung von maßgeschneiderter dsDNA** entwickelt. Ein synthetisches Oligonukleotid wurde mit Hilfe von Hydrazin-Aldehyd-Biokonjugationschemie mit biotinyliertem Transferrin gekoppelt und mit einem passenden Gegenstrang unter Ausformung eines Überhangs hybridisiert. Als eigentliches Antigen wurde rekombinante humane DNA per PCR vervielfältigt und dabei an beiden Enden um die Erkennungssequenz des nicht palindromischen Restriktionsenzymes *BssSI* verlängert. Nach Restriktionsverdau konnte dieses DNA-Fragment enzymatisch an das Protein-ODN-Konjugat ligiert werden. Das komplette Protein-dsDNA-Konstrukt ließ sich anschließend schnell und effizient im Durchfluss auf Streptavidin-beschichtete Oberflächen anbinden und anschließend über den Proteinanker kovalent fixieren. Dieses komplexe Vorgehen wurde den gestellten Anforderungen in hohem Maße gerecht: die Immobilisierung des mit einigen Tagen Arbeitsaufwand auf Vorrat hergestellten Protein-dsDNA-Coatingkonjugats kann sehr schnell und zuverlässig im Durchfluss bewerkstelligt werden. Die entstehenden Oberflächen binden anti-dsDNA-Antikörper zuverlässig und konnten nach Regeneration teilweise für mehrere hundert Messungen benutzt werden. Eine Optimierung des Herstellungsprozesses sowie eine systematische Evaluierung von Stabilität und Lagerbedingungen wurde nicht durchgeführt.

Der zweite Teil der Arbeit widmete sich der ersten Evaluation der Oberfläche. Hier

konnte die grundsätzliche gute Funktionsweise des Konzepts demonstriert werden. Antikörperkontrollen zeigten das gewünschte positive oder negative Bindungsverhalten. Daneben banden weder gereinigte Antikörper noch verdünnte Seren in nennenswertem Ausmaß auf die als Referenz vorgesehene DNA-freie hTf-Oberfläche. Durch eine isotypspezifische Abreicherung von Antikörpern aus Seren mit anschließender Vermessung auf dem anti-dsDNA-Biosensor konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Anbindung tatsächlich durch Immunglobuline verursacht wird und nicht durch unspezifische Effekte zustande kommt. Seren von SLE-Patienten konnten von denen einer Kontrollgruppe signifikant unterschieden werden. Die Bindung der Antikörper konnte außerdem durch Zugabe freier DNA konzentrationsabhängig inhibiert werden. Der Biosensor scheint damit gut geeignet für die Detektion von anti-dsDNA, sowohl in gereinigter Form als auch in komplexer Serummatrix. Nennenswerte Matrixeffekte, Störungen der Messung durch irrelevante Serumkomponenten, wurden nicht beobachtet.

Nach Demonstration der Funktionsfähigkeit wurde der Biosensor für die Charakterisierung von anti-dsDNA-Antikörpern eingesetzt. In der Messung kinetischer und thermodynamischer Konstanten liegt eine der Schlüsselkompetenzen der eingesetzten SPR-Technologie und ein echter Fortschritt im Vergleich zu den etablierten Assays. Die ursprünglich angedachte kinetische Vermessung von Patientenseren ist leider nicht möglich. Zum einen handelt es sich um polyklonale Mischungen, sodass immer nur gewichtete Durchschnittswerte angegeben werden können, zum anderen ist auch hierfür die Kenntnis der molaren Konzentration der relevanten Antikörper nötig. Relevant sind hier alle Antikörper mit Affinität gegen DNA, die zum Messergebnis beitragen. Die Messung des Gesamtimmunglobulins oder von anti-dsDNA mit konkurrierenden Assays kann von vornherein zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führen. Aus diesem Grund wurden kinetische Messungen auf monoklonale Antikörper beschränkt. Da zur Zeit kein geeigneter Kalibrator für anti-dsDNA-Assays zur Verfügung steht, bzw. auch die bisherige Situation analytisch unbefriedigend war, sind die erhaltenen Informationen sehr wertvoll, da die charakterisierten mAKs sehr gut als Kalibratoren geeignet wären. Hierfür wurden kinetische Konstanten, sowie die funktionelle Affinität von drei mAKs ermittelt, die Affinitäten wurden anschließend in **Gelshift-Experimenten** als unabhängiger Referenzmethode bestätigt. Daneben wurden Reaktionsprofile mit verschiedenen DNA-Spezies erstellt. Nur einer der drei Antikörper war im Farr-Assay reaktiv, was hypothetisch auf seine im Gegensatz zu den anderen beiden Antikörpern sehr langsame Dissoziationskinetik zurückgeführt wurde.

Für zukünftige Arbeiten ergibt sich aus den Analysen der monoklonalen Antikörper ein äußerst interessanter Ansatz: da das Verhalten von anti-dsDNA in den unterschiedlichen Assays möglicherweise nicht nur von ihrer Affinität, sondern entscheidend von ihren kinetischen Eigenschaften abhängt, liegt es nahe, ein größeres Panel monoklonaler Antikörper mit möglichst unterschiedlichen Bindungseigenschaften auf dem Biosensor zu charakterisieren und diese anschließend einzeln sowie in Mischungen mit den

etablierten Labormethoden zu vermessen. So wäre es erstmals möglich, valide Aussagen über die Eigenschaften dieser Methoden, sowie fundierte Rückschlüsse auf die Zusammensetzung positiver Patientenserum zu treffen. Auch eine Kalibration mit sauber charakterisierten monoklonalen Antikörpern scheint wesentlich aussagekräftiger als bei Verwendung eines beliebigen Serums.

Als vierter und letzter Teil des Projekts wurde eine klinische Studie mit nicht vorselektierten SLE-Seren und einem aus gesunden Spendern und an anderen Autoimmunerkrankungen als SLE erkranktem Kontrollkollektiv durchgeführt, wobei die beiden Gruppen sehr gut voneinander diskriminiert werden konnten. **Der Biosensor kommt damit auch als Werkzeug für das Routinelabor in Betracht.** Bei Benutzung aufwändigerer Geräte kann die Automation (z.B. BIAcore T100, BIAcore A100) oder hohe Parallelisierung der Messungen (z.B. BIAcore Flexchip) ohne weiteres realisiert werden.

Bei dem hier präsentierten anti-dsDNA Biosensor handelt es sich damit um ein sehr vielseitiges Instrument zur Vermessung von dsDNA-spezifischen Autoantikörpern. Im Vergleich zu bereits existierenden, etablierten Methoden bringt er einige Vorteile mit sich, auf die abschließend mit Nachdruck hingewiesen werden soll. Die Interaktion wird unter homogenen Bedingungen, d.h. ohne Pufferwechsel oder Waschschrte beobachtet, wodurch vor allem auch solche Wechselwirkungen mit schneller Dissoziationskinetik erfasst werden. Da die Interaktionen zeitaufgelöst verfolgt werden, ist es möglich, kinetische und thermodynamische Konstanten zu ermitteln. Ein Abwarten des Gleichgewichtszustandes ist unnötig, sodass Messungen in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden können. Markierungsfrei arbeitende Transducertechnologie, sowie ein Durchflusssystem zum Erhalt konstanter Analytkonzentrationen erleichtern diese Messungen. Daneben macht die Möglichkeit zur Automatisierung und Parallelisierung den Biosensor auch für die routinemäßige Vermessung von Patientenproben interessant.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Zubehör

ÄKTA FPLC Chromatographiesystem (GE Healthcare, Freiburg), bestehend aus:

Fraktionssammler Frac-900

Pumpe P-920

Monitor UPC-900

Ventil INV-907

Software Unicorn 4.0

Analysenwaage (Analytic AC 1203, Sartorius AG, Göttingen)

Achtkanalphotometer für Mikrotiterplatten (ELx808, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)

BioPhotometer (6131000.012, Eppendorf AG, Hamburg)

Chemilumineszenzfilme (Hyperfilm ECL, 28906837, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

Einmalküvetten für BioPhotometer (UVette, 0030106.300, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Elektrophoresesystem für horizontale Gele (Mupid-exU, MU-0040, Eurogentec, Köln)

Elektrophoresesystem für vertikale Gele (Mini Protean 3, Bio-Rad, München)

Immunoblot Apparatur (Transblot, Bio-Rad, München)

Mikrotiterplatten (92696, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

Schüttelinkubator (Thermomixer comfort, 5355000.011, Eppendorf AG, Hamburg)

Sensorchips SA (BR-1000-32, GE Healthcare, Freiburg)

SPR-Biosensor Biacore X mit Biacore X Control Software und BIAevaluation 3.0 (GE Healthcare, Freiburg)

Superdex 200 HR 10/30 Gelchromatographiesäule (17-1088-01, GE Healthcare, Freiburg)

Superose 6 HR 10/30 Gelchromatographiesäule (17-0537-01, GE Healthcare, Freiburg)

Thermocycler (primus 25 advance, 95-4002, PEQLAB, Erlangen)

Vivaclear Zentrifugalfilter (VK01P042, Sartorius, Göttingen)

Vivaspin 2 10.000 MWCO Zentrifugalkonzentratoren (VS0202, Sartorius, Göttingen)

Vivaspin 2 30.000 MWCO Zentrifugalkonzentratoren (VS0202, Sartorius, Göttingen)

Zweistrahlphotometer (ATI Unicam, Cambridge, UK)

5.2 Verbrauchsmaterialien

5.2.1 Chemikalien, Enzyme & Kits

4-Nitrobenzaldehyd (72800, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Acrylamid 40%-ige Stammlösung, Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (161-0144, Bio-Rad, München)
Acrylamid 40%-ige Stammlösung, Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (161-0148, Bio-Rad, München)
Agarose, high resolution (Rotigarose, K297.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Albumin aus bovinem Serum ~99% (BSA, A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers Proteinlängenmarker (RPN800, GE Healthcare, Freiburg)
Amine Coupling Kit (BR-1000-50, GE Healthcare, Freiburg)
Ammoniumperoxodisulfat (A3678, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Anti-Human IgA (α -Ketten spezifisch)–Agarose (A2691, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Anti-Human IgG (Fc spezifisch)–Agarose (A3316, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Anti-Human IgM (μ -Ketten spezifisch)–Agarose (A9935, Sigma-Aldrich, Steinheim)
BssSI 4 U/ μ l und NEBuffer 3 (R0587S, New England Biolabs, Frankfurt am Main)
Biotin Labeling Kit (11418165001, Roche, Mannheim)
Citronensäure Monohydrat (1.00244.1000, Merck, Darmstadt)
Coomassie Brilliantblau R250 (B0630, Sigma-Aldrich, Steinheim)
dCTP, [α -³²P]-markiert, 3000 Ci/mmol (BLU013H001MC, Perkin-Elmer, Brüssel, Belgien)
Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes (D1626, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (1.06586.1000, Merck, Darmstadt)
Dimethylsulfoxid \geq 99.9% (DMSO, D8418, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (1.06586.1000, Merck, Darmstadt)
Dithiothreitol (43819, Sigma-Aldrich, Steinheim)
DNA-Auftragspuffer (10816-015, Invitrogen, Karlsruhe)
DNA-Längenmarker 1 Kb Plus (10787-018, Invitrogen, Karlsruhe)
DNA-Längenmarker 50 bp (10416-014, Invitrogen, Karlsruhe)
DNA-Längenmarker 100 bp (15628-050, Invitrogen, Karlsruhe)
Essigsäure (1.00063.2500, Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung 1 % w/v (2218.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
EDTA (Titriplex III, 1.08418.01000, Merck, Darmstadt)
Glycerol (67893, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Glycin (1.04169.1000, Merck, Darmstadt)
HEPES (H4034, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaliumchlorid (1.049330.500, Merck, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat (60230, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (11008404001, Roche, Mannheim)
MES $\geq 99.5\%$ (M5287, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Methanol (1.06007.2500, Merck, Darmstadt)
n-Octyl β -D-Glucopyranosid $\geq 99\%$ (39473, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumchlorid (1.01540.5000, Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxidplättchen (1.06495.0250, Merck, Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat (SDS, 71725, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Nitrocellulose Membran (162-0115, Bio-Rad, München)
peqGOLD dNTP-Mix (20-3011, PEQLAB, Erlangen)
Polyethylenglycol 3350 (PEG, P-4338, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Polyvinylpyrrolidon (PVP, 24-3780, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Protein-Auftragspuffer RotiLoad (K929.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set (500-0206, Bio-Rad, München)
Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (500-0205, Bio-Rad, München)
Salzsäure rauchend 37% (1.00317.1000, Merck, Darmstadt)
SANH (22400, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
Skim Milk Powder (70166, Sigma-Aldrich, Steinheim)
SuperSignal West Dura (34075, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
Surfactant P20 (BR-1000-54, GE Healthcare, Freiburg)
T4 DNA-Ligase 400 U/ μ l und Reaktionspuffer (M0202L, New England Biolabs, Frankfurt am Main)
Taq DNA-Polymerase 5 U/ μ l mit Inkubationspuffer (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA) (EPTQA025, Qbiogene, Illkirch, France)
TBE 10-fach Konzentrat (15581-044, Invitrogen, Karlsruhe)
TEMED (2367.3, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Transferrin human $\geq 98\%$ (T3309, Sigma, Deisenhofen)
Tricin (1.086020.250, Merck, Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, 1.08382.1000, Merck, Darmstadt)
Tween-20 (P9416, Sigma-Aldrich, Steinheim)

5.2.2 Antikörper und Antiseren

Name	Spezifität/Besonderheiten	Hersteller
HYB331-01 [0,5 mg/ml]	ssDNA und mit höherer Affinität dsDNA (223); IgG1a murin	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
F7-26 [0,1 mg/ml]	ssDNA, keine Reaktivität gegen dsDNA (224; 225; 226; 227); IgM murin	Hölzel Diagnostika, Köln
dsDNA-mAb32 [0,43 mg/ml]	Deklaration $1,4 \times 10^5$ IU/ml	Diarect AG, Freiburg
dsDNA-mAb33 [0,075 mg/ml]	Deklaration $2,2 \times 10^5$ IU/ml	Diarect AG, Freiburg
Wo/80	Deklaration 200 IU/ml	CLB, Amsterdam, The Netherlands
rabbit anti-human hTf	HRP-markiert; polyklonal	R1112HRP, Acris Antibodies, Hiddenhausen

5.2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden grundsätzlich in lyophilisierter Form erhalten und nach Empfang sofort 100 μ M in Aqua pur. aufgelöst, aliquotiert und bei -20°C eingelagert. Lediglich CHO-ODN wurde in einer Konzentration von 1 mM eingelagert. Die Verdünnung auf andere Konzentrationen erfolgte bei Bedarf.

Name	Sequenz	Modifikation	Hersteller
CHO-ODN	5' TTT AGC TAG CGG CCG CTC CAC TAG 3'	5'-Aldehyd	Solulink, San Diego, CA, USA
ren231fw	5' GAT ACA CAC GAG ATG GGT GCC TCA GAG CAG 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
ren231rev	5' GAT ACA CAC GAG GTG GTT GTG ATT TTC CAT AA 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
hairpin-ODN	5' TCG TGA ACG TCC GAC TAT AGG ACG TTC 3'	5'-Phosphat	MWG Biotech AG, Ebersberg
as-ODN	5' TCG TCT AGT GGA GCG GCC GCT AGC TAA A 3'	5'-Phosphat	MWG Biotech AG, Ebersberg
ODN1	5' AAA ACT AAG GCC TTG CTA GCA GAA GC 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
ODN2	5' GCT TCT GCT AGC AAG GCC TTA G 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB1	5' GAT ACA CCG T 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB2	5' ACG GTG TAT C 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB3	5' GAT ACA CCG TCA GTG AGC CCG TGA 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB4	5' TCA CGG GCT CAC TGA CGG TGT ATC 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB5	5' GAT ACA CCG TCA GTG AGC CCG TGA TAA TAC CAG GAT ACA GGA 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg
INHIB6	5' TCC TGT ATC CTG GTA TTA TCA CGG GCT CAC TGA CGG TGT ATC 3'		MWG Biotech AG, Ebersberg

Tabelle 5.1: Eingesetzte Oligonukleotide

5.2.4 Patientenproben

5.2.4.1 Für Pilotmessungen (Abschnitt 3.2) verwendete Serumproben

Für die ersten Pilotmessungen wurden 42 Serumproben von 13 SLE-Patienten (a-m) vermessen. Für den Fall, dass mehrere Proben eines einzelnen Patienten zum Einsatz kamen, wurden diese chronologisch nach Abnahmedatum durchnummeriert (z.B. a-1 bis a-5). Alle SLE-Patienten erfüllten mindestens vier der Diagnosekriterien des ACR (3; 4).

Eine Kontrollgruppe bestand aus 18 Patienten mit Autoimmunerkrankungen außer SLE und dem häufig damit assoziierten Antiphospholipidsyndrom. Von diesen litten drei an Sjögren's Syndrom, acht an rheumatoider Arthritis (hiervon sieben mit juveniler RA), zwei an systemischer Sklerose, zwei am Sharpsyndrom und je einer an Polymyalgia rheumatica, Morbus Crohn und Dermatomyositis. Alle Patienten wurden am Klinikum

rechts der Isar rekrutiert, die Serumproben waren nicht individuell identifizierbare Reste aus der Routineanalytik gemäß dem entsprechenden FDA Dokument, "Guidance on Informed Consent for In Vitro Diagnostic Device Studies Using Leftover Human Specimens That Are Not Individually Identifiable – Guidance for Sponsors, Institutional Review Boards, Clinical Investigators and FDA Staff" (OMB control no. 0910–0582, issued April 25, 2006; <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1588.html>).

Desweiteren wurden 39 Seren von freiwilligen Spendern benutzt. Diese waren Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie bzw. Medizinstudenten. Mitglieder dieser Gruppe wurden nicht individuell untersucht, erschienen jedoch gesund.

5.2.4.2 Für klinische Evaluation (Abschnitt 3.4) verwendete Serumproben

Für die klinische Evaluation des Messverfahrens wurden 50 Serumproben von klinisch gut charakterisierten SLE-Patienten verwendet, welche freundlicherweise von Dr. H.-P. Jäkel (Dietrich Bonhoeffer Klinikum, Institut für Labordiagnostik, Neubrandenburg) zur Verfügung gestellt wurden. Die anonymisierten Proben entstammen einer Studie zum Vergleich verschiedener anti-dsDNA Labormethoden (134), sodass neben dem klinischen Bild auch anti-dsDNA Vergleichswerte zur Verfügung standen. Alle Patienten haben Antikörper gegen Zellkernbestandteile (Antinukleäre Antikörper, ANA).

Als Kontrollgruppe kamen die Seren von 20 freiwilligen gesunden Spendern (siehe oben), sowie von 20 Patienten mit Autoimmunerkrankungen außer SLE und dem häufig damit assoziierten APS zum Einsatz. Von diesen litten sieben an Morbus Wegener, drei an rheumatoider Arthritis, sieben an autoimmunen Lebererkrankungen und drei an Myasthenia gravis. Einschlusskriterium war nicht eine klare Diagnose der Erkrankung, sondern der Nachweis jeweils relevanter Autoantikörper (Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper, Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid, anti-mitochondriale Antikörper bzw. Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper). Diese Patienten wurden am Klinikum rechts der Isar rekrutiert, die Serumproben waren nicht individuell identifizierbare Reste aus der Routineanalytik gemäß dem FDA Dokument, "Guidance on Informed Consent for In Vitro Diagnostic Device Studies Using Leftover Human Specimens That Are Not Individually Identifiable – Guidance for Sponsors, Institutional Review Boards, Clinical Investigators and FDA Staff" (OMB control no. 0910–0582, issued April 25, 2006; <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1588.html>).

5.3 Puffer und Lösungen

2M HCl zur pH-Werteinstellung

HCl rauchend 37%	ca. 2 M	10 ml
Aqua pur.		ad 60 ml

2M NaOH zur pH-Werteinstellung

NaOH-Plätzchen	2 M	8 g
Aqua pur.		100 ml
4-NBA-Stammlösung		
4-NBA	50 mM	75,6 mg
DMSO		ad 10 ml
4-NBA-Farbreagenz		
4-NBA-Stammlösung	0,5 mM	500 µl
MES	100 mM	976 mg
Aqua pur.		ad 40 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 5,0
Aqua pur.		ad 50 ml
Biotin-7-NHS Lösung		
Biotin-7-NHS (aus Biotin Labeling Kit)	44,4 mM	5 µg (ein Gefäß)
DMSO		ad 250 µl
Phosphate buffered saline (PBS, pH 7,6)		
KH ₂ PO ₄	1,76 mM	0,24 g
Na ₂ HPO ₄	10,14 mM	1,44 g
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
Aqua pur.		ad 1000 ml
SANH-Modifikationspuffer		
Na ₂ HPO ₄	100 mM	890 mg
NaCl	150 mM	438 mg
Aqua pur.		ad 40 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,3
Aqua pur.		ad 50 ml
Konjugationspuffer pH 6,0		
Citronensäure-Monohydrat	100 mM	1051 mg
NaCl	150 mM	438 mg
Aqua pur.		ad 40 ml
2 M NaOH		q.s. für pH-Einstellung 6,0
Aqua pur.		ad 50 ml
FPLC-Laufpuffer		
Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	150 mM	8,77 g
Aqua pur.		ad 800 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,6
Aqua pur.		ad 1000 ml

SANH-Lösung

SANH	57,4 mM	25 mg
DMSO		ad 1,5 ml

HBS-N

HEPES	10 mM	1,19 g
NaCl	150 mM	4,38 g
Aqua pur.		ad 400 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,4
Aqua pur.		ad 500 ml

HBS-EP 250

HEPES	10 mM	1,19 g
NaCl	250 mM	7,31 g
EDTA	3 mM	0,56 g
Surfactant P20 10 %	0,005 % (w/v)	250 µl
Aqua pur.		ad 400 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,4
Aqua pur.		ad 500 ml

HBS-BO

HEPES	10 mM	1,19 g
NaCl	150 mM	4,38
BSA	0,1 % (w/v)	0,5 g
n-Octyl β-D-Glucopyranosid	0,005 % (w/v)	0,025 g
Aqua pur.		ad 400 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,4
Aqua pur.		ad 500 ml

Biosensor-Regenerationslösung

NaOH	50 mM	0,2 g
NaCl	1 M	5,8 g
Aqua pur.		ad 100 ml

EMSA-Bindungspuffer, 10x Konzentrat

Tris	100 mM	6,06 g
KCl	500 mM	1,86 g
DTT	10 mM	77,1 mg
Aqua pur.		ad 40 ml
2 M HCl		q.s. für pH-Einstellung 7,5
Aqua pur.		ad 50 ml

Trenngel 7,5 %

3x Gelpuffer		10 ml
Acrylamid 40%-ige Stammlösung (Acrylamid/Bis = 19:1)	7,5 %	5,6 ml
Glycerol		4 g
Aqua pur.		10,4 ml

Natives Trenngel 4 %

Acrylamid 40%-ige Stammlösung (Acrylamid/Bis = 37,5 : 1)	4 %	8 ml
10x TBE Puffer	1x	8 ml
Aqua pur.		ad 80 ml

APS-Lösung 10 %

Ammoniumperoxodisulfat	10 % (w/v)	100 mg
Aqua pur.		ad 1 ml

Sammelgel

3x Gelpuffer		3,1 ml
Acrylamid 40%-ige Stammlösung (Acrylamid/Bis = 19:1)		1,2 ml
Aqua pur.		8,2 ml

Anodenpuffer

Tris	0,2 M	24,23 g
Aqua pur.		800 ml
HCl rauchend 37 %		q.s. für pH-Einstellung 8,9
Aqua pur.		ad 1000 ml

Kathodenpuffer

Tris	0,1 M	12,11 g
Tricin	0,1 M	17,92 g
SDS	0,1 % (w/v)	1 g
Aqua pur.		ad 1000 ml

3x Gelpuffer

Tris	3 M	36,34 g
SDS	0,3 %	0,3 g
Aqua pur.		ad 100 ml

10x Transferpuffer

Tris	250 mM	30 g
Glycin	1,92 M	144 g
SDS	0,1 %	1 g
Aqua pur.		ad 1000 ml
1x Transferpuffer		
10x Transferpuffer	1x	200 ml
Methanol		400 ml
Aqua pur.		ad 2000 ml
Coomassie-Färbelösung		
Coomassie Brilliantblau R250	0,25 % (w/v)	0,25 g
Methanol		45 ml
Essigsäure		10 ml
Aqua pur.		45 ml
Coomassie-Entfärbelösung		
Methanol	1,92 M	45 ml
Essigsäure	0,1 %	10 ml
Aqua pur.		45 ml
TBS		
Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	500 mM	29,24 g
Aqua pur.		ad 1000 ml
TTBS		
Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	500 mM	29,24 g
Tween-20	0,05 % (w/v)	0,5 ml
Aqua pur.		ad 1000 ml
Blocking Solution		
Skim Milk Powder	5 % (w/v)	5 g
PEG 3350	1 % (w/v)	1 g
PVP 10000	1 % (w/v)	1 g
TTBS		ad 100 ml
1x TBE		
10x TBE	1x	100 ml
Aqua pur.		ad 1000 ml
0,5x TBE		
10x TBE	0,5x	50 ml
Aqua pur.		ad 1000 ml

5.4 Methoden

5.4.1 Allgemeine Methoden der Biochemie

Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt näherungsweise mit dem Quick Start Bradford Protein Assay Kit von Bio-Rad nach Anleitung des Herstellers. Dafür werden je 5 μl Proteinstandard bzw. unbekannte Probe in Duplikaten in Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit je 250 μl Farbreagenz versetzt. Nach 5-10 Minuten Inkubation wird die Platte bei 595 nm ausgelesen, eine Standardkurve durch Auftragen von Absorptionen gegen Proteinkonzentrationen erstellt, und die Konzentration der unbekanntenen Proben anhand dieser Kurve ermittelt.

Bestimmung der dsDNA-Konzentration einer Lösung

Die näherungsweise Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im Biophotometer gegen den entsprechenden DNA-freien Puffer. Die Lösung wird vor der Messung auf eine erwartete Konzentration von ca. 10-100 ng/ μl verdünnt. Aus der gemessenen Absorption wird die Konzentration durch Multiplikation mit dem Faktor 50 ng/ μl berechnet.

Agarose Gelelektrophorese

Die analytische Agarose-Gelelektrophorese wird unter Anwesenheit von Ethidiumbromid zur Visualisierung durchgeführt. Hierzu werden 3 % w/v Agarose unter Sieden in TBE-Puffer gelöst, mit 1/10.000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenkamm gegossen. Das erstarrte Gel wird in die mit TBE gefüllte Gelkammer gelegt und beladen. Dazu werden die zu untersuchenden DNA-Lösungen (typischerweise 5 - 10 μl) mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und in je eine Tasche injiziert, ebenso 7 μl eines geeigneten Längenmarkers. Die Trennung erfolgt bei 100 V für 30 Minuten. Zur Visualisierung wird das interkalierte Ethidiumbromid durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von hTf und hTf-ODN erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von LÄMMLI (253). Die Größe der Gele beträgt dabei 8×5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm, ihre Acrylamidgesamtkonzentration 7,5 %. Zur Herstellung werden ca. 3 ml Trenngellösung mit 3 μl TEMED und 30 μl 10 % APS vermischt, in die fixierten Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wird der Ethanol entfernt und eine Mischung von etwa 1 ml Sammelgellösung, 1 μl TEMED und 10 μl 10 % APS

über das Gel gegossen, außerdem wird der Geltaschenkamm in die Flüssigkeit gedrückt. Nach Erstarren wird der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in die vertikale Kammer eingesetzt und die entsprechenden Kompartimente mit Kathoden- und Anodenpuffer befüllt. Die Proben werden mit einem Drittel ihres Volumens 4x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die gewünschte Menge Probe sowie Proteinlängenmarker wird in die Geltaschen gegeben und bei 100 V aufgetrennt bis der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Das Gel wird nun entnommen und das Sammelgel entfernt.

Western Blotting

Für den sensitiven Nachweis von hTf nach SDS-PAGE wurde die Methode des Western Blotting verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Proteingemisch mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die hierfür verwendete Immunoblot-Apparatur wird gemäß den Angaben des Herstellers benutzt, das Blotting erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 0,3 Ampere für 90 Minuten in Transferpuffer. Danach wird die Membran entnommen und 2x für je 5 Minuten in Coomassie-Entfärbelösung, sowie 1x für 5 Minuten in TBS geschwenkt. Im Anschluß wird die Membran über Nacht im Kühlraum in Blocking-Lösung geschwenkt. Nach Abschütten wird der 1/10000 in Blocking-Lösung verdünnte HRP-markierte Detektionsantikörper auf die Membran gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit TTBS für jeweils 5 Minuten wird die nach Anleitung des Herstellers gemischte WestDura-Entwicklerlösung auf der Membran verteilt. Zur Visualisierung werden mehrere Filme aufgelegt und nach Ablauf empirisch ermittelter, variierender Zeiten entwickelt.

Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das Trenngel wird sofort nach Entnahme für etwa 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Das Visualisieren der Banden erfolgt dann durch Entfärbung irrelevanter Bereiche bei Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung.

Ethidium-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das Trenngel wird sofort nach Entnahme für etwa 20 Minuten in einer etwa 0,001 % Ethidiumbromidlösung inkubiert. Zur Visualisierung wird das interkalierte Ethidiumbromid durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

Isotypspezifische Abreicherung von Igs aus Serum

Isotyp-abgereicherte Seren sind für die spätere Vermessung im Biosensor gedacht. Alle Schritte werden deshalb mit demjenigen Puffer ausgeführt, der für die Biosensormessungen zur Verwendung kommen soll. Die verwendeten anti-human-Ig-Agarose-Slurrys werden vor Benutzung gründlich und mehrmals mit dem rele-

vanten Laufpuffer gewaschen. Danach werden 18 µl Serum mit 582 µl Laufpuffer vermischt und auf 5 Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Der Rest wird verworfen. Zu den einzelnen Aliquots wird nach folgendem Schema gut homogenisierter anti-human-Ig-Agarose-Slurry pipettiert:

1. Negativkontrolle: keine Zugabe
2. IgA-Anteil: 30 µl anti-human-IgM-Agarose + 30 µl anti-human-IgG-Agarose
3. IgM-Anteil: 30 µl anti-human-IgA-Agarose + 30 µl anti-human-IgG-Agarose
4. IgG-Anteil: 30 µl anti-human-IgA-Agarose + 30 µl anti-human-IgM-Agarose
5. Positivkontrolle: 30 µl anti-human-IgA-Agarose + 30 µl anti-human-IgM-Agarose + 30 µl anti-human-IgG-Agarose

Die Proben werden 60 Minuten bei 25°C unter kräftigem Schütteln inkubiert und anschließend durch Filtration mit Vivaclear Zentrifugalfiltern vollständig von der Agarose befreit. Das resultierende Volumen wird mit Laufpuffer auf exakt 300 µl aufgefüllt.

Farr-Assay

Zur Messung von Seren und Antikörper Kontrollen im Farr-Assay wird das anti-dsDNA RIA Kit von Trinity Biotech (Bray, Ireland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Werte $> 7,0 IU/ml$ werden dabei als indikativ für SLE angesehen.

Anti-dsDNA-ELISAs

Zur Kontrollmessung von anti-dsDNA in Patientenseren wurden der Bindazyme-ELISA (MK017, The Binding Site, Schwetzingen), der Farrzyme-ELISA (MK072, The Binding Site, Schwetzingen) und der IgM-spezifische ELISA von Orgentec (ORG 204M, Orgentec, Mainz) nach Anleitung der Hersteller verwendet. Die entsprechenden Cut-off Werte sind im Ergebnisteil angegeben.

Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung werden beide Stränge in der gleichen Konzentration in Aqua pur. vermischt und gezielt im Thermocycler temperiert. Dabei werden sie für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und dann um jeweils 1 °C pro Minute auf Raumtemperatur abgekühlt.

Gelshiftassays (EMSA)

3 µg des oben beschriebenen *Bss*SI verdauten 255bp-PCR-Produkts werden als Sonde für die Gelshiftassays benutzt und zu diesem Zweck mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Hierzu wird die DNA-Lösung mit [α -³²P]dCTP und dNTPs (je 1 mM), 2 µl Klenow 10x Puffer und 1

Unit des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit Aqua pur. aufgefüllt. Die Mischung wird für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die zu analysierenden monoklonalen Antikörper werden in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit der markierten DNA-Sonde in einem Volumen von insgesamt 20 µl Bindungspuffer 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach werden die Proben mit je 4 µl 6x DNA-Auftragungspuffer versetzt, und in einem nativen 4% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die native Polyacrylamidgelelektrophorese wird entsprechend der oben SDS-PAGE durchgeführt, im Gegensatz dazu wird jedoch natives Trenngel ohne überschichtetes Sammelgel benutzt. Als Elektrophoresepuffer wird an Kathode und Anode 0,5x TBE verwendet. Die Gele werden getrocknet und DNA-enhaltende Banden mittels Autoradiographie visualisiert.

5.4.2 Herstellung von hTf-DNA-Coatingkonjugat

Biotinylierung von hTf mit Biotin Labeling Kit

10 mg Transferrin werden in 1 ml PBS gelöst und mit 28,5 µl Biotin-7-NHS Lösung versetzt. Die Mischung wird für zwei Stunden bei 20°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgt die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen in laut Protokoll des Herstellers blockierten und äquilibrierten Sephadex G-25 Säulen mit SANH-Modifikationspuffer. Die relevanten Fraktionen werden rein optisch nach Reaktion mit Bradford-Reagenz ermittelt und vereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration werden sie aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Modifikation von biotinyliertem hTf mit SANH

Ein 4 mg biotinyliertes hTf enthaltendes Volumen wird mit SANH-Modifikationspuffer auf 1 ml aufgefüllt und mit 8,7 µl SANH-Lösung versetzt. Die Lösung wird über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wird das Protein mit einer Vivaspin 2 10,000 MWCO Ultrafiltrationssäule von niedermolekularen Substanzen befreit und in ein Endvolumen von ca. 1 ml Konjugationspuffer umgepuffert. Die erhaltene Lösung wird aliquotiert und nach Ermittlung der Proteinkonzentration bei -20°C gelagert.

Quantifizierung in hTf eingeführter Hydrazinfunktionen

50 µl SANH-modifiziertes biotinyliertes hTf in Konjugationspuffer und 200 µl reiner Konjugationspuffer als Blindwert werden zu gleichen Teilen mit 4-NBA-Farbreagenz versetzt und eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erfolgtem Nullabgleich wird die Absorption der Probe bei 390 nm im Zweistrahlphotometer gegen den Blindwert vermessen. Die molare Hydrazinkonzentration der Lösung wird durch Division der erhaltenen Absorption mit $48'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (man beachte den Korrekturfaktor 2, der aufgrund der Verdünnung mit 4-NBA-Farbreagenz eingeführt werden muss) berechnet.

Kopplung von Hydrazin-modifiziertem hTf mit CHO-ODN

Ein etwa 40 nmol Hydrazinfunktionen enthaltender Ansatz biotinyliertes, SANH-modifiziertes hTf in Konjugationspuffer wird mit dem gewünschten Überschuss 1 mM CHO-ODN versetzt und für sechs Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird die Lösung mit einer Vivaspin 2 30.000 MWCO Ultrafiltrationssäule auf ein Volumen von etwa 600 µl eingeeengt und durch mehrmaliges Waschen in PBS umgepuffert. Die Reinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie in der FPLC-Anlage. Es werden 500-µl-Fractionen gesammelt und die relevanten Fractionen nach Vereinigung mit einer Vivaspin 2 30.000 MWCO Ultrafiltrationssäule auf ein Volumen von etwa 200 µl eingeeengt. Das Produkt wird aliquotiert und bei -20°C eingelagert.

Herstellung von dsDNA Antigen per PCR

70 µl mit Taq Polymerase gelieferter Polymerase-Puffer mit MgCl₂, 14 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 112 µl 25 µM ren231fw, 112 µl 25 µM ren231rev und 14 µl ca. 1 ng/µl Matrizen-DNA (dazu wurde im ersten Ansatz extrahierte humane genomische DNA, später das PCR-Produkt selbst verwendet) werden mit 364 µl Aqua pur. vermengt. Der Ansatz wird auf 13 PCR caps zu je 49 µl verteilt und mit je 1 µl (5 U) Taq DNA-Polymerase ergänzt. Nach Denaturierung der Matrizen bei 94°C für 2 Minuten wird die Amplifizierung in 40 Zyklen durchgeführt, welche aus je drei Schritten bestehen: Denaturierung der dsDNA bei 94°C für 30 s; Hybridisierung (Annealing) der Primer an die Matrix bei 61,5°C für 30 s; Elongation des Stranges bei 72°C für 20 s. Nach Vervollständigung der Syntheseprodukte bei 72°C für 7 Minuten werden alle Ansätze wieder vereinigt und über Größenausschlusschromatographie in der FPLC-Anlage von niedermolekularen Substanzen, unverbrauchten Primern und Taq DNA-Polymerase befreit. Es werden 500-µl-Fractionen gesammelt und die relevanten Fractionen nach Vereinigung mit einer Vivaspin 2 10.000 MWCO Ultrafiltrationssäule auf ein Volumen von etwas über 100 µl eingeeengt.

BssSI Verdau von PCR-amplifiziertem dsDNA-Antigen

Das gereinigte PCR-Produkt wird mit Aqua pur. auf ein Volumen von 121 µl ergänzt und mit 14 µl 10x NEBuffer 3, sowie 5 µl (20 Units) *BssSI* vermengt. Der Ansatz wird bei 37°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lösung zur Inaktivierung der REN 20 Minuten bei 80°C inkubiert. Danach wird der verdaute dsDNA Strang über SEC in einer FPLC-Anlage von niedermolekularen Substanzen, den abverdauten Strangenden und der REN befreit. Hierzu wird die Lösung um 410 µl FPLC Laufpuffer ergänzt und in der FPLC aufgetrennt. Es werden 500-µl-Fractionen gesammelt und die relevanten Fractionen nach Vereinigung mit einer Vivaspin 2 10.000 MWCO Ultrafiltrationssäule auf ein Volumen von etwas über 100 µl eingeeengt.

Testligation mit hairpin-ODN

Eine ca. 1 µg *Bss*SI-verdautes PCR Produkt enthaltene Lösung wird mit Aqua pur. auf 84 µl aufgefüllt und mit 1 µl 100 µM hairpin-ODN, 10 µl T4 DNA-Ligase 10 x Puffer sowie 5 µl T4 DNA-Ligase ergänzt. Die Mischung wird bei 16°C für 2 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert.

Ligation von *Bss*SI verdauter PCR-DNA an hTf-ODN

Für die Ligation wird *Bss*SI verdautes gereinigtes PCR-Produkt, hTf-ODN, as-ODN, 1/10 Volumen mit der Ligase gelieferter 10x Reaktionspuffer und 1000 U T4 DNA-Ligase vermengt und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 16°C inkubiert. Idealerweise beträgt das Gesamtvolumen 100 µl. Am nächsten Tag wird das Produkt über Größenausschlusschromatographie in der FPLC-Anlage von niedermolekularen Substanzen, nicht ligiertem hTf-ODN bzw. as-ODN und der Ligase befreit. Hierzu wird die Lösung zuerst um 450 µl FPLC-Laufpuffer ergänzt. Es werden 500-µl-Fractionen gesammelt und die relevanten Fractionen nach Vereinigung mit einer Vivaspin 2 30.000 MWCO Ultrafiltrationssäule auf ein Volumen von etwa 100 µl eingengt. Das Produkt wird aliquotiert und bei -20°C eingelagert.

FPLC-Reinigung und Analyse von hTf und hTf-ODN

Die Lösung wird mit einer 500-µl-Probenschleife auf eine Superdex 200 HR 10/30 Gelfiltrationssäule injiziert. Die Chromatographie erfolgt mit PBS als Laufpuffer bei einem Fluss von 0,2 ml/min. Die Detektion erfolgt durch Messung der Extinktion bei 280 nm.

FPLC-Reinigung und Analyse von DNA sowie hTf-dsDNA

Die Lösung wird mit einem 500-µl-Probenschleife auf eine eine Superose 6 HR 10/30 Gelfiltrationssäule injiziert. Die Chromatographie erfolgt mit FPLC-Laufpuffer bei einem Fluss von 0,35 ml/min. Die Detektion erfolgt durch Messung der Extinktion bei 280 nm.

5.4.3 Biosensorik

Immobilisierung von hTf-dsDNA auf Biosensorchips

Ein Volumen von 60 µl hTf-dsDNA wird bei einem kontinuierlichen Fluss von 2 µl/min unter Benutzung von HBS-N als Laufpuffer über einen Sensorchip SA gespült. Anschließend wird, nach Erhöhen der Flussrate auf 5 µl/min, eine Mischung von 0,2 M EDC und 0,05 M NHS injiziert. Nicht abreagierte NHS-Ester werden durch Injektion von 35 µL 1 M Ethanolamin-HCl (pH 8.5) entfernt (alle Lösungen aus Amine Coupling Kit). Die Immobilisierung der Referenzoberfläche erfolgt entsprechend unter Verwendung von biotinyliertem hTf statt hTf-dsDNA.

Biosensormessungen Pilotversuche

Als Laufpuffer, sowie als Verdünnungspuffer für alle Proben wird HBS-EP250 verwendet. Die Flussrate beträgt 10 µl/min, das Injektionsvolumen 45 µl, die Beobachtungszeit nach Ende der Injektion 300 Sekunden. Alle Seren werden grundsätzlich mit 99 Teilen Puffer verdünnt, Antikörper und inhibitorische DNA zu den angegebenen Konzentrationen.

Biosensormessungen zur kinetischen Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Als Laufpuffer, sowie als Verdünnungspuffer für alle Proben wird HBS-BO verwendet. Die Flussrate beträgt 30 µl/min, das Injektionsvolumen 90 µl, die Beobachtungszeit nach Ende der Injektion 300 Sekunden. Die Verdünnung der Antikörper erfolgt seriell im Verhältnis 1+1.

Kompetitive Biosensormessungen mit monoklonalen Antikörpern

Als Laufpuffer, sowie als Verdünnungspuffer für alle Proben wird HBS-BO verwendet. Die Flussrate beträgt 30 µl/min, das Injektionsvolumen 90 µl, die Beobachtungszeit nach Ende der Injektion 0 Sekunden. Alle Antikörper wurden grundsätzlich in einer Konzentration von ein Vierhundertstel ihrer Stammlösung eingesetzt. Zugesezte Oligonukleotide wurden in HBS-BO seriell vorverdünnt.

Biosensormessungen zur Vermessung klinischer Proben

Als Laufpuffer, sowie als Verdünnungspuffer für alle Proben wird HBS-BO verwendet. Die Flussrate beträgt 30 µl/min, das Injektionsvolumen 90 µl, die Beobachtungszeit nach Ende der Injektion 300 Sekunden. Die Verdünnung der Seren erfolgt grundsätzlich mit 99 Teilen Laufpuffer.

Regeneration der Biosensoroberfläche

Zur Regeneration der Biosensoroberflächen wird nach erfolgter Messung für eine Minute mit einer Lösung von 50 mM NaOH und 1 M NaCl gespült. Hoher pH und hohe Ionenstärke dissoziieren DNA-anti-dsDNA-Immunkomplexe (254).

5.4.4 Auswertung von Daten

Sämtliche angegebenen Mittelwerte sind als arithmetische Mittel zu verstehen, bei einigen Messwerten sind zusätzlich die Standardabweichungen bzw. die Variationskoeffizienten angegeben. Alle Werte wurden mit MS Office Excel 2003 berechnet. Fitting von sigmoiden Inhibitionskurven an die logistische 4-Parameter-Funktion erfolgte mit SigmaPlot 2000 (v 6.00, SPSS, Chicago, IL, USA). Alle weiteren statistischen Darstellungen (ROC-Plots, Regression nach Passing-Bablok, Bias-Plot nach Bland-Altman) erfolgten mit Analyse-it 1.61 (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK). Das nichtlineare Fitting von Biosensorgrammen erfolgte mit BIAevaluation 3.0 (GE Healthcare, Freiburg).

6 Abkürzungen

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
anti-dsDNA	Autoantikörper mit Spezifität für doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
APS	Antiphospholipid-Syndrom
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus bovinem Serum
CLIF	<i>Crithidia luciliae</i> indirekte Immunfluoreszenz
CMD	Carboxymethyldextran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPGN	diffuse proliferative Glomerulonephritis (Lupusnephritis)
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDC	N-ethyl-N'-[(dimethylamino)propyl]-carbodiimide hydrochloride
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> , Gelretardation bzw. Gelshift
FC	<i>flow cell</i> , Flusszelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
hTf	humanes Transferrin
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IgA	Immunglobulin vom Isotyp A
IgG	Immunglobulin vom Isotyp G

IgM	Immunglobulin vom Isotyp M
IU	<i>International Unit</i> , internationale Einheit
kDa	Kilodalton
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
ODN	Oligodeoxynukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
REN	Restriktionsendonuklease
RIA	Radioimmunoassay
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SANH	Succinimidyl 4-hydrazinonicotinate acetone hydrazone
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFB	succinimidyl 4-formylbenzoate
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> , Oberflächenplasmonresonanz
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation

7 Anhang

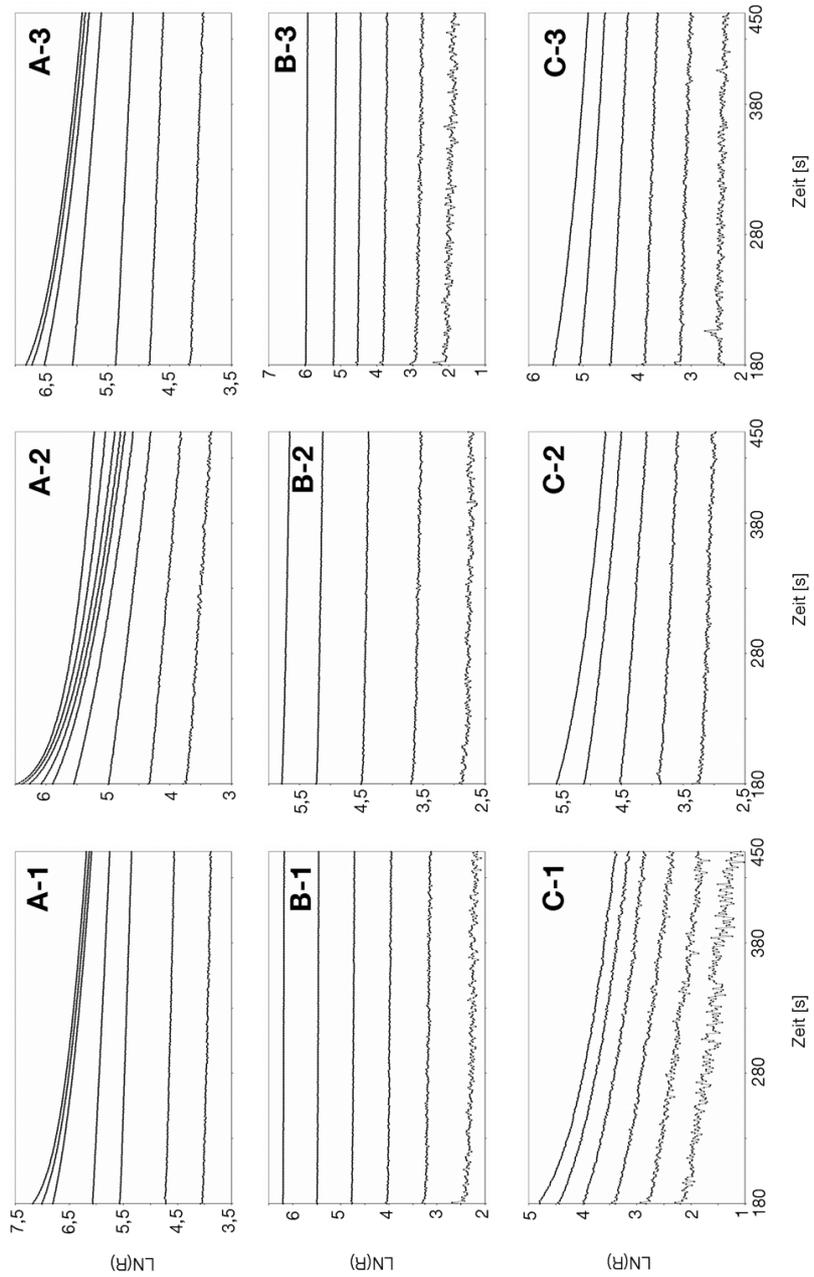


Abbildung 7.1: Linearisierung der Postinjektionsphase der Kurven aus Abb. 3.26 durch Logarithmieren der relativen Anbindung R

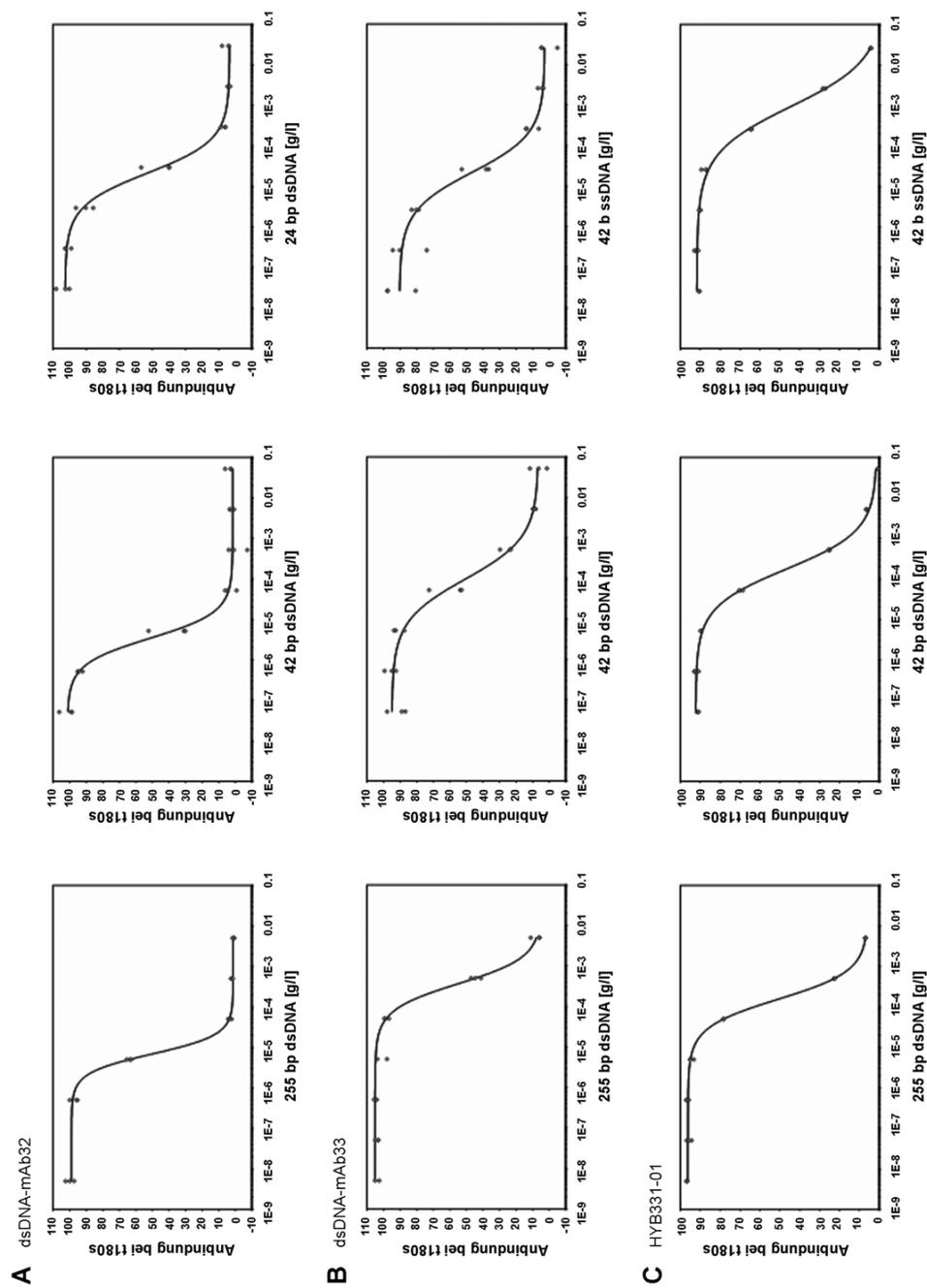


Abbildung 7.2: Inhibitionskurven von (A) dsDNA-mAb32, (B) dsDNA-mAb33 und (C) HYB331-01 für die drei stärksten Inhibitoren. Die Anbindung ist jeweils gegen die Inhibitor-Konzentrationen aufgetragen. Alle Messwerte der Dreifachbestimmungen sind gezeigt.

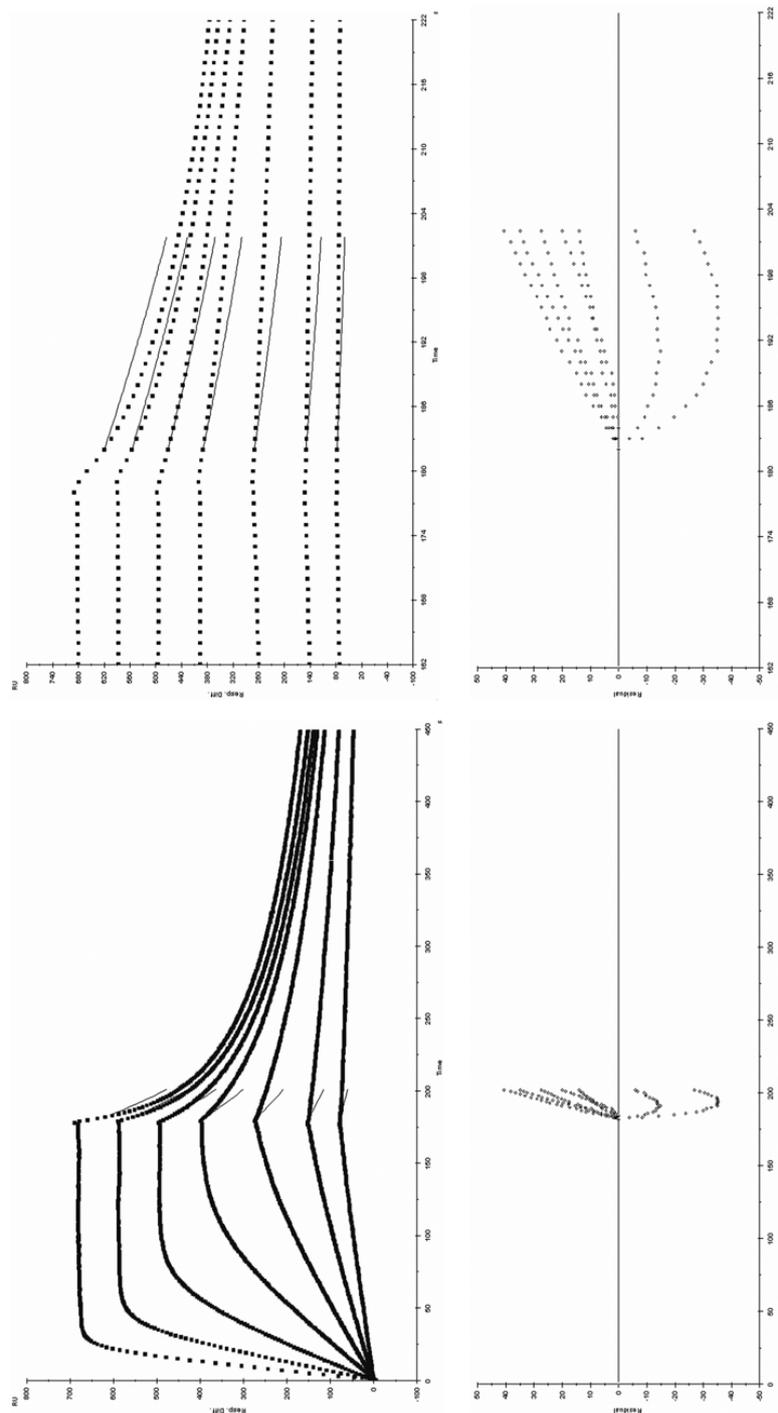


Abbildung 7.3: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

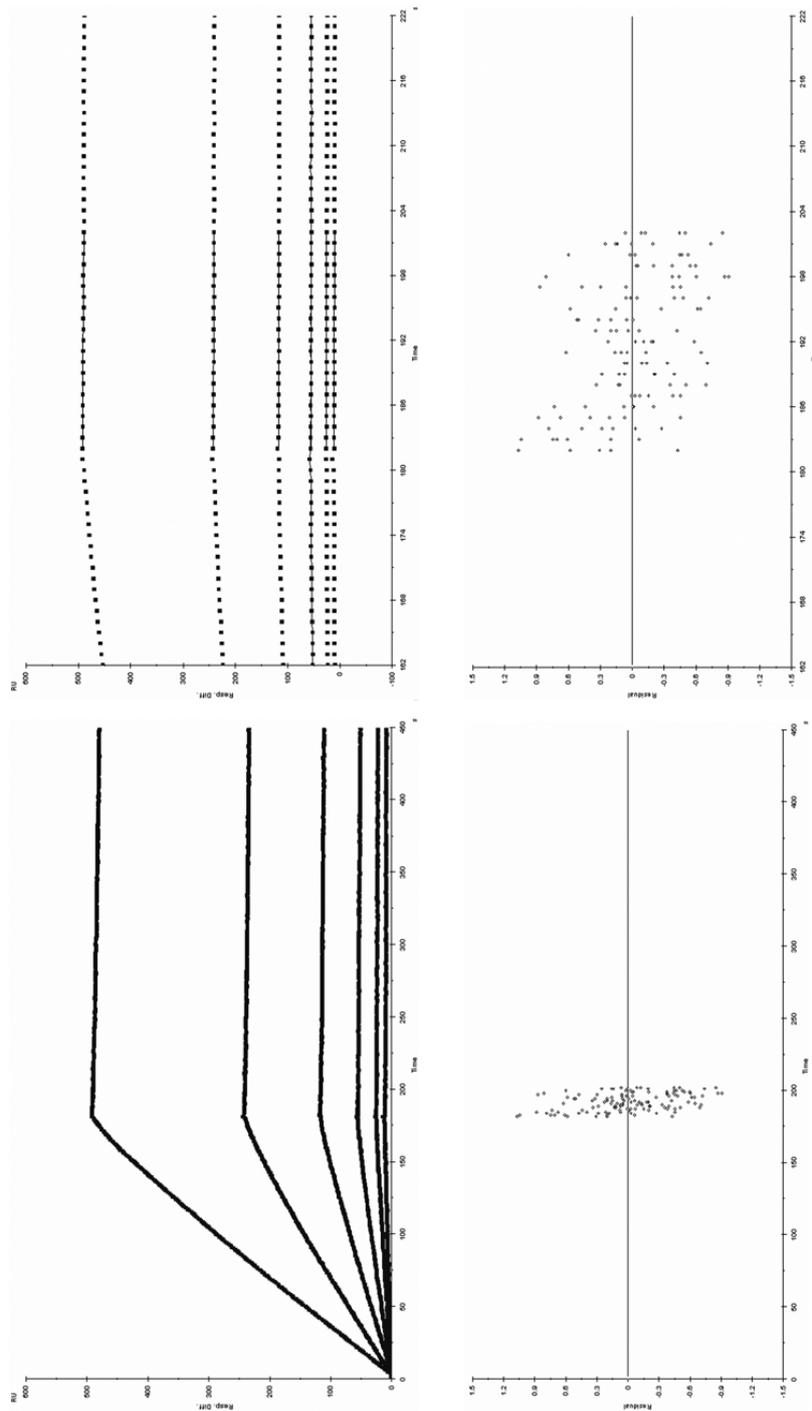


Abbildung 7.4: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

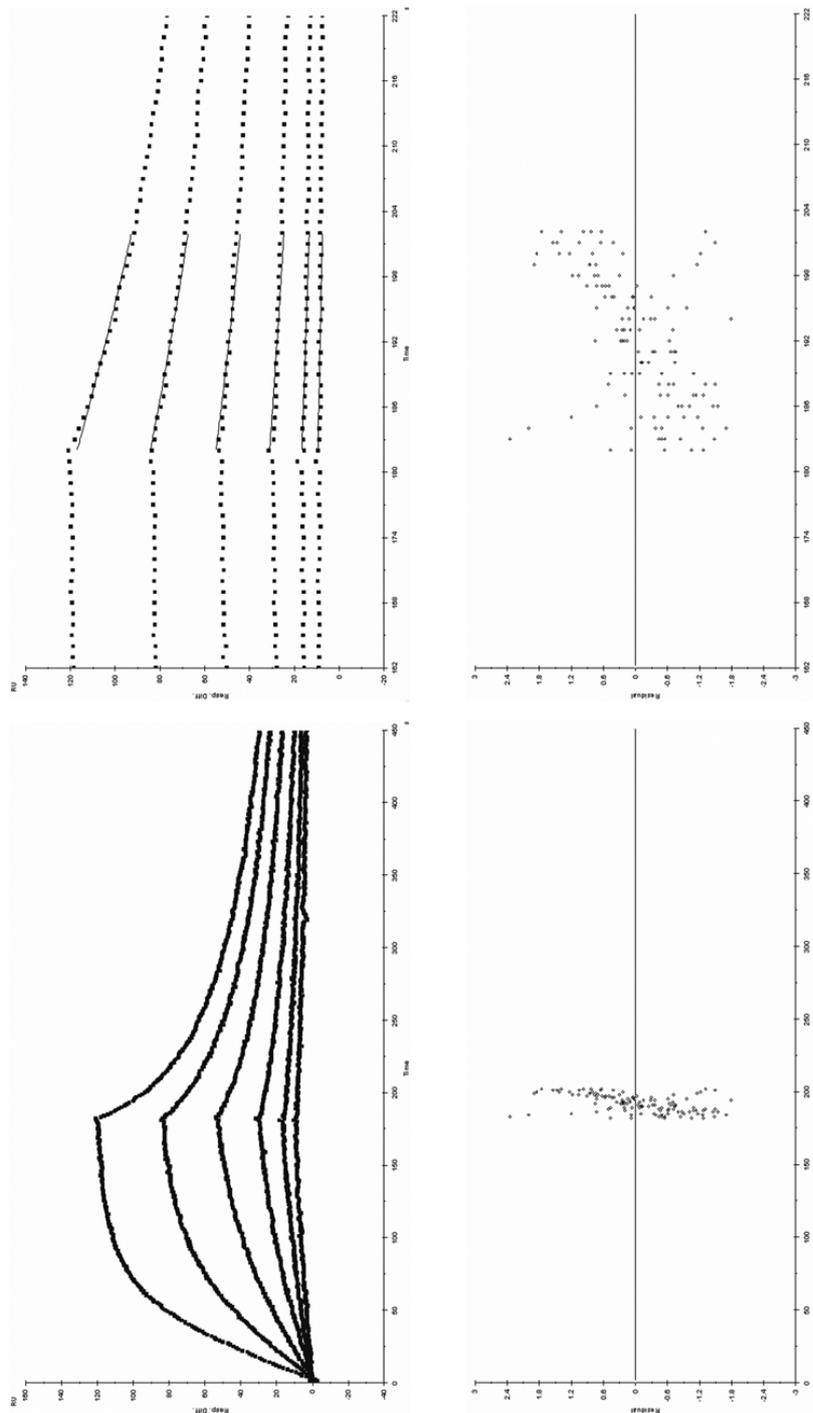


Abbildung 7.5: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

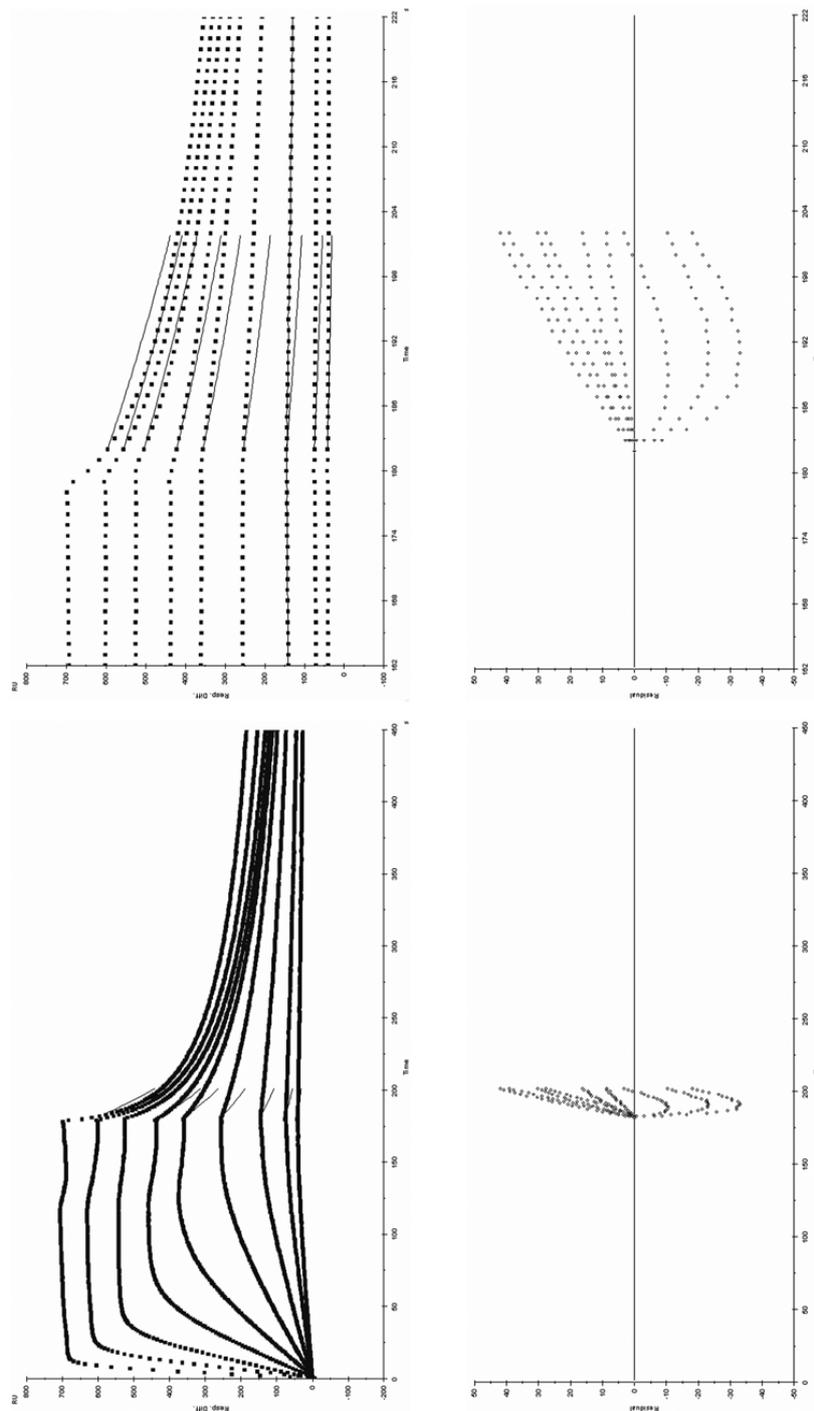


Abbildung 7.6: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

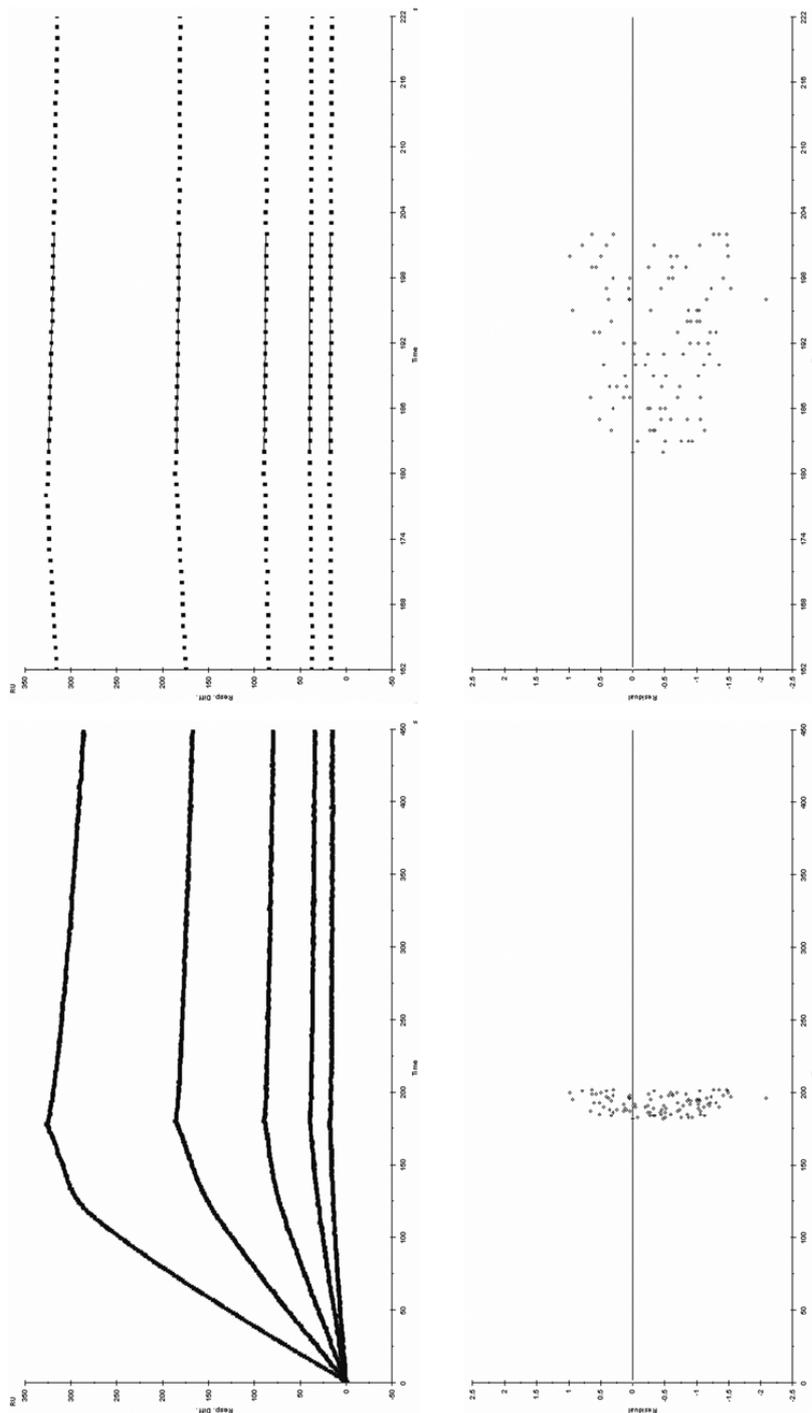


Abbildung 7.7: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

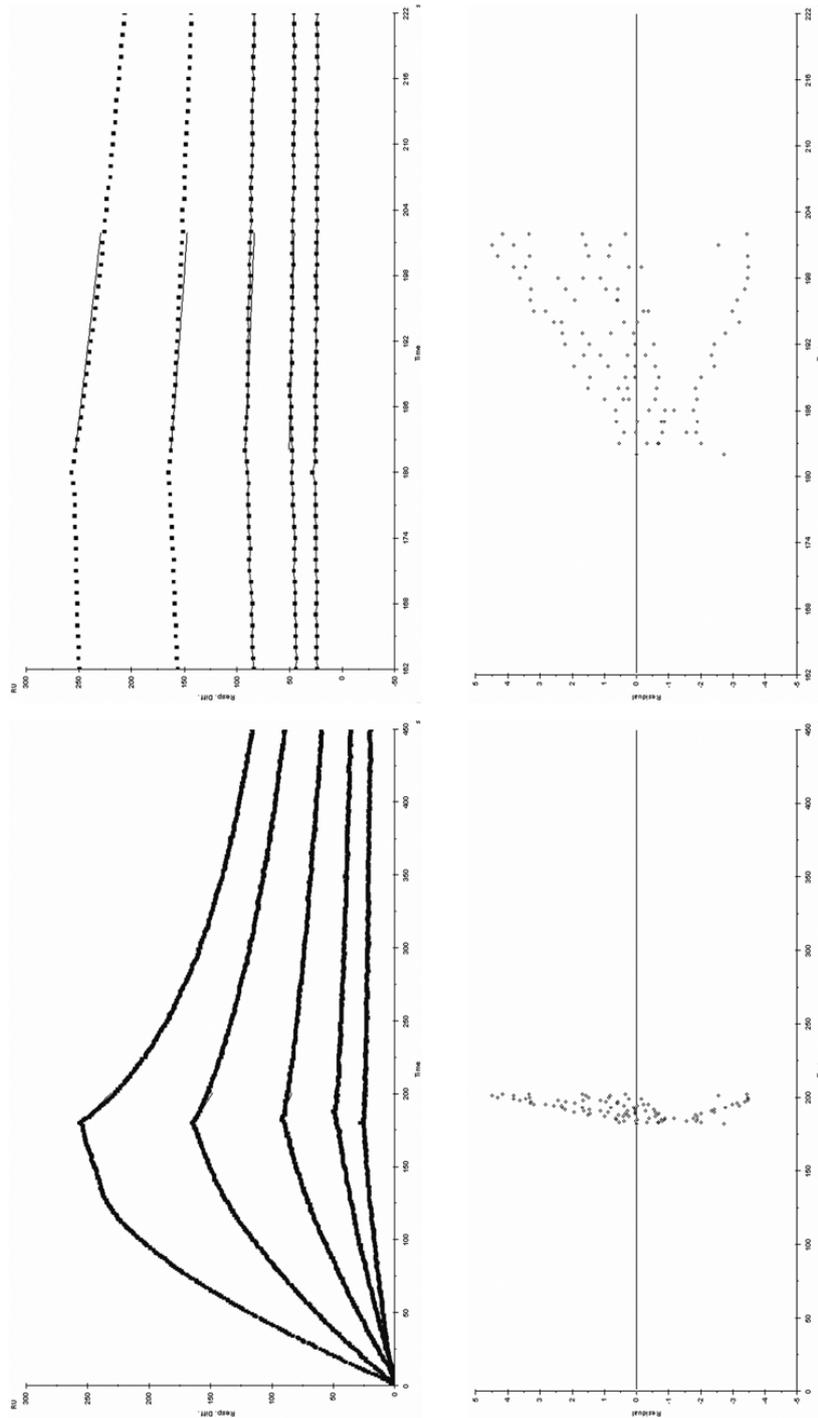


Abbildung 7.8: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

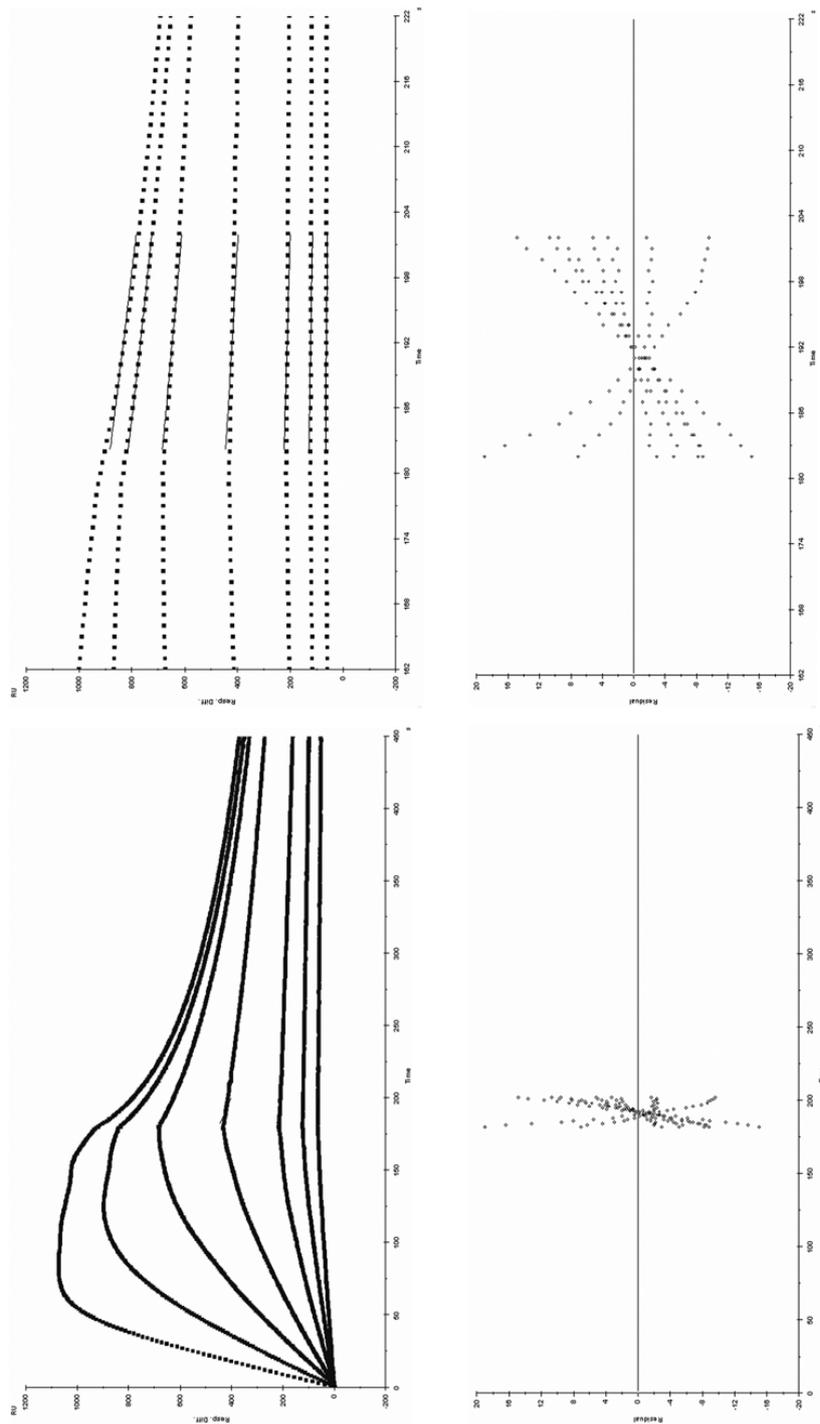


Abbildung 7.9: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

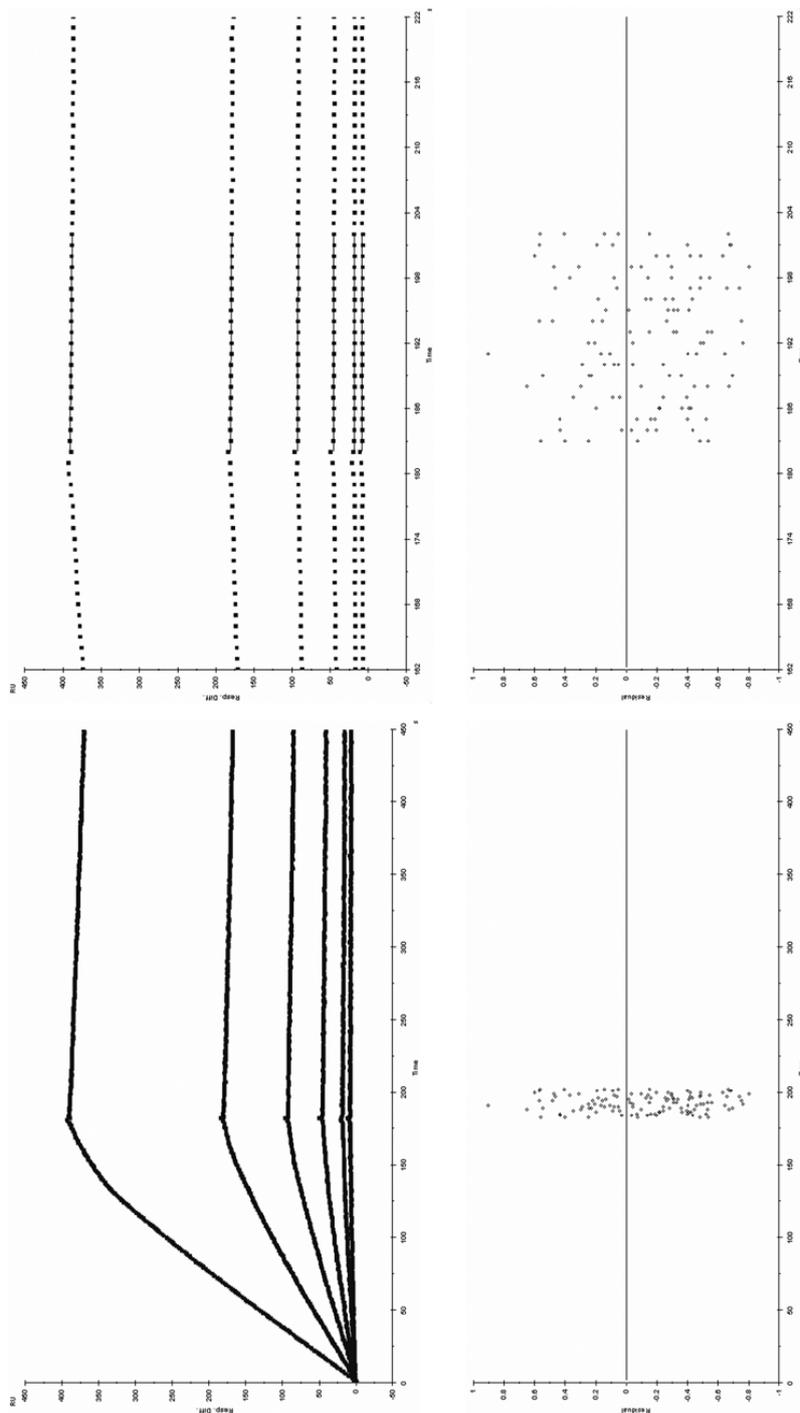


Abbildung 7.10: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

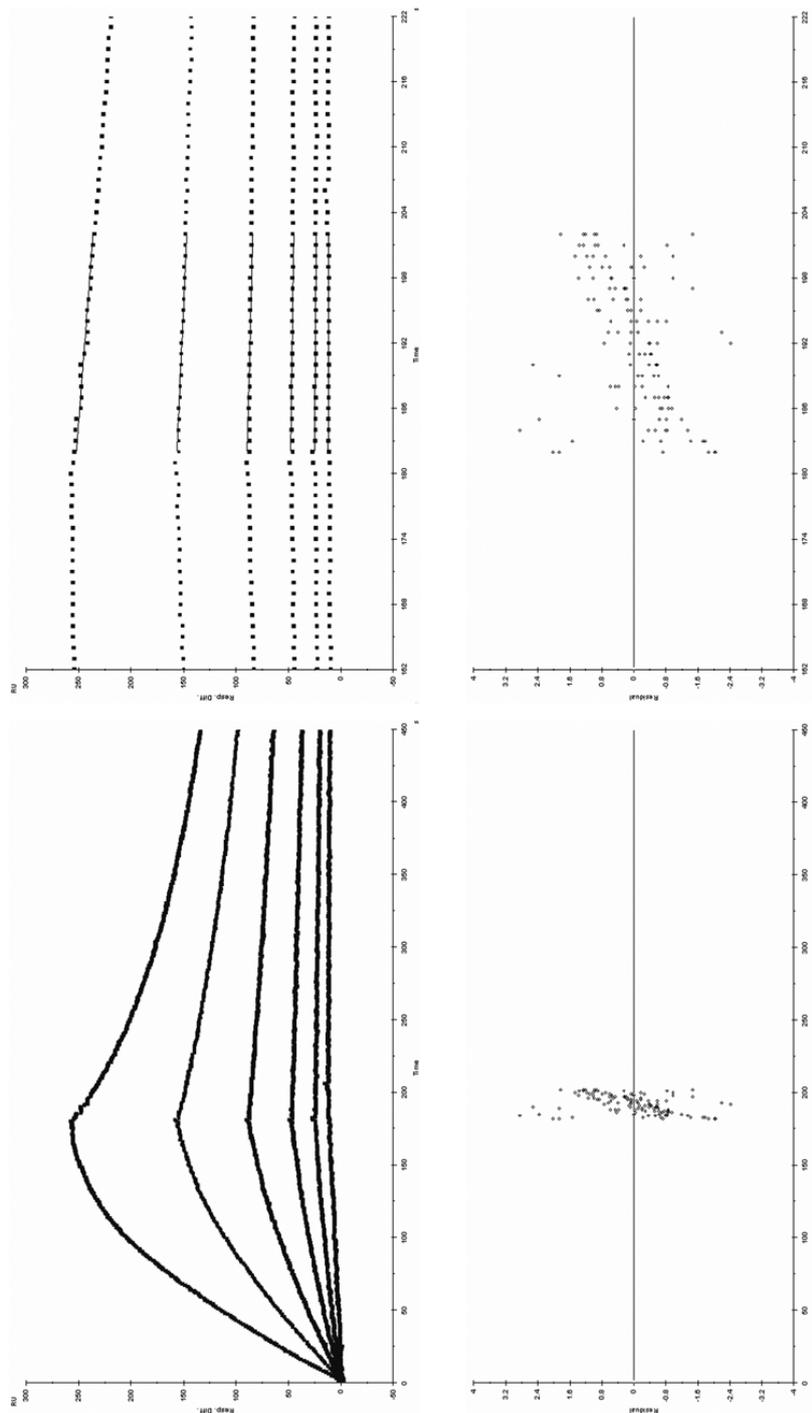


Abbildung 7.11: Nichtlineares Fitting der Postinjektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

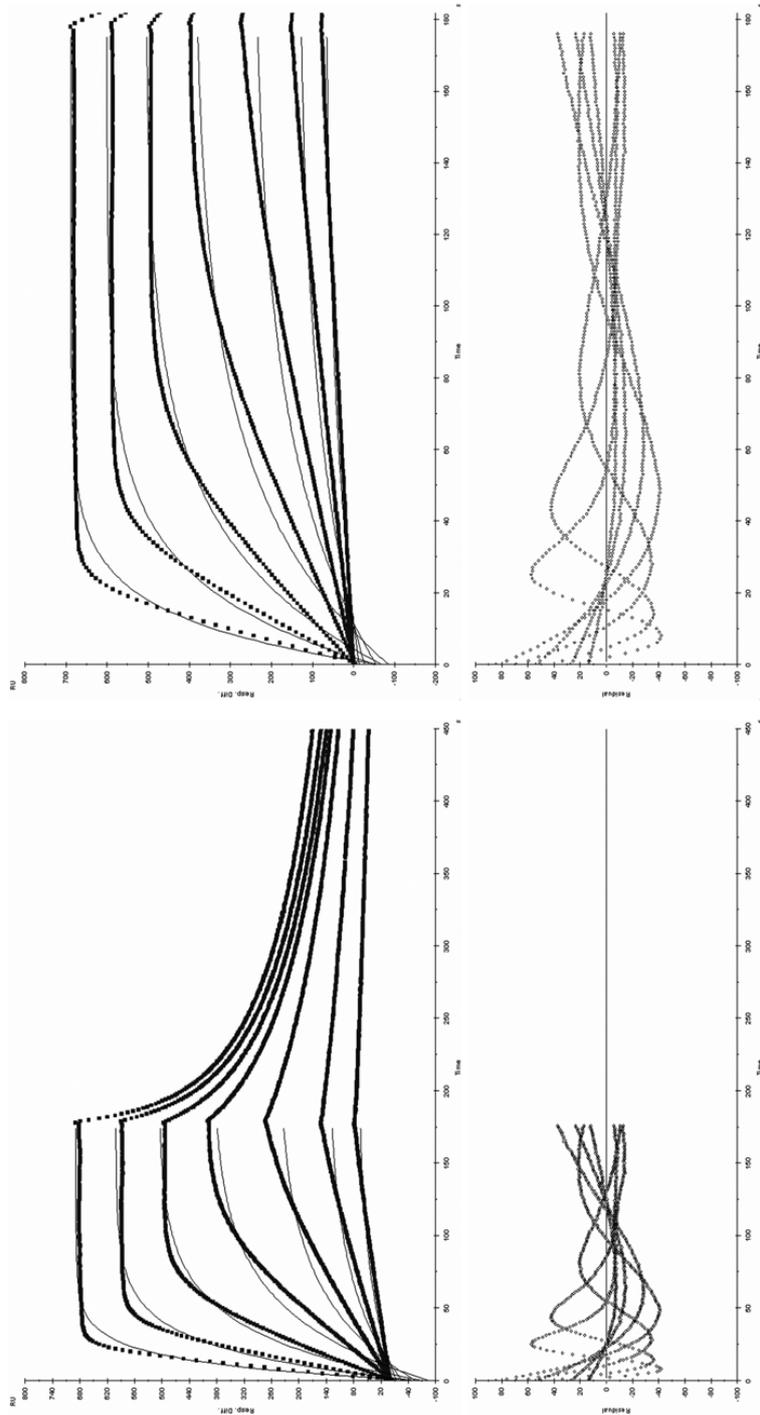


Abbildung 7.12: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

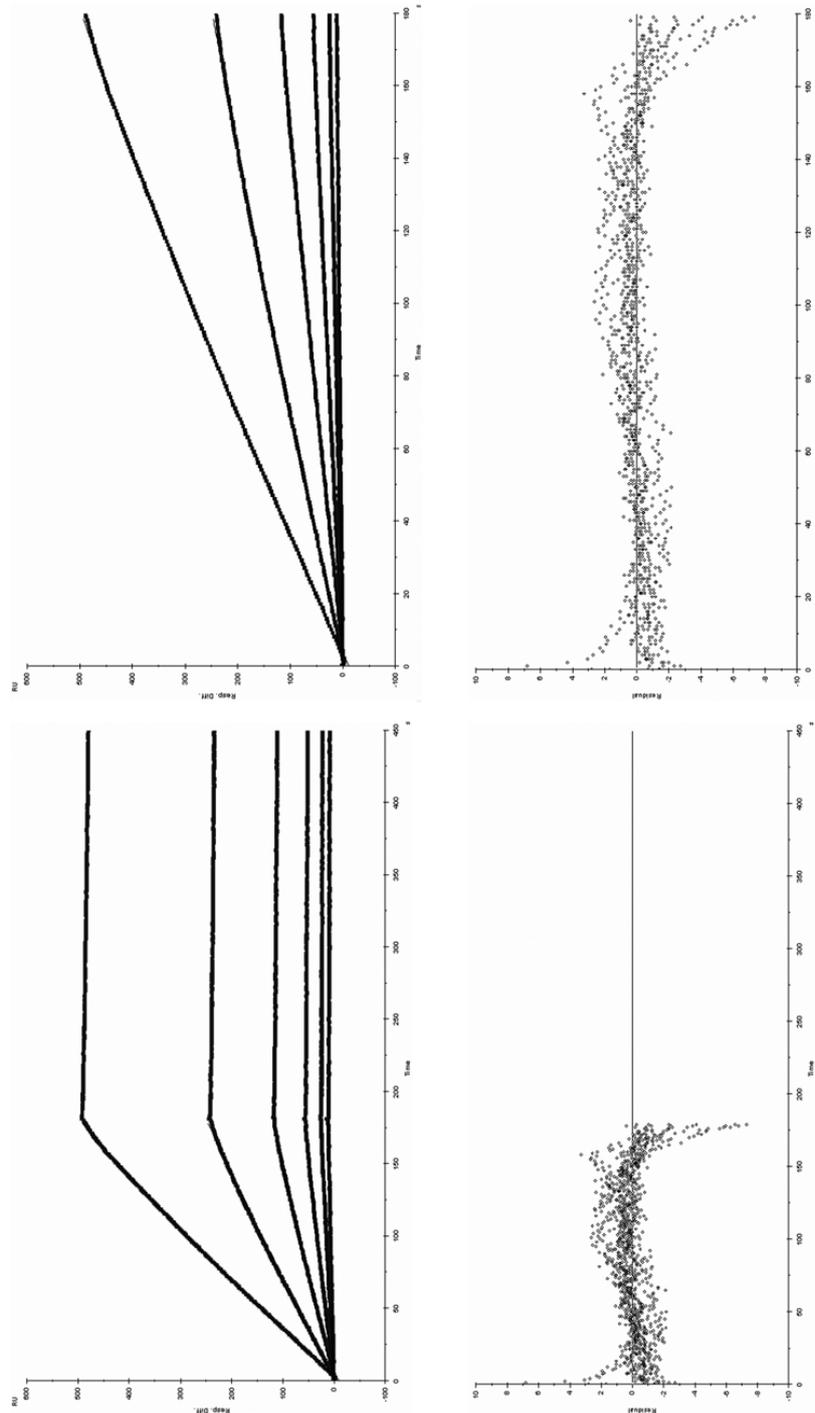


Abbildung 7.13: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

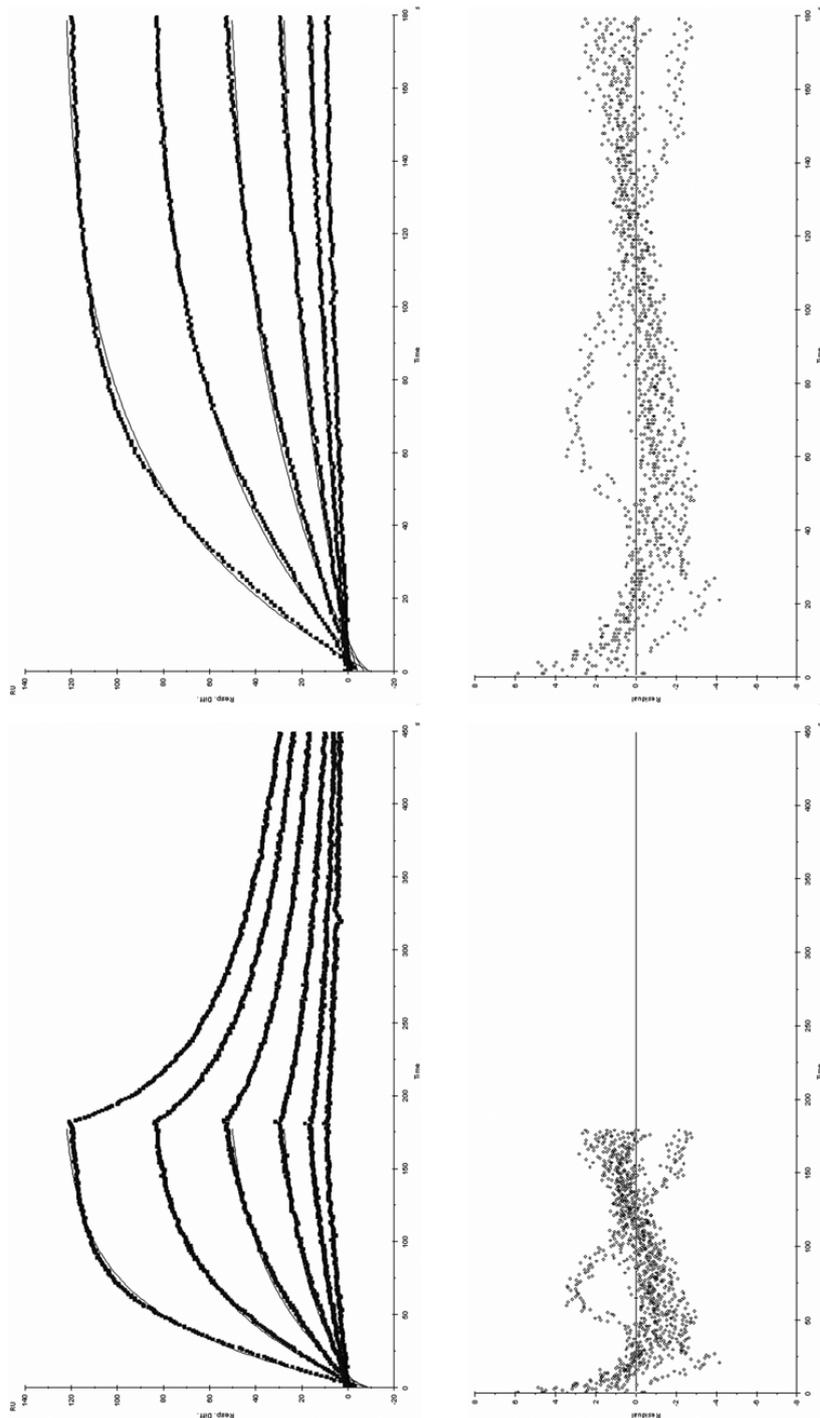


Abbildung 7.14: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 1. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

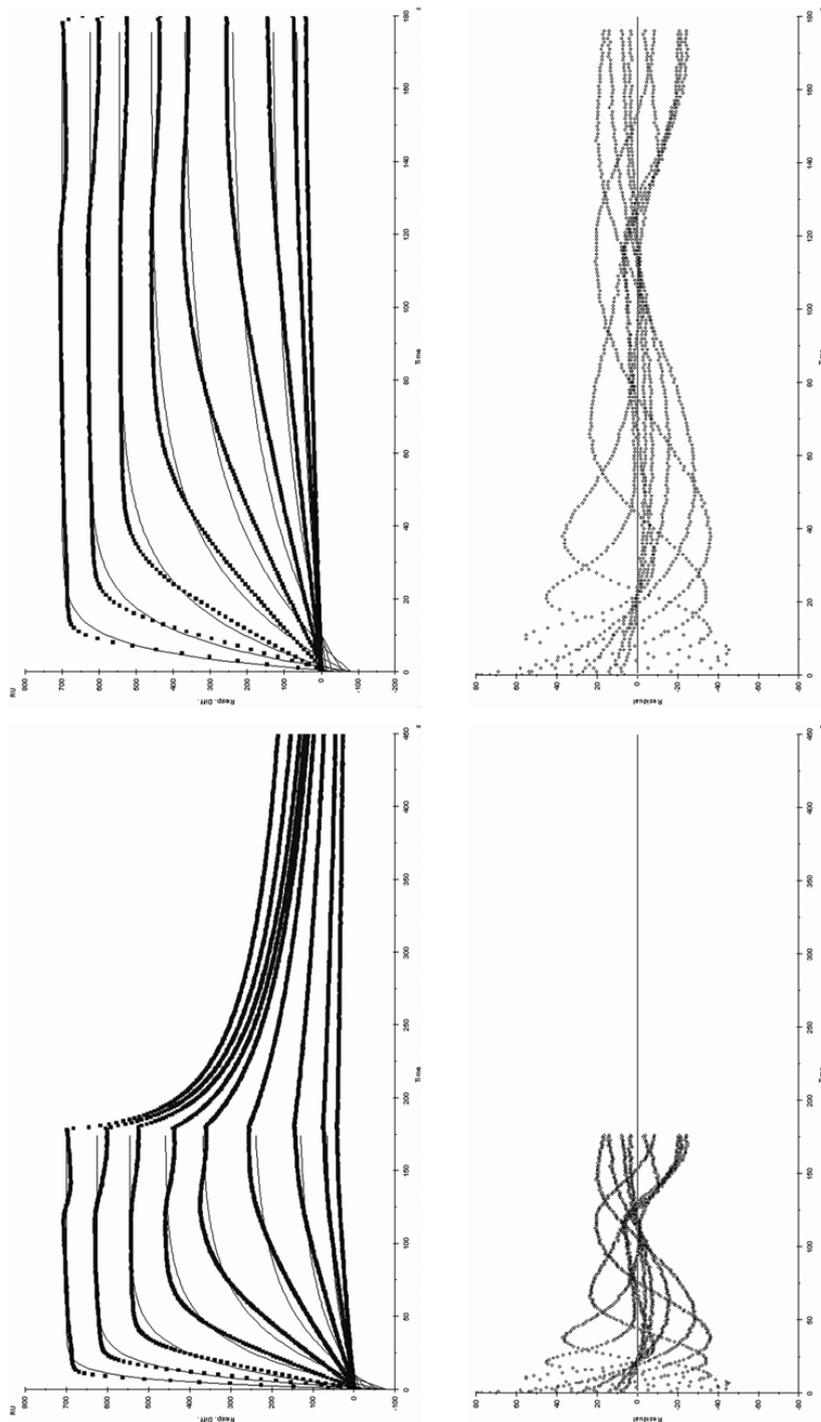


Abbildung 7.15: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

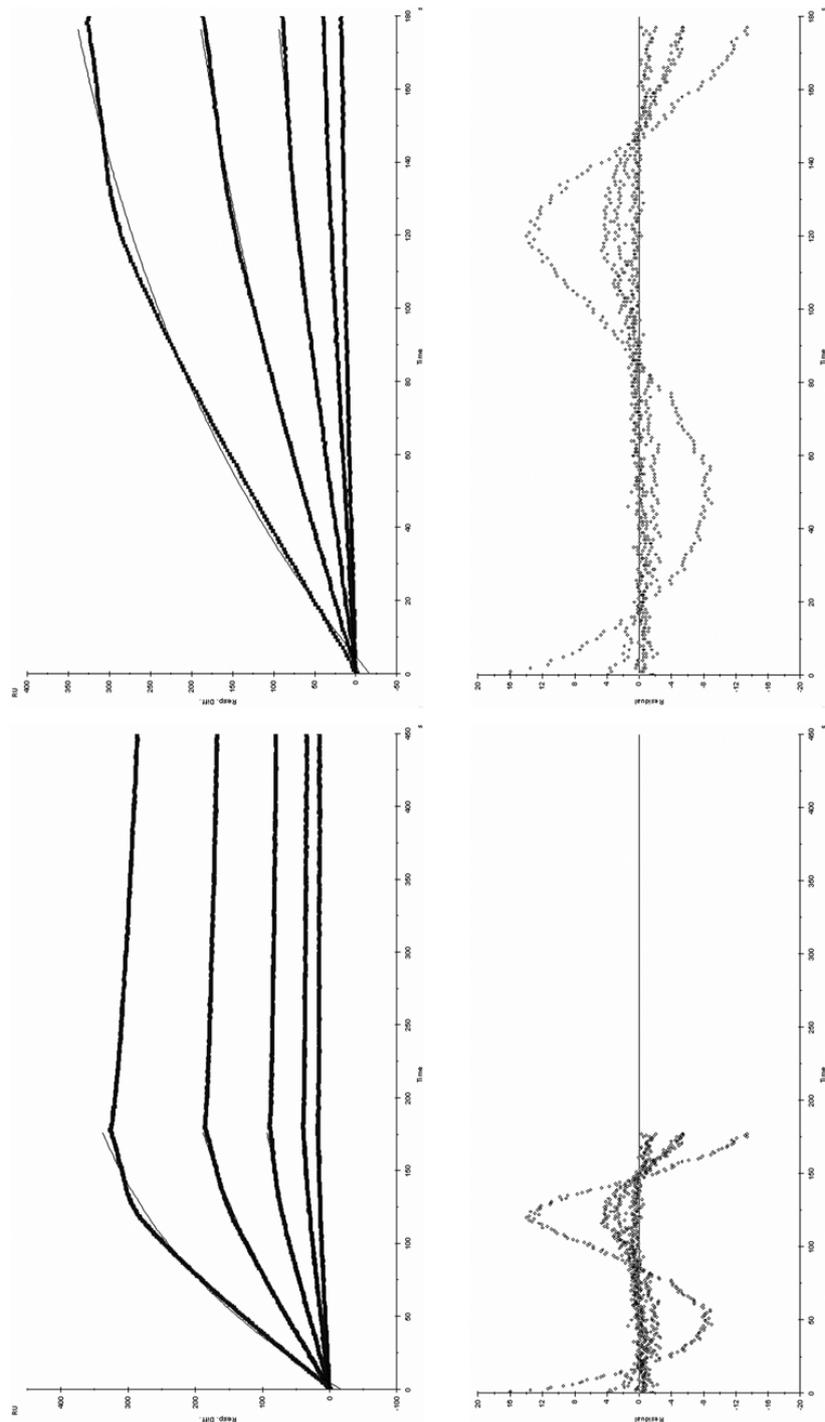


Abbildung 7.16: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

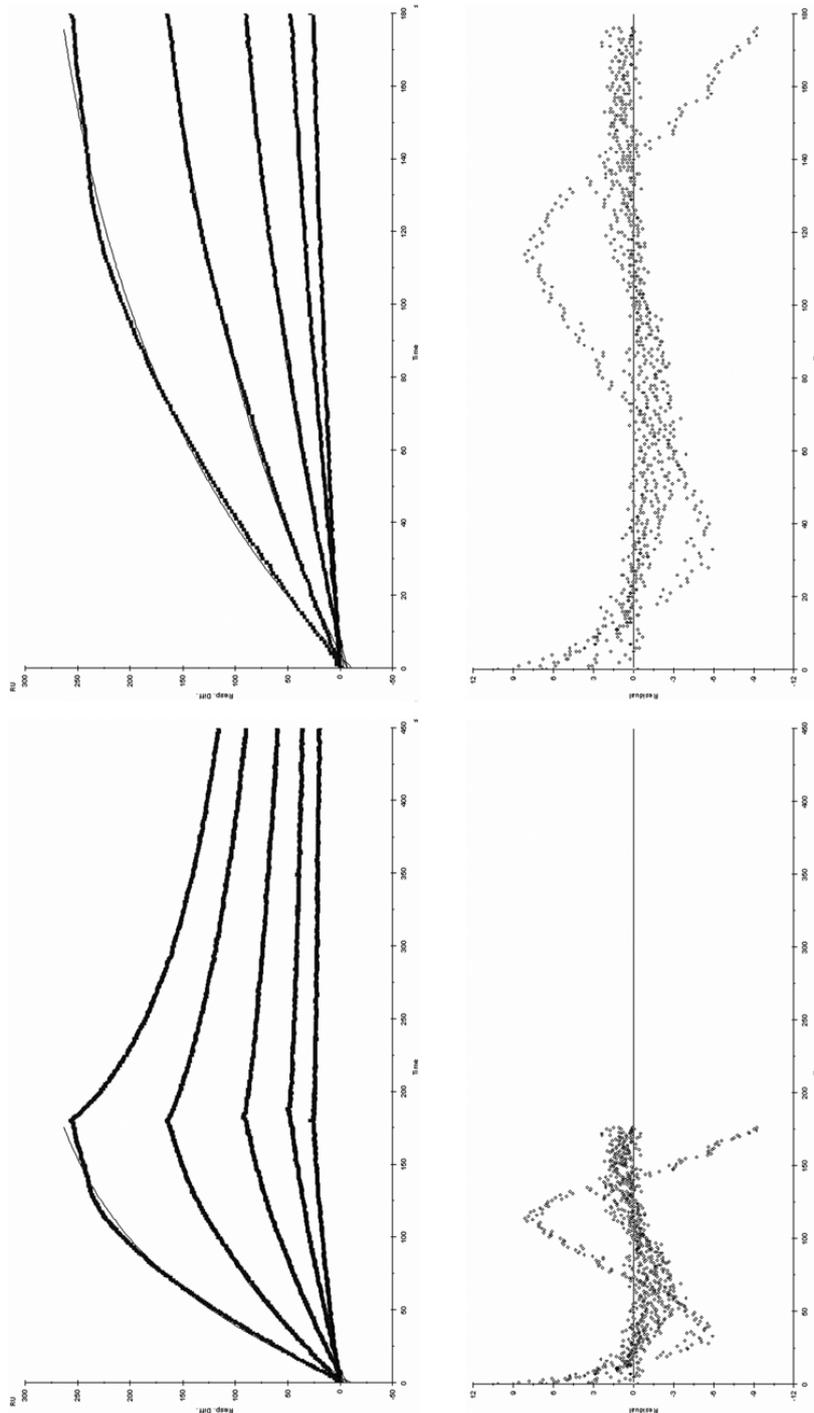


Abbildung 7.17: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 2. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

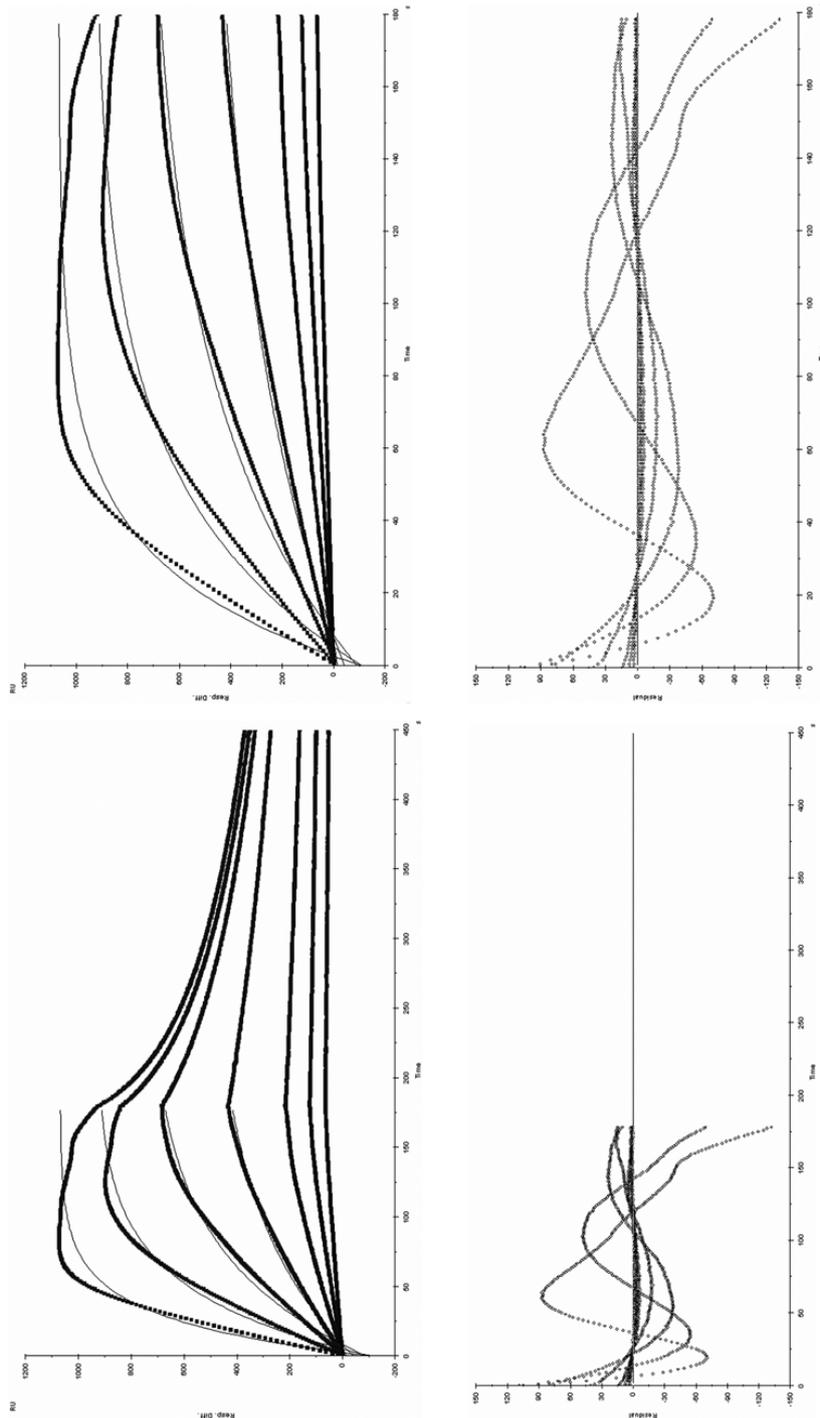


Abbildung 7.18: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von HYB331-01 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

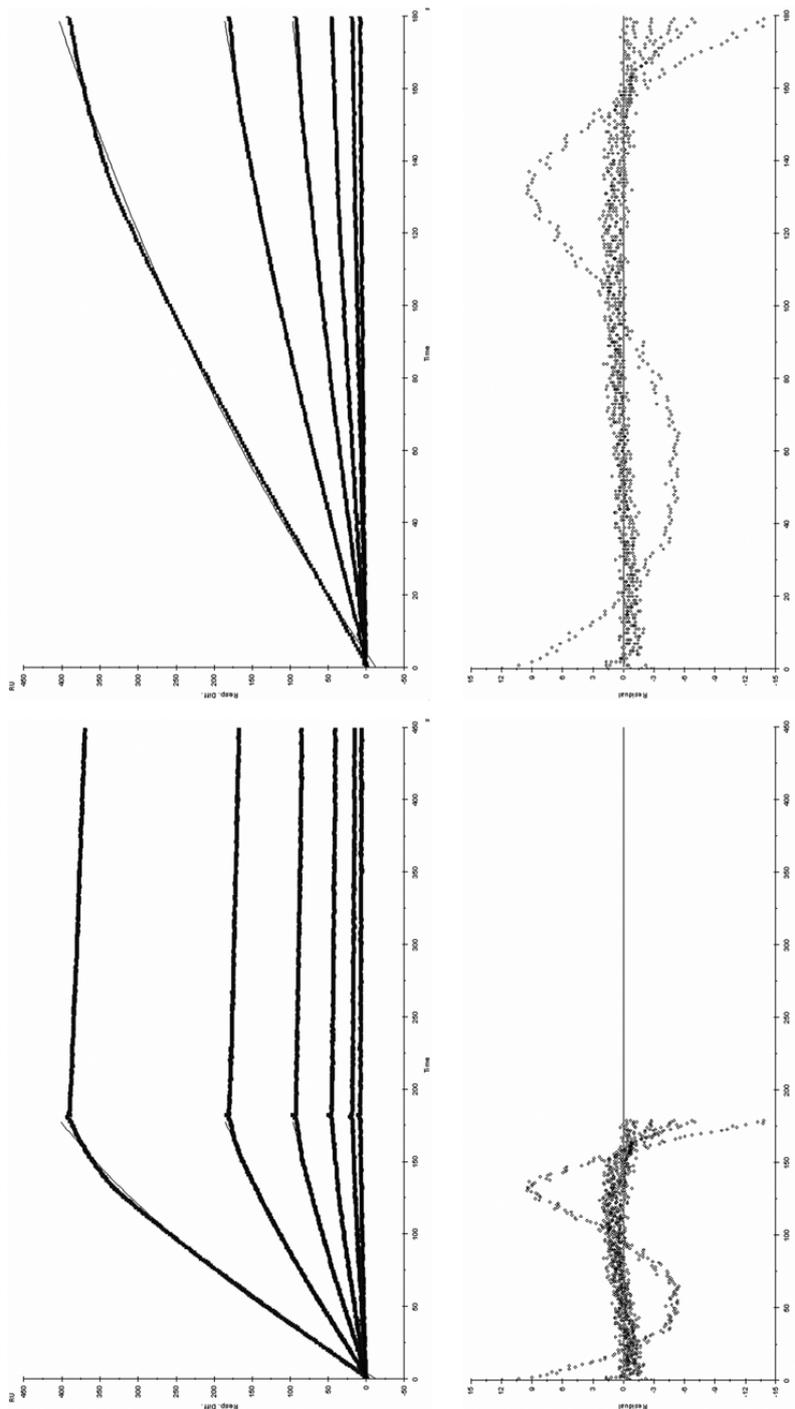


Abbildung 7.19: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb32 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

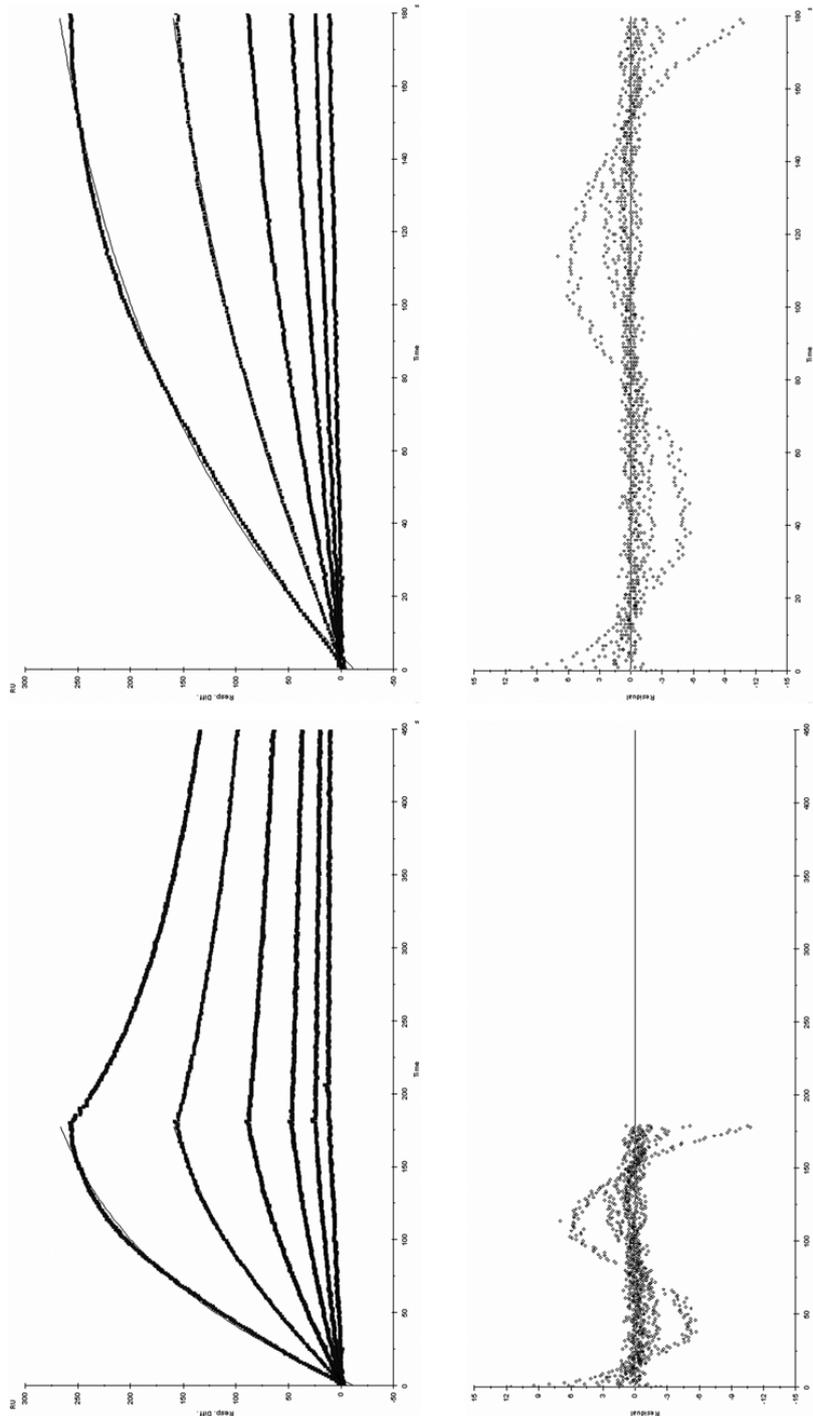


Abbildung 7.20: Nichtlineares Fitting der Injektionsphase der Vermessung von dsDNA-mAb33 auf Chip 3. Gezeigt sind (obere Grafiken) Rohdaten (Punkte) und gefittete Funktionen (Linien) bzw. die absoluten Fehler des Fittings (untere Grafiken) jeweils für den gesamten Zeitraum der Messung (links) und den relevanten Ausschnitt (rechts).

Literaturverzeichnis

- [1] RAHMAN A & ISENBERG DA: *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med 2008; **358**:929–939.
- [2] MITTELDEUTSCHER RUNDFUNK: *Ein Fall für Escher*. 02. Februar 2006.
- [3] TAN EM, COHEN AS, FRIES JF, MASI AT, MCSHANE DJ, ROTHFIELD NF, SCHALLER JG, TALAL N & WINCHESTER RJ: *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1982;**25**:1271–1277.
- [4] HOCHBERG MC: *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1997; **40**:1725.
- [5] EGNER W: *The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE*. J Clin Pathol 2000;**53**:424–432.
- [6] FELTKAMP TE, KIRKWOOD TB, MAINI RN & AARDEN LA: *The first international standard for antibodies to double stranded DNA*. Ann Rheum Dis 1988; **47**:740–746.
- [7] REKVIG OP & NOSSENT JC: *Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms?* Arthritis Rheum 2003;**48**:300–312.
- [8] POTTER B: *The history of the disease called lupus*. J Hist Med Allied Sci 1993; **48**:80–90.
- [9] CAZENAVE PLA: *Lupus erythemateux (erytheme centrifuge)*. Ann Mal Peau Syph 1851;**3**:297–299.
- [10] KAPOSÍ M: *Neue Beiträge zur Kenntnis des Lupus erythematosus*. Arch Derm Syphilol 1872;**4**:36–78.
- [11] KOTZIN BL: *Systemic lupus erythematosus*. Cell 1996;**85**:303–306.
- [12] DIETEL M, SUTTORP N & ZEITZ M (HRSG): *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag, 2002.

- [13] D'CRUZ DP, KHAMASHTA MA & HUGHES GR: *Systemic lupus erythematosus*. Lancet 2007;**369**:587–596.
- [14] MANZI S: *Epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Am J Manag Care 2001;**7**:474–479.
- [15] MOK CC & LAU CS: *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. J Clin Pathol 2003;**56**:481–490.
- [16] DAVIDSON A & DIAMOND B: *Autoimmune diseases*. N Engl J Med 2001;**345**:340–350.
- [17] VYSE TJ & KOTZIN BL: *Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus*. Annu Rev Immunol 1998;**16**:261–292.
- [18] SARZI-PUTTINI P, ATZENI F, IACCARINO L & DORIA A: *Environment and systemic lupus erythematosus: an overview*. Autoimmunity 2005;**38**:465–472.
- [19] MILLS JA: *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med 1994;**330**:1871–1879.
- [20] TAN EM & KUNKEL HG: *Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus*. J Immunol 1966;**96**:464–471.
- [21] CERVERA R, KHAMASHTA MA, FONT J, SEBASTIANI GD, GIL A, LAVILLA P, DOMENECH I, AYDINTUG AO, JEDRYKA-GORAL A, DE RAMON E & ET AL: *Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus*. Medicine (Baltimore) 1993;**72**:113–124.
- [22] COHEN A, REYNOLDS W, FRANKLIN E, KULKA J, ROPES M, SHULMAN L & WALLACE S: *Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Bull Rheum Dis 1971;**21**:643–648.
- [23] ISENBERG D: *Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus?* Lupus 2004;**13**:881–885.
- [24] GAUBITZ M & SCHOTTE H: *Early diagnosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. Z Rheumatol 2005;**64**:547–552.
- [25] CEPPELLINI R, POLLI E & F C: *A DNA reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus*. Proc Soc Exp Biol Med 1957;**96**:572.
- [26] MIESCHER P & STRASSLE R: *New serological methods for detection of the L.E. factor*. Vox Sang (Basel) 1957;**2**:283.

- [27] ROBBINS WC, HOLMAN HR, DEICHER H & KUNKEL HG: *Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus*. Proc Soc Exp Biol Med 1957; **96**:575.
- [28] SELIGMANN M: *Mise en evidence dans le serum de malades atteints de lupus erythemateux dissemine d'une substance determinant une reaction de precipitation avec l'acide desoxyribonucleique*. C R Acad Sci (Paris) 1957;**245**:243.
- [29] HARGRAVES M, RICHMAND H & MORTON R: *Presentation of two bone marrow elements; the "tart" cell and "LE" cell*. Proc Staff Meet Mayo Clin 1948;**23**:25–28.
- [30] HILDEBRANDT H, DORNBLÜTH O & PSCHYREMBEL W: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Gruyter, 2002.
- [31] HARGRAVES MM: *Production in vitro of the L.E. cell phenomenon; use of normal bone marrow elements and blood plasma from patients with acute disseminated lupus erythematosus*. Mayo Clin Proc 1949;**24**:234–237.
- [32] HASERICK JR, LEWIS LA & BORTZ DW: *Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus; determination of gamma globulin as specific plasma fraction*. Am J Med Sci 1950;**219**:660–663.
- [33] BURLINGAME RW & CERVERA R: *Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies*. Autoimmun Rev 2002;**1**:321–328.
- [34] RUIZ-ARGUELLES A & ALARCON-SEGOVIA D: *Novel facts about an old marker: the LE cell*. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2001;**235**:31–37.
- [35] TAN EM, SCHUR PH, CARR RI & KUNKEL HG: *Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest 1966;**45**:1732–1740.
- [36] JR JANEWAY CA, TRAVERS P & WALPORT M: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
- [37] WATSON JD & CRICK FH: *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature 1953;**171**:737–738.
- [38] BERG JM, TYMOCZKO JL & STRYER L: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 2002.
- [39] DICKERSON RE, DREW HR, CONNER BN, WING RM, FRATINI AV & KOPKA ML: *The anatomy of A-, B-, and Z-DNA*. Science 1982;**216**:475–485.
- [40] WANG AH, QUIGLEY GJ, KOLPAK FJ, CRAWFORD JL, VAN BOOM JH, VAN DER MAREL G & RICH A: *Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution*. Nature 1979;**282**:680–686.

- [41] ARANA R & SELIGMANN M: *Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest 1967;**46**:1867–1882.
- [42] STOLLAR BD: *Molecular analysis of anti-DNA antibodies*. FASEB J 1994;**8**:337–342.
- [43] PINCUS T, SCHUR PH, ROSE JA, DECKER JL & TALAL N: *Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med 1969;**281**:701–705.
- [44] ANDRZEJEWSKI C, STOLLAR BD, LALOR TM & SCHWARTZ RS: *Hybridoma autoantibodies to DNA*. J Immunol 1980;**124**:1499–1502.
- [45] ANDRZEJEWSKI C, RAUCH J, LAFER E, STOLLAR BD & SCHWARTZ RS: *Antigen-binding diversity and idiotypic cross-reactions among hybridoma autoantibodies to DNA*. J Immunol 1981;**126**:226–231.
- [46] HIROSE S, WAKIYA M, KAWANO-NISHI Y, YI J, SANOKAWA R, TAKI S, SHIMAMURA T, KISHIMOTO T, TSURUI H & NISHIMURA H: *Somatic diversification and affinity maturation of IgM and IgG anti-DNA antibodies in murine lupus*. Eur J Immunol 1993;**23**:2813–2820.
- [47] TAKI S, HIROSE S, KINOSHITA K, NISHIMURA H, SHIMAMURA T, HAMURO J & SHIRAI T: *Somatically mutated IgG anti-DNA antibody clonally related to germ-line encoded IgM anti-DNA antibody*. Eur J Immunol 1992;**22**:987–992.
- [48] STOLLAR BD: *The biochemistry and genetics of DNA and anti-DNA antibodies*. Clin Rheumatol 1990;**9**:30–38.
- [49] STOLLAR BD: *The origin and pathogenic role of anti-DNA autoantibodies*. Curr Opin Immunol 1989;**2**:607–612.
- [50] RAHMAN A: *Autoantibodies, lupus and the science of sabotage*. Rheumatology (Oxford) 2004;**43**:1326–36.
- [51] MARION TN, KRISHNAN MR, DESAI DD, JOU NT & TILLMAN DM: *Monoclonal anti-DNA antibodies: structure, specificity, and biology*. Methods 1997;**11**:3–11.
- [52] MARION TN, TILLMAN DM, KRISHNAN MK, DESAI DD, JOU NT & RUFF MB: *Immunoglobulin variable-region structures in immunity and autoimmunity to DNA*. Tohoku J Exp Med 1994;**173**:43–63.
- [53] MARION TN, TILLMAN DM, JOU NT & HILL RJ: *Selection of immunoglobulin variable regions in autoimmunity to DNA*. Immunol Rev 1992;**128**:123–149.

- [54] MARION TN, TILLMAN DM & JOU NT: *Interclonal and intracloonal diversity among anti-DNA antibodies from an (NZB x NZW)F1 mouse*. J Immunol 1990; **145**:2322–2332.
- [55] MARION TN, LAWTON AR, KEARNEY JF & BRILES DE: *Anti-DNA autoantibodies in (NZB X NZW)F1 mice are clonally heterogeneous, but the majority share a common idiotype*. J Immunol 1982;**128**:668–674.
- [56] TILLMAN DM, JOU NT, HILL RJ & MARION TN: *Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in (NZB x NZW)F1 mice*. J Exp Med 1992;**176**:761–779.
- [57] DE GROOT ER, LAMERS MC, AARDEN LA, SMEENK RJ & VAN OSS CJ: *Dissociation of DNA/anti-DNA complexes at high pH*. Immunol Commun 1980;**9**:515–528.
- [58] PAPALIAN M, LAFER E, WONG R & STOLLAR BD: *Reaction of systemic lupus erythematosus antinative DNA antibodies with native DNA fragments from 20 to 1,200 base pairs*. J Clin Invest 1980;**65**:469–477.
- [59] SANO H, TAKAI O, HARATA N, YOSHINAGA K, KODAMA-KAMADA I & SASAKI T: *Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments*. Scand J Immunol 1989;**30**:51–63.
- [60] PIETRO SMD, CENTENO JM, CERUTTI ML, LODEIRO MF, FERREIRO DU, ALONSO LG, SCHWARZ FP, GOLDBAUM FA & DE PRAT-GAY G: *Specific antibody-DNA interaction: a novel strategy for tight DNA recognition*. Biochemistry 2003;**42**:6218–6227.
- [61] STOLLAR BD & SCHWARTZ RS: *Monoclonal anti-DNA antibodies. The targets and origins of SLE autoantibodies*. Ann N Y Acad Sci 1986;**475**:192–199.
- [62] TSUZAKA K, LEU AK, FRANK MB, MOVAFAGH BF, KOSCEC M, WINKLER TH, KALDEN JR & REICHLIN M: *Lupus autoantibodies to double-stranded DNA cross-react with ribosomal protein S1*. J Immunol 1996;**156**:1668–1675.
- [63] DEOCHARAN B, QING X, LICHAUCO J & PUTTERMAN C: *Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies*. J Immunol 2002; **168**:3072–3078.
- [64] NOSSENT JC, HUYSEN V, SMEENK RJ & SWAAK AJ: *Low avidity antibodies to double stranded DNA in systemic lupus erythematosus: a longitudinal study of their clinical significance*. Ann Rheum Dis 1989;**48**:677–682.
- [65] NOSSENT JC, HUYSEN V, SMEENK RJ & SWAAK AJ: *Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool*. Ann Rheum Dis 1989;**48**:748–752.

- [66] SWAAK T & SMEENK R: *Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA)*. *Ann Rheum Dis* 1985;**44**:245–251.
- [67] SMEENK RJ, ROOIJEN AV & SWAAK TJ: *Dissociation studies of DNA/anti-DNA complexes in relation to anti-DNA avidity*. *J Immunol Methods* 1988;**109**:27–35.
- [68] DEVENS B, CHIA D & BARNETT EV: *Anti-DNA antibody: avidity and valence measurements, studies using sera from immunized rabbits and from two systemic lupus erythematosus patients*. *J Immunol Methods* 1978;**19**:187–203.
- [69] HORNICK CL & KARUCH F: *Antibody affinity. 3. The role of multivalance*. *Immunochemistry* 1972;**9**:325–340.
- [70] KARUSH F: *Multivalent binding and functional affinity*. *Contemp Top Mol Immunol* 1976;**5**:217–228.
- [71] AARDEN LA, LAKMAKER F & GROOT ED: *Immunology of DNA. VI. The effect of mercaptans on IgG and IgM anti-dsDNA*. *J Immunol Methods* 1977;**16**:143–152.
- [72] GRIFFITHS GD, OLSEN I & STEWARD MW: *Comparison of three methods used for the measurement of the avidity of antibody to DNA*. *J Immunol Methods* 1978;**21**:143–157.
- [73] BALLOU SP & KUSHNER I: *Anti-native DNA detection by the Crithidia luciliae method: an improved guide to the diagnosis and clinical management of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1979;**22**:321–327.
- [74] SMEENK R, BRINKMAN K, VAN DEN BRINK H, TERMAAT RM, BERDEN J, NOSSENT H & SWAAK T: *Antibodies to DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Their role in the diagnosis, the follow-up and the pathogenesis of the disease*. *Clin Rheumatol* 1990;**9**:100–110.
- [75] TER BORG EJ, HORST G, HUMMEL EJ, LIMBURG PC & KALLENBERG CG: *Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study*. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:634–643.
- [76] HUGHES GR, COHEN SA & CHRISTIAN CL: *Anti-DNA activity in systemic lupus erythematosus. A diagnostic and therapeutic guide*. *Ann Rheum Dis* 1971;**30**:259–264.
- [77] HUGHES GR: *Significance of anti-D.N.A. antibodies in systemic lupus erythematosus*. *Lancet* 1971;**2**:861–863.

- [78] SWAAK AJ, AARDEN LA, VAN EPS LWS & FELTKAMP TE: *Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1979;**22**:226–235.
- [79] SWAAK T & SMEENK R: *Clinical significance of antibodies to double stranded DNA (dsDNA) for systemic lupus erythematosus (SLE)*. *Clin Rheumatol* 1987;**6** Suppl 1:56–73.
- [80] HOLBOROW EJ: *Antinucleic acid antibodies*. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1979;**13**:107–111.
- [81] ARBUCKLE MR, MCCCLAIN MT, RUBERTONE MV, SCOFIELD RH, DENNIS GJ, JAMES JA & HARLEY JB: *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med* 2003;**349**:1526–1533.
- [82] OKAMURA M, KANAYAMA Y, AMASTU K, NEGORO N, KOHDA S, TAKEDA T & INOUE T: *Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology*. *Ann Rheum Dis* 1993;**52**:14–20.
- [83] AOTSUKA S, OKAWA M, IKEBE K & YOKOHARI R: *Measurement of anti-double-stranded DNA antibodies in major immunoglobulin classes*. *J Immunol Methods* 1979;**28**:149–162.
- [84] KRIPPNER H, MERLE S, JOERGENS K & PIRLET K: *Antibodies to dsDNA and ssDNA in the immunoglobulin classes IgG and IgM: prognostic value in the course of SLE*. *Z Rheumatol* 1984;**43**:265–271.
- [85] LINNIK MD, HU JZ, HEILBRUNN KR, STRAND V, HURLEY FL, JOH T & CONSORTIUM LJPI: *Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 2005;**52**:1129–1137.
- [86] BOOTSMA H, SPRONK PE, HUMMEL EJ, DE BOER G, TER BORG EJ, LIMBURG PC & KALLENBERG CG: *Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies*. *Scand J Rheumatol* 1996;**25**:352–359.
- [87] BOOTSMA H, SPRONK PE, TER BORG EJ, HUMMEL EJ, DE BOER G, LIMBURG PC & KALLENBERG CG: *The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation*. *Ann Rheum Dis* 1997;**56**:661–666.

- [88] TALAL N, PILLARISETTY RJ, DEHORATIUS RJ & MESSNER RP: *Immunologic regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA I. Significance of IgM and IgG antibodies in SLE patients and asymptomatic relatives.* Clin Exp Immunol 1976;**25**:377–382.
- [89] WERWITZKE S, TRICK D, KAMINO K, MATTHIAS T, KNIESCH K, SCHLEGELBERGER B, SCHMIDT RE & WITTE T: *Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse.* Arthritis Rheum 2005;**52**:3629–3638.
- [90] WITTE T, HARTUNG K, SACHSE C, MATTHIAS T, FRICKE M, DEICHER H, KALDEN JR, LAKOMEK HJ, PETER HH & SCHMIDT RE: *IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis.* SLE Study Group. Rheumatol Int 1998;**18**:85–91.
- [91] FÖRGER F, MATTHIAS T, OPPERMAN M, BECKER H & HELMKE K: *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis.* Lupus 2004;**13**:36–44.
- [92] WITTE T, HARTUNG K, MATTHIAS T, SACHSE C, FRICKE M, DEICHER H, KALDEN JR, LAKOMEK HJ, PETER HH & SCHMIDT RE: *Association of IgA anti-dsDNA antibodies with vasculitis and disease activity in systemic lupus erythematosus.* SLE Study Group. Rheumatol Int 1998;**18**:63–69.
- [93] LEON SA, GREEN A, EHRLICH GE, POLAND M & SHAPIRO B: *Avidity of antibodies in SLE: relation to severity of renal involvement.* Arthritis Rheum 1977;**20**:23–29.
- [94] WINFIELD JB, FAIFERMAN I & KOFFLER D: *Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis.* J Clin Invest 1977;**59**:90–96.
- [95] GERSHWIN ME & STEINBERG AD: *Qualitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis.* Arthritis Rheum 1974;**17**:947–954.
- [96] ROTHFIELD NF & STOLLAR BD: *The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus.* J Clin Invest 1967;**46**:1785–1794.
- [97] EDMONDS J, JOHNSON G, BM A & EJ H: *The value of tests for Antibodies to DNA in monitoring the clinical course of SLE.* Clin Exp Immunol 1975;**22**:9–15.
- [98] KOFFLER D, SCHUR PH & KUNKEL HG: *Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus.* J Exp Med 1967;**126**:607–624.

- [99] KOFFLER D, AGNELLO V & KIMKEL HG: *Polynucleotide immune complexes in serum and glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus*. Am J Pathol 1974;**74**:109–124.
- [100] KOFFLER D, SCHUR PH & KUNKEL HG: *Glomerular localization of DNA and antibodies to nuclear constituents*. Trans Assoc Am Physicians 1967;**80**:149–155.
- [101] DANG H & HARBECK RJ: *The in vivo and in vitro glomerular deposition of isolated anti-double-stranded-DNA antibodies in NZB/W mice*. Clin Immunol Immunopathol 1984;**30**:265–278.
- [102] VARGAS MT, GUSTILO K, D’ANDREA DM, KALLURI R, FOSTER MH & MADAIO MP: *Structural features of nephritogenic lupus autoantibodies*. Methods 1997;**11**:62–69.
- [103] DAVIDSON A, PREUD’HOMME JL, SOLOMON A, CHANG MD, BEEDE S & DIAMOND B: *Idiotypic analysis of myeloma proteins: anti-DNA activity of monoclonal immunoglobulins bearing an SLE idio type is more common in IgG than IgM antibodies*. J Immunol 1987;**138**:1515–1518.
- [104] HAHN BH: *Antibodies to DNA*. N Engl J Med 1998;**338**:1359–1568.
- [105] BERNSTEIN KA, VALERIO RD & LEFKOWITH JB: *Glomerular binding activity in MRL lpr serum consists of antibodies that bind to a DNA/histone/type IV collagen complex*. J Immunol 1995;**154**:2424–2433.
- [106] MADAIO MP, CARLSON J, CATALDO J, UCCI A, MIGLIORINI P & PANKEWYCZ O: *Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits*. J Immunol 1987;**138**:2883–2889.
- [107] RAZ E, BREZIS M, ROSENMAN E & EILAT D: *Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney*. J Immunol 1989;**142**:3076–3082.
- [108] BOOTSMA H, SPRONK P, DERKSEN R, DE BOER G, WOLTERS-DICKE H, HERMANS J, LIMBURG P, GMELIG-MEYLING F, KATER L & KALLENBERG C: *Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus*. Lancet 1995;**345**:1595–1599.
- [109] HAUGBRO K, NOSSENT JC, WINKLER T, FIGENSCHAU Y & REKVIG OP: *Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity*. Ann Rheum Dis 2004;**63**:386–394.
- [110] DEGELMANN P, WENGER J, NIESSNER R & KNOPP D: *Development of a class-specific ELISA for sulfonylurea herbicides (sulfuron screen)*. Environ Sci Technol 2004;**38**:6795–6802.

- [111] DEGELMANN P, EGGER S, JÜRLING H, MÜLLER J, NIESSNER R & KNOPP D: *Determination of sulfonylurea herbicides in water and food samples using sol-gel glass-based immunoaffinity extraction and liquid chromatography-ultraviolet/diode array detection or liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem 2006;**54**:2003–2011.
- [112] KIENING M, NIESSNER R, DRS E, BAUMGARTNER S, KRŠKA R, BREMER M, TOMKIES V, REECE P, DANKS C, IMMER U & WELLER MG: *Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods*. J Agric Food Chem 2005;**53**:3321–3327.
- [113] FARR RS: *A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I BSA and antibody*. J Infect Dis 1958;**103**:239–262.
- [114] MINDEN P, REID RT & FARR RS: *A Comparison of Some Commonly Used Methods for Detecting Antibodies to Bovine Albumin in Human Serum*. J Immunol 1966;**96**:180–187.
- [115] WOLD RT, YOUNG FE, TAN EM & FARR RS: *Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid*. Science 1968; **161**:806–807.
- [116] AARDEN LA, LAKMAKER F & FELTKAMP TE: *Immunology of DNA. I. The influence of reaction conditions on the Farr assay as used for the detection of anti-ds DNA*. J Immunol Methods 1976;**10**:27–37.
- [117] AARDEN L, LAKMAKER F & FELTKAMP T: *Immunology of DNA. II. The Effect of Size and Structure of the antigen on the Farr assay*. J Immunol Methods 1976; **10**:39–48.
- [118] AARDEN LA, LAKMAKER F & DE GROOT ER: *Immunology of DNA. IV. Quantitative aspects of the Farr assay*. J Immunol Methods 1976;**11**:153–63.
- [119] SMEENK R, VAN DER LELIJ G & AARDEN L: *Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay*. J Immunol 1982;**128**:73–78.
- [120] RUBIN RL, LAFFERTY J & CARR RI: *Reevaluation of the ammonium sulfate assay for DNA antibody*. Arthritis Rheum 1978;**21**:950–957.
- [121] SMEENK R, BRINKMAN K, VAN DEN BRINK H & SWAAK T: *A comparison of assays used for the detection of antibodies to DNA*. Clin Rheumatol 1990;**9**:63–72.
- [122] ROUQUETTE AM & DESGRUELLES C: *Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays*. Lupus 2006;**15**:403–407.

- [123] CASALS SP, FRIOU GJ & TEAGUE PO: *Specific Nuclear Reaction Pattern of Antibody to DNA in Lupus Erythematosus Sera*. J Lab Clin Med 1963;**62**:625–631.
- [124] AARDEN LA, DE GROOT ER & FELTKAMP TE: *Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique*. Ann N Y Acad Sci 1975;**254**:505–515.
- [125] SHAPIRO TA & ENGLUND PT: *The structure and replication of kinetoplast DNA*. Annu Rev Microbiol 1995;**49**:117–143.
- [126] SMEENK R, VAN DER LELIJ G & AARDEN L: *Measurement of low avidity anti-dsDNA by the Crithidia luciliae test and the PEG assay*. Clin Exp Immunol 1982; **49**:603–610.
- [127] SMEENK RJ, BRINKMAN K, VAN DEN BRINK HG & WESTGEEST AA: *Reaction patterns of monoclonal antibodies to DNA*. J Immunol 1988;**140**:3786–3792.
- [128] SATOH M, BEHNEY KM, MIZUTANI A, RICHARDS HB, HUTSON AD & REEVES WH: *Titration emulation: a computer-assisted technique that simplifies the quantification of anti-dsDNA antibodies using the Crithidia luciliae assay*. Lupus 2001;**10**:632–636.
- [129] VILLALTA D, ROMELLI PB, SAVINA C, BIZZARO N, TOZZOLI R, TONUTTI E, GHIRARDELLO A & DORIA A: *Anti-dsDNA antibody avidity determination by a simple reliable ELISA method for SLE diagnosis and monitoring*. Lupus 2003; **12**:31–36.
- [130] ISENBERG DA, DUDENEY C, WILLIAMS W, ADDISON I, CHARLES S, CLARKE J & TODD-POKROPEK A: *Measurement of anti-DNA antibodies: a reappraisal using five different methods*. Ann Rheum Dis 1987;**46**:448–456.
- [131] WONG KH, LAWTON JW, CHENG SK, LEE SS & LAU CS: *Measurement of anti-dsDNA: a comparative study of two ELISA and the Crithidia assay*. Pathology 1998;**30**:57–61.
- [132] DING M & ZHANG JZ: *SSB peptide and DNA co-immunization induces inhibition of anti-dsDNA antibody production in rabbits*. Chin Med J (Engl) 2008;**121**:227–230.
- [133] BARDIN N, RAGOT C & SANMARCO M: *Clinical evaluation of a new quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for detection of double-stranded DNA autoantibodies*. Ann N Y Acad Sci 2007;**1109**:511–518.

- [134] JAEKELL HP, TRABANDT A, GROBE N & WERLE E: *Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. *Lupus* 2006;**15**:335–345.
- [135] DEICHER HR, HOLMAN HR & KUNKEL HG: *The precipitin reaction between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus*. *J Exp Med* 1959; **109**:97–114.
- [136] OUCHTERLONY O: *Diffusion-in-gel methods for immunological analysis*. *Prog Allergy* 1958;**5**:1–78.
- [137] OUCHTERLONY O: *Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II*. *Prog Allergy* 1962;**6**:30–154.
- [138] DAVIS J & WINFIELD J: *Serum Antibodies to DNA by Counterimmunoelectrophoresis (CIE)*. *Clin Immunol Immunopathol* 1971;**2**:510–518.
- [139] STOLLAR D, LEVINE L & MARMUR J: *Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in lupus erythematosus serum. II. Characterization of antibodies in several sera*. *Biochim Biophys Acta* 1962;**61**:7–18.
- [140] RILEY RL, MCGRATH H & TAYLOR RP: *Detection of low avidity anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1979;**22**:219–225.
- [141] FELTKAMP TE: *Standards for ANA and anti-DNA*. *Clin Rheumatol* 1990;**9**:74–78.
- [142] EVANS N: *Persönliche Mitteilung*. National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK, 2007.
- [143] NOSSENT HC & REKVIG OP: *Is closer linkage between systemic lupus erythematosus and anti-double-stranded DNA antibodies a desirable and attainable goal?* *Arthritis Res Ther* 2005;**7**:85–87.
- [144] SMEENK RJ, VAN DEN BRINK HG, BRINKMAN K, TERMAAT RM, BERDEN JH & SWAAK AJ: *Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value*. *Rheumatol Int* 1991;**11**:101–107.
- [145] HAUPTMANN P: *Sensoren: Prinzipien und Anwendung*. Hanser, München, 1990.
- [146] WOLFBEIS OS: *Optical sensing based on analyte recognition by enzymes, carriers and molecular interactons*. *Anal Chim Acta* 1991;**250**:181–201.
- [147] NIESSNER R: *Chemische Sensoren: Prinzipien und Anwendungen, in: Analytiker Taschenbuch, Band 7*. Springer, Berlin, 1988.

- [148] IUPAC: *Compendium of Chemical Terminology, (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [149] SETHI RS: *Transducer aspects of biosensors*. Biosens Bioelectron 1994;**9**:243–264.
- [150] LUPPA PB, SOKOLL LJ & CHAN DW: *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clin Chim Acta 2001;**314**:1–26.
- [151] VO-DINH T & CULLUM B: *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. Fresenius J Anal Chem 2000;**366**:540–551.
- [152] KEUSGEN M: *Biosensors: new approaches in drug discovery*. Naturwissenschaften 2002;**89**:433–444.
- [153] CLARK LC & LYONS C: *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Ann N Y Acad Sci 1962;**102**:29–45.
- [154] UEDA T, TSURUMARU M & IMOTO T: *Kinetic measurement of the interaction between a lysozyme and its immobilized substrate analogue by means of surface plasmon resonance*. J Biochem 1998;**124**:712–716.
- [155] JIANG X, LI D, XU X, YING Y, LI Y, YE Z & WANG J: *Immunosensors for detection of pesticide residues*. Biosens Bioelectron 2008;**23**:1577–1587.
- [156] BRECHT A, PIEHLER J, LANG G & GAUGLITZ G: *A direct optical immunosensor for atrazine detection*. Anal Chim Acta 1995;**311**:289–299.
- [157] SAWATA S, KAI E, IKEBUKURO K, IIDA T, HONDA T & KARUBE I: *Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction*. Biosens Bioelectron 1999;**14**:397–404.
- [158] MARRAZZA G, CHIANELLA I & MASCINI M: *Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection*. Biosens Bioelectron 1999;**14**:43–51.
- [159] WANG J, CAI X, RIVAS G, SHIRAIISHI H, FARIAS PA & DONTA N: *DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus*. Anal Chem 1996;**68**:2629–2634.
- [160] VÉDRINE C, LECLERC JC, DURRIEU C & TRAN-MINH C: *Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides*. Biosens Bioelectron 2003;**18**:457–463.
- [161] METZGER J, SCHNITZBAUER A, MEYER M, SOEDER M, CUILLERON CY, HAUPTMANN H, HUBER E & LUPPA PB: *Binding analysis of 1 α - and 17 α -dihydrotestosterone derivatives to homodimeric sex hormone-binding globulin*. Biochemistry 2003;**42**:13735–13745.

- [162] KRIZ D & MOSBACH K: *Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer*. *Anal Chim Acta* 1995; **300**:71–75.
- [163] WINKLMAIR M: *Entwicklung eines direkten, multianalytfähigen Immunsensorarrays zur parallelen Bestimmung kreuzreagierender Triazinherbizide*. Dissertation, Technische Universität München, 1999.
- [164] KÖHLER G & MILSTEIN C: *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 1975;**256**:495–497.
- [165] MORGAN CL, NEWMAN DJ & PRICE CP: *Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine*. *Clin Chem* 1996;**42**:193–209.
- [166] HILLER R, LAFFER S, HARWANEGG C, HUBER M, SCHMIDT WM, TWARDOŚZ A, BARLETTA B, BECKER WM, BLASER K, BREITENEDER H, CHAPMAN M, CRAMERI R, DUCHÊNE M, FERREIRA F, FIEBIG H, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, KING TP, KLEBER-JANKE T, KURUP VP, LEHRER SB, LIDHOLM J, MÜLLER U, PINI C, REESE G, SCHEINER O, SCHEYNIUS A, SHEN HD, SPITZAUER S, SUCK R, SWOBODA I, THOMAS W, TINGHINO R, HAGEHAMSTEN MV, VIRTANEN T, KRAFT D, MÜLLER MW & VALENTA R: *Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment*. *FASEB J* 2002;**16**:414–416.
- [167] FALL BI, EBERLEIN-KÖNIG B, BEHRENDT H, NIESSNER R, RING J & WELLER MG: *Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in human serum*. *Anal Chem* 2003;**75**:556–562.
- [168] GÓMARA MJ, ERCILLA G, ALSINA MA & HARO I: *Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology*. *Journal of Immunological Methods* 2000;**246**:13–24.
- [169] LOWE CR: *An introduction to the concepts and technology of biosensors*. *Biosensors* 1985;**1**:3–16.
- [170] KORPAN YI, GONCHAR MV, SIBIRNY AA, MARTELET C, EL'SKAYA AV, GIBSON TD & SOLDATKIN AP: *Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination*. *Biosens Bioelectron* 2000;**15**:77–83.
- [171] YANG Q, ATANASOV P & WILKINS E: *Needle-type lactate biosensor*. *Biosens Bioelectron* 1999;**14**:203–210.
- [172] LIMBUT W, THAVARUNGKUL P, KANATHARANA P, ASAWATRERATANAKUL P, LIMSAKUL C & WONGKITTISUKSA B: *Comparative study of controlled pore glass,*

- silica gel and poraver for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system.* Biosens Bioelectron 2004;**19**:813–821.
- [173] METZGER J, VON LANDENBERG P, KEHREL M, BUHL A, LACKNER KJ & LUPPA PB: *Biosensor analysis of β -2-glycoprotein I-reactive autoantibodies: evidence for isotype-specific binding and differentiation of pathogenic from infection-induced antibodies.* Clin Chem 2007;**53**:1137–1143.
- [174] KÄPPEL ND, PRÖLL F & GAUGLITZ G: *Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk.* Biosens Bioelectron 2007; **22**:2295–2300.
- [175] MÖHRLE BP, KÖHLER K, JAEHRLING J, BROCK R & GAUGLITZ G: *Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RIfS).* Anal Bioanal Chem 2006;**384**:407–413.
- [176] ZHANG Y, WANG H, YAN B, ZHANG Y, LI J, SHEN G & YU R: *A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite.* J Immunol Methods 2008;**332**:103–111.
- [177] GRONEWOLD TMA: *Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges.* Anal Chim Acta 2007;**603**:119–128.
- [178] RAMANATHAN K & DANIELSSON B: *Principles and applications of thermal biosensors.* Biosens Bioelectron 2001;**16**:417–423.
- [179] RITCHIE RH: *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films.* Phys Rev 1957; **106**:874–881.
- [180] STEINER G: *Oberflächenplasmonenresonanz, in: Immunoassays.* Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- [181] RÄTHER H: *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings (Springer tracts in modern physics; 111).* Springer, Berlin, 1988.
- [182] KRETSCHMANN E: *Die Bestimmung optischer Konstanten dünner Schichten in der Nähe der Plasmafrequenz aus Kurvenfeldern konstanter Transmission.* Z Physik 1969;**221**:346–356.
- [183] KRETSCHMANN E: *Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen.* Z Physik 1971;**241**:313–324.
- [184] OTTO A: *Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection.* Z Physik 1968;**216**:398–410.
- [185] HOLST K & RAETHER H: *The influence of thin surface films on the plasma resonance emission.* Opt Commun 1970;**2**:312–316.

- [186] POCKRAND I: *Surface plasma oscillations at silver surfaces with thin transparent and absorbing coatings*. Surface Science 577-588 1978;**72**:577–588.
- [187] NYLANDER C, LIEBERG B & LIND T: *Gas detection by means of surface plasmon resonance*. Sensors and Actuators 1982-1983;**3**:79–88.
- [188] LIEBERG B, NYLANDER C & LUNDSTRÖM I: *Surface Plasmon Resonance for gas detection and biosensing*. Sens Actuators 1983;**4**:299–304.
- [189] LIEBERG B, NYLANDER C & LUNDSTRÖM I: *Biosensing with surface plasmon resonance—how it all started*. Biosens Bioelectron 1995;**10**:i–ix.
- [190] JÖNSSON U, FÄGERSTAM L, IVARSSON B, JOHNSON B, KARLSSON R, LUNDH K, LÖFÅS S, PERSSON B, ROOS H, RÖNNBERG I, SJÖLANDER S, STENBERG E, STÅHLBERG R, URBANICZKY C, ÖSTLIN H & MALMQVIST M: *Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology*. Bio Techniques 1991;**11**:620–627.
- [191] JÖNSSON U & MALMQVIST M: *Advances in Biosensors*, Vol. 2, Ch. Real time biospecific interaction analysis. The integration of surface plasmon resonance detection, general biospecific interface chemistry and microfluidics into one analytical system. Elsevier Science & Technology, 1992;291–336.
- [192] BIACORE AB: *BIAtchnology Handbook*. 1998.
- [193] ANDERSSON K, HAEMAELAEINEN M & MALMQVIST M: *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach*. Anal Chem 1999;**71**:2475–2481.
- [194] KARLSSON R, MICHAELSSON A & MATTSSON L: *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system*. J Immunol Methods 1991;**145**:229–240.
- [195] O'SHANNESY DJ, BRIGHAM-BURKE M, SONESON KK, HENSLEY P & BROOKS I: *Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods*. Anal Biochem 1993;**212**:457–468.
- [196] BIACORE TRAINING COURSES: *Kinetic and Affinity Analysis with Biacore - Level 1*. 2005.
- [197] KARLSSON R & FAELT A: *Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors*. J Immunol Methods 1997;**200**:121–133.

- [198] BIACORE TRAINING COURSES: *Kinetic and Affinity Analysis with Biacore - Level 2*. 2005.
- [199] STENBERG E, PERSSON B, ROOS H & URBANICZKY C: *Quantitative-Determination of Surface Concentration of Protein with Surface-Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins*. Journal of Colloid and Interface Science 1991;**143**:513–526.
- [200] CROTHERS DM & METZGER H: *The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies*. Immunochemistry 1972;**9**:341–357.
- [201] SCATCHARD G: *The Attractions of Proteins for small Molecules and Ions*. Ann N Y Acad Sci 1949;**51**:660–672.
- [202] JUNGHANS RP, WALDMANN TA, LANDOLFI NF, AVDALOVIC NM, SCHNEIDER WP & QUEEN C: *Anti-Tac-H, a humanized antibody to the interleukin 2 receptor with new features for immunotherapy in malignant and immune disorders*. Cancer Res 1990;**50**:1495–1502.
- [203] STUART CA, PIETRZYK RA, FURLANETTO RW & GREEN A: *High affinity antibody from hen's eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-I receptor*. Anal Biochem 1988;**173**:142–150.
- [204] LINSLEY PS, HARGREAVES WR, TWARDZIK DR & TODARO GJ: *Detection of larger polypeptides structurally and functionally related to type I transforming growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;**82**:356–360.
- [205] RICHALET-SÉCORDEL PM, RAUFFER-BRUYÉRE N, CHRISTENSEN LL, OFENLOCH-HAEHNLE B, SEIDEL C & REGENMORTEL MHV: *Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation*. Anal Biochem 1997;**249**:165–173.
- [206] KIKUCHI Y, UNO S, NANAMI M, YOSHIMURA Y, ICHIRO IIDA S, FUKUSHIMA N & TSUCHIYA M: *Determination of concentration and binding affinity of antibody fragments by use of surface plasmon resonance*. J Biosci Bioeng 2005;**100**:311–317.
- [207] RICH RL & MYSZKA DG: *BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis*. J Mol Recognit 2001;**14**:223–228.
- [208] ZHU G, YANG B & JENNINGS RN: *Quantitation of basic fibroblast growth factor by immunoassay using BIAcore 2000*. J Pharm Biomed Anal 2000;**24**:281–290.
- [209] ZEDER-LUTZ G, BENITO A & REGENMORTEL MHV: *Active concentration measurements of recombinant biomolecules using biosensor technology*. J Mol Recognit 1999;**12**:300–309.

- [210] CARUSO F, RODDA E, FURLONG D, NIKURA K & OKAHATA Y: *Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development*. *Anal Chem* 1997;**69**:2043–2049.
- [211] SEIDEL G, DIEL M, FUCHSBAUER N & HILLEN W: *Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and cre in carbon catabolite regulation of Bacillus subtilis*. *Febs J* 2005;**272**:2566–2577.
- [212] CHOI JW, CHUN BS, OH BK, LEE W & LEE WH: *Fabrication of DNA-protein conjugate layer on gold-substrate and its application to immunosensor*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;**40**:173–177.
- [213] HENDRICKSON ER, TRUBY TM, JOERGER RD, MAJARIAN WR & EBERSOLE RC: *High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction*. *Nucleic Acids Res* 1995;**23**:522–529.
- [214] SCHWEITZER B, WILTSHIRE S, LAMBERT J, O'MALLEY S, KUKANSKIS K, ZHU Z, KINGSMORE SF, LIZARDI PM & WARD DC: *Inaugural article: immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:10113–10119.
- [215] ZHANG HT, KACHARMINA JE, MIYASHIRO K, GREENE MI & EBERWINE J: *Protein quantification from complex protein mixtures using a proteomics methodology with single-cell resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:5497–502.
- [216] HERMANSON GT: *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2008.
- [217] KOZLOV IA, MELNYK PC, STROMSBORG KE, CHEE MS, BARKER DL & ZHAO C: *Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection*. *Biopolymers* 2004;**73**:621–630.
- [218] SCHWARTZ D, ABRAMS M, GIADOMENICA C & ZUBIETA J: *Certain pyridyl hydrazines and hydrazides useful for protein labeling*. 1993.
- [219] SCHWARTZ D, ABRAMS M, GIADOMENICA C & ZUBIETA J: *Protein labelling utilizing certain pyridyl hydrazines, hydrazides and derivatives*. 1995.
- [220] BUHL A, METZGER JH, HEEGAARD NH, VON LANDENBERG P, FLECK M & LUPPA PB: *Novel biosensor-based analytic device for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies*. *Clin Chem* 2007;**53**:334–341.
- [221] O'SHANNESY DJ, BRIGHAM-BURKE M & PECK K: *Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector*. *Anal Biochem* 1992;**205**:132–136.
- [222] BIACORE AB: *Biacore Sensor Surface handbook*. 2003.

- [223] HEEGAARD NH, OLSEN DT & LARSEN KL: *Immuno-capillary electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody against DNA*. J Chromatogr A 1996;**744**:285–294.
- [224] FRANKFURT OS: *Detection of DNA damage in individual cells by flow cytometric analysis using anti-DNA monoclonal antibody*. Exp Cell Res 1987;**170**:369–380.
- [225] FRANKFURT OS: *Decreased stability of DNA in cells treated with alkylating agents*. Exp Cell Res 1990;**191**:181–185.
- [226] FRANKFURT OS: *Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA*. Anticancer Res 1994;**14**:1861–1869.
- [227] FRANKFURT OS, ROBB JA, SUGARBAKER EV & VILLA L: *Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis*. Exp Cell Res 1996;**226**:387–397.
- [228] LINNET K: *A review on the methodology for assessing diagnostic tests*. Clin Chem 1988;**34**:1379–1386.
- [229] ZWEIG MH & CAMPBELL G: *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem 1993;**39**:561–577.
- [230] SIMON T, KNEUSEL R, HAUBRUCK H, LIEDVOGEL B & DIARECT AG: *New ways for the standardization of autoantibody assays: chimeric monoclonal antibodies*. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2001;**235**:91–97.
- [231] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA] CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH [CDER]: *Bioanalytical Method Validation*. Guidance for Industry 2001;.
- [232] RIBOLDI P, GEROSA M, MORONI G, RADICE A, ALLEGRI F, SINICO A, TINCANI A & MERONI PL: *Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus?* Autoimmunity 2005;**38**:39–45.
- [233] REVEILLE JD: *Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus*. Lupus 2004;**13**:290–297.
- [234] ISENBERG D & SMEENK R: *Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now?* Lupus 2002;**11**:797–800.
- [235] SCHUCK P, BOYD LF & ANDERSEN PS: *Measuring protein interactions by optical biosensors*. Curr Protoc Cell Biol 2004;**Chapter 17**:Unit 17.6.
- [236] MALMBORG AC & BORREBAECK CA: *BIAcore as a tool in antibody engineering*. J Immunol Methods 1995;**183**:7–13.

- [237] KELLEY RF & O'CONNELL MP: *Thermodynamic analysis of an antibody functional epitope*. *Biochemistry* 1993;**32**:6828–6835.
- [238] GARNER MM & REVZIN A: *A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system*. *Nucleic Acids Res* 1981;**9**:3047–3060.
- [239] FRIED M & CROTHERS DM: *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Nucleic Acids Res* 1981;**9**:6505–6525.
- [240] KHAN WA, ALAM K & MOINUDDIN: *Catechol-estrogen modified DNA: a better antigen for cancer autoantibody*. *Arch Biochem Biophys* 2007;**465**:293–300.
- [241] KHAN WA, HABIB S, ALAM K & MOINUDDIN: *Enhanced binding of circulating SLE autoantibodies to catecholesterogen-copper-modified DNA*. *Mol Cell Biochem* 2008;**315**:143–150.
- [242] DAVIES DR, PADLAN EA & SEGAL DM: *Three-dimensional structure of immunoglobulins*. *Annu Rev Biochem* 1975;**44**:639–667.
- [243] FAIRALL L, HARRISON SD, TRAVERS AA & RHODES D: *Sequence-specific DNA binding by a two zinc-finger peptide from the Drosophila melanogaster Tramtrack protein*. *J Mol Biol* 1992;**226**:349–366.
- [244] MORTIMER CE: *Chemie: das Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987.
- [245] NIEBA L, KREBBER A & PLÜCKTHUN A: *Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics*. *Anal Biochem* 1996;**234**:155–165.
- [246] BIACORE AB: *Biacore X Instrument Handbook*. 1997.
- [247] FRIGUET B, CHAFFOTTE AF, DJAVADI-OHANIANCE L & GOLDBERG ME: *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. *J Immunol Methods* 1985;**77**:305–319.
- [248] SPATZ L, SAENKO V, ILIEV A, JONES L, GESKIN L & DIAMOND B: *Light chain usage in anti-double-stranded DNA B cell subsets: role in cell fate determination*. *J Exp Med* 1997;**185**:1317–1326.
- [249] GIORGINI A, SELMI C, INVERNIZZI P, PODDA M, ZUIN M & GERSHWIN ME: *Primary biliary cirrhosis: solving the enigma*. *Ann N Y Acad Sci* 2005;**1051**:185–193.

- [250] CHOU MJ, LEE SL, CHEN TY & TSAY GJ: *Specificity of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Ann Rheum Dis 1995;**54**:148–151.
- [251] WASMUTH JC, Y MINARRO DO, HOMRIGHAUSEN A, LEIFELD L, ROCKSTROH JK, SAUERBRUCH T & SPENGLER U: *Phospholipid autoantibodies and the antiphospholipid antibody syndrome: diagnostic accuracy of 23 methods studied by variation in ROC curves with number of clinical manifestations*. Clin Chem 2002; **48**:1004–1010.
- [252] PASSING H & BABLOK: *A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I*. J Clin Chem Clin Biochem 1983;**21**:709–720.
- [253] LAEMMLI UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970;**227**:680–685.
- [254] SMEENK RJ, AARDEN LA & VAN OSS CJ: *Comparison between dissociation and inhibition of association of DNA/anti-DNA complexes*. Immunol Commun 1983; **12**:177–188.