

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

Klinische Wertigkeit eines neuartigen Biosensors zum Nachweis von DNA-Autoantikörpern bei Systemischem Lupus Erythematoses

Felix Julius Fiegel

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. P. B. Lupp 2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 17.09.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.09.2013 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter:

Fiegel F, Buhl A, Jaekel HP, Werle E, Schmolke M, Ollert M, Luppä PB: *Autoantibodies to double-stranded DNA-Intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor based device*. *Lupus* 2010; 19: 957-964.

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Systemischer Lupus Erythematoses	1
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Definition und Systematik	1
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Klinische Manifestation	3
1.1.5 Pathogene Faktoren.....	6
1.1.6 Ätiopathogenese.....	7
1.1.7 Diagnose.....	8
1.2 Autoantikörper gegen dsDNA.....	10
1.3 Anti-dsDNA Laboranalytik.....	11
1.3.1 Farr Radioimmunoassay	12
1.3.2 Nichtradioaktive Immunoassays	12
1.3.3 <i>Crithidia luciliae</i> indirekte Immunfluoreszenz.....	13
1.4 Therapie und Prognose.....	14
1.5 Biosensorik.....	15
1.5.1 Grundlagen der Biosensorik.....	15
1.6 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Biosensoren	16
1.6.1. Oberflächenplasmonresonanz	16
1.6.2. Aufbau des SPR-Biosensor Biacore X.....	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Material und Methodik	23
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2 Chemikalien und Antikörper.....	23
2.3 Puffer und Lösungen	24
2.4 Patientenseren und Kontrollen	25
2.5 Immunoassays zur Detektion von anti-dsDNA.....	28
2.5.1 Farr-Assay	28
2.5.2 Bindazyme-Elisa	28

2.5.3	Farrzyme-Elisa	28
2.5.4	EliA	28
2.6	SPR-Biosensor	29
2.6.1	Chipbeladung	29
2.6.2	Einsatz eines anti-dsDNA Kalibrators zur Quantifizierung der Biosensorergebnisse.....	35
2.6.3	Biosensormessungen der SLE- und Kontroll-Seren.....	35
2.6.4	Isotypspezifische Abreicherung von Immunglobulinen aus Serum	36
2.7	Auswertung der Daten.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Auswertung der SPR-Sensorgramme.....	38
3.1.1	Ak-Isotypbestimmung einzelner Seren.....	40
3.2	Vergleichende Datenanalyse aller 5 anti-dsDNA- Bestimmungsmethoden	42
3.3	Methodenvergleich.....	43
3.4	ROC-Analysen und Bestimmung der diagnostischen Effizienz	44
3.6	Repetitive Messungen des Kalibrators.....	48
4	Diskussion	50
4.1	Anti-dsDNA bei SLE und assoziierter Lupus Nephritis.....	50
4.1.1	Weitere Marker	51
4.2	Interpretation des Vergleichs der fünf anti-dsDNA- Methoden	52
4.2.1	Rangkorrelationskoeffizienten	52
4.2.2	Diagnostische Effizienz und ROC-Analyse.....	53
4.3	Anti-dsDNA SPR Biosensor	55
4.3.1	Ak-Isotyp-Bestimmung.....	56
4.3.2	Kalibration des SPR-Biosensors	56
4.3.3	Besonderheiten der SPR-Methodik.....	57
4.4	Die serologische SLE-Diagnostik.....	58
4.4.1	Hindernisse für eine Vereinheitlichung der serologischen Autoantikörper-Diagnostik	60
5	Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis		63
Danksagung		73

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APS	Antiphospholipid-Syndrom
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus bovinem Serum
CLIF	Crithidia luciliae indirekte Immunfluoreszenz
CMD	Carboxymethyldextran
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPGN	diffuse proliferative Glomerulonephritis (Lupusnephritis)
ds	double stranded, doppelsträngig
EDC	N-ethyl-N-[(dimethylamino)propyl]-carbodiimid hydrochlorid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FC	flow cell, Flusszelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hTf	Humanes Transferrin
IF	Immunofluoreszenz
IgA	Immunglobulin vom Isotyp A
IgG	Immunglobulin vom Isotyp G
IgM	Immunglobulin vom Isotyp M
IU	International Unit, internationale Einheit
mAK	Monoklonaler Antikörper
MW	Mittelwert
NHS	N-hydroxysuccinimid

nOGP	n-Octyl β -D-Glucopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
q.s.	quantum satis, so viel wie nötig
RI	Refraktionsindex
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver Operating Characteristic
RU	Resonance Unit, Resonanzeinheit
SANH	Succinimidyl 6-hydrazinonicotinate acetone hydrazone
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonresonanz
ss	single stranded, einzelsträngig
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl an häufigen klinischen Manifestationen bei SLE-Patienten.....	4
Tabelle 2: Diagnostische Kriterien des American College of Rheumatology (ACR).....	9
Tabelle 3: Prävalenz klinischer Symptome der SLE-Studien-Patienten	26
Tabelle 4: Merkmale der Patienten und Kontrollen.....	27
Tabelle 5: Ergebnisse der anti-dsDNA-Datensätze der verwendeten Methoden	42
Tabelle 6: Rangkorrelationskoeffizienten aller 5 Methoden	43
Tabelle 7: AUC und DE-Werte aller Testmethoden.....	45
Tabelle 8: Anbindungswerte des Kalibrators dsDNA-mAB32	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SPR-Funktionsprinzip des Biacore X.....	18
Abbildung 2: SPR-Sensorgramm mit typischem Verlauf.....	21
Abbildung 3a: Herstellungsprozess des biotinylierten Protein-DNA-Konjugats.....	31
Abbildung 3b: SA-Chip-Oberflächendesign	32
Abbildung 4: SA-Chip-Beladungsschema im SPR-Biosensorgramm.....	34
Abbildung 5: Sensorgramme (Kalibrator, SLE-und Kontrollseren).....	39
Abbildung 6: Isotypspezifische Abreicherung zwei verschiedener Seren.....	41
Abbildung 7: Dot-Plot und Box-Whisker Plot der SPR-Datensätze.	43
Abbildung 8: ROC-Kurven aller untersuchten Methoden.....	46
Abbildung 9: ROC-Kurven der Subgruppe der Nephritis-Patienten.....	47
Abbildung 10: Injektionen des Kalibrators dsDNA-mAB32	48

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus Erythematodes

1.1.1 Einführung

Der Systemische Lupus Erythematodes ist eine vielschichtige und schwer zu fassende systemisch-chronische Autoimmunerkrankung, die nahezu jedes Organ des menschlichen Körpers schädigen kann und sich als Kollagenose in den Formenkreis der rheumatischen Erkrankungen einordnen lässt. Falls wichtige Organe angegriffen werden und es beispielsweise zur Entwicklung einer sogenannten Lupus-Nephritis kommt, kann die Krankheit letal enden (D`Cruz et al. 2007, Kotzin 1996). Die klinischen Symptome variieren dabei erheblich und erschweren eine korrekte und frühe Diagnose. Da therapeutische Interventionen in einem frühen Krankheitsstadium am wirksamsten sind, gibt es ein großes Interesse an einer frühzeitigen Diagnose. Daher beinhalten die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) neben vielen klinischen Symptomen auch serologische Tests, wie zum Beispiel den Nachweis von antinukleären Antikörpern und Antikörpern gegen native DNA in „abnormen Titern“ (Hochberg 1997, Tan et al. 1982). Letztere sind oft schon einige Jahre vor Ausbruch klinischer Symptome vorhanden (Arbuckle et al. 2003, Shmerling 2003) und deshalb von hoher diagnostischer und therapeutischer Bedeutung (Heinlen et al. 2007).

1.1.2 Definition und Systematik

Definitionsgemäß ist der Lupus Erythematodes als Systemerkrankung der Haut und des Gefäßbindegewebes mit Vaskulitis und Perivaskulitis kleiner Arterien und Arteriolen zu verstehen, die zudem Ablagerungen diverser Immunkomplexe bestehend aus Fibrin, Komplement, DNA oder Anti-DNA-Antikörper aufweist (Herold et al. 2008). Der Ausdruck Lupus, lateinisch für Wolf, tauchte erstmals im 16. Jahrhundert

auf. Die mangels geeigneter Therapie damals noch häufiger vorkommenden typischen kutanen Läsionen und Verstümmelungen im Gesicht verglichen Ärzte der damaligen Zeit mit Biss- und Kratzspuren eines Wolfes (Potter, 1993). Die dermatologischen Erscheinungsformen der Erkrankung Lupus wurden 1851 vom französischen Dermatologen Alphèe Cazenave mit dem Zusatz erythematodes ergänzt (Cazenave 1851). Die Bezeichnung stammt aus dem Griechischen Wort ἐρυθμα (erythema) und bedeutet „Röte“. 21 Jahre später stellte der ungarische Arzt Moritz Kaposi bei Lupus-Patienten erstmals eine Verbindung zu gehäuft auftretenden Organschäden her und zeigte hiermit, dass die Erkrankung nicht wie zuvor vermutet immer ein rein dermatologisches Leiden darstellt, sondern auch systemische Auswirkungen haben kann (Kaposi 1872).

In Abhängigkeit der unterschiedlichen Ausprägungen der Hautbeteiligung und des Organbefalls kann man Lupus Erythematodes weiter einteilen. Der Übersichtlichkeit wegen sollen hier aber nur die drei wesentlichen Verlaufsformen ohne weitere Unterklassifizierung Erwähnung finden (Herold et al. 2008, Reuter et al. 2004).

- Kutaner / Chronisch diskoider Lupus Erythematodes (CLE) / (CDLE):
Meist lediglich Hautbefall mit in aller Regel günstiger Prognose.
- Subakut kutaner Lupus Erythematodes (SCLE):
Diese Variante nimmt hinsichtlich der klinischen Ausprägung und Prognose eine Mittelstellung ein, charakterisiert durch Hautsymptomatik bei hoher Fotosensibilität und leichter Organbeteiligung. Eine Nierenbeteiligung ist bei dieser noch als mild einzustufenden Verlaufsform jedoch äußerst selten.
- Systemischer Lupus Erythematodes (SLE):
Ausgeprägte Beteiligung innerer Organe mit infauster Prognose. Die Lebenserwartung ist unter anderem durch die renalen Manifestationen limitiert.

1.1.3 Epidemiologie

Der SLE weist erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf, Frauen in gebärfähigem Alter erkranken durchschnittlich neun bis zehn Mal so häufig wie Männer (Fessel 1974, Herold et al 2008). Obwohl die Erkrankung prinzipiell in allen Altersgruppen in Erscheinung treten kann, gibt es bei Frauen ein Hauptmanifestationsalter, das allerdings in der Literatur unterschiedlich angegeben wird. Dies lässt sich laut Hettenkofer (1998) vorwiegend im Zeitraum des 25. und 35. Lj. einordnen. Die Inzidenz wird mit 10 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen/Jahr angegeben, die Prävalenz beträgt etwa 1/2000 (Herold et al. 2008), wobei einige ethnische Gruppen generell ein höheres Erkrankungsrisiko aufweisen. So sind Menschen asiatischer, hispano- und afroamerikanischer Herkunft im Vergleich zur kaukasischen Bevölkerung etwa drei bis viermal häufiger betroffen (Alacron et al. 1998a, Alacron et al. 1998b, D`Cruz et al 2007, Manzi 2001).

1.1.4 Klinische Manifestation

Die Komplexität von SLE wird durch dessen multisystemischen Charakter deutlich, da im Gegensatz zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus Typ I oder Morbus Basedow so grundlegende Funktionen im Organismus gestört sind, dass zahlreiche Organsysteme direkt betroffen sein können. Der Schweregrad der Ausprägung ist dabei ebenso wie der Verlauf sehr unterschiedlich und extrem variabel (Kotzin 1996). Die Vielzahl an klinischen Manifestationen und potentiellen Krankheitsverläufen ist so breit gefächert, dass hier im Einzelnen nicht auf alle Symptome eingegangen werden kann und deshalb in Tab. 1 (modifiziert nach Hahn 2005) nur ein kurzer Überblick über die in absteigender Häufigkeit betroffenen Organsysteme mit den häufigsten Ausprägungen gegeben werden soll. Unspezifische Allgemeinbeschwerden, Arthritis und dermatologische Erscheinungsformen sind meist zuerst präsent und vom Patienten wahrgenommene Symptome (Heinlen et al. 2007).

Von entscheidender Bedeutung sind jedoch die Beteiligungen der Nieren, des Zentralnervensystems und des Gefäßendothels, da Schädigungen in diesen Organen die Morbidität und Mortalität maßgeblich beeinflussen (Ardoin et al. 2008).

Tabelle 1: Auswahl an häufigen klinischen Manifestationen bei SLE-Patienten

Betroffenes Organsystem	Gesamtanteil in %	Klinische Ausprägung
Allgemein	95	Müdigkeit, Leistungsminderung, Fieber, Gewichtsverlust
Bewegungsapparat	95	Arthralgien/Myalgien Polyarthritits
<u>Haut</u>	80	Fotosensibilität „Schmetterlingserythem“
Blutsystem	85	Anämie Leuko/Lymphozytopenie
Nervensystem	60	Kognitive Dysfunktion Psychosen
Herz/Lunge:	60	Pleuritis/Perikarditis Myokarditis/Endokarditis
<u>Niere</u>	30-50	Nephrotisches Syndrom Niereninsuffizienz „Lupus-Nephritis“
Magen/Darm/Leber	40	Übelkeit, Diarrhoe Erhöhte Leberenzyme
Thrombosen	15	Venös Arteriell
Augen	15	Sicca-Syndrom Konjunktivitis/Episkleritis

Etwas genauer soll im Folgenden jedoch auf zwei für SLE typische Ausprägungen eingegangen werden.

Das „Schmetterlingserythem“, das zwar auch bei der Autoimmunerkrankung Morbus Basedow vorkommt, ist für SLE das wohl bekannteste optisch sichtbare Symptom, das mit dieser Erkrankung zumeist als erstes assoziiert wird. Dabei handelt es sich um eine symmetrische Gesichtsrötung, die typischerweise mit leichter Tendenz zur Schuppung auf Wangen und Nase, unter Aussparung der Nasolabialfalten, und vereinzelt auch auf der Stirn auftritt und an die Form eines Schmetterlings erinnert. Diese charakteristische Hautrötung mit leichter Hautschwellung manifestiert sich häufig nach Sonnenexposition und führt in vielen Fällen erstmalig zur Verdachtsdiagnose Lupus, ohne dass zuvor andere spürbare Symptome auftraten. Bei Afro-Amerikanern ist diese typische Symptomatik im Gegensatz zu anderen lupus-assoziierten Hautbeteiligungen deutlich seltener (Heinlen et al. 2007). Der „Schmetterling“ wird ebenso wie der „Wolf“ häufig als Synonym für die Erkrankung Lupus verwendet. Als Symbol und Namensgeber betiteln und kennzeichnen diese beiden Bezeichnungen außerdem verschiedene Fachzeitschriften sowie diverse Webauftritte verschiedener Selbsthilfegemeinschaften.

Neben der fotosensitiven Rötung im Gesicht sind die gefürchteten renalen Komplikationen im Krankheitsverlauf von zentraler Bedeutung. Die sogenannte Lupus-Nephritis (glomeruläre Nephritis) ist ein die Langzeitprognose bestimmender Faktor, der zumeist innerhalb der ersten Jahre der Erkrankung auftritt und mit zunehmendem Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz und Dialysepflicht führt (Hahn et al. 2005). Unbehandelt verläuft die Krankheit, die Ähnlichkeiten zu anderen Mikrovaskulitiden wie z. B. den Autoimmunerkrankungen Wegenersche Granulomatose und Churg-Strauss-Syndrom aufweist, letal. Durch spezifische Entzündungsprozesse werden pathologische Proteinablagerungen in den Glomeruli und Verengungen der renalen Gefäße verursacht. Dadurch wird auch die Filterfunktion der Nieren zunehmend beeinträchtigt und insbesondere die Ausscheidung der harnpflichtigen Substanzen gestört. Weitere durch die renale Dysfunktion ausgelöste Symptome wie Mikrohämaturie, Proteinurie und arterielle Hypertonie bleiben vom Patienten längere Zeit (Masood et al. 2009) unbemerkt und machen die Relevanz einer effizienten und frühzeitigen Labordiagnostik umso deutlicher. Zur eindeutigen Diagnosestellung ist

jedoch neben einfach durchzuführenden Urin- und Serumuntersuchungen eine perkutane Nierenbiopsie indiziert (Masood et al. 2009).

1.1.5 Pathogene Faktoren

Einige Triggerfaktoren, die SLE auslösen, konnten bislang identifiziert werden:

Exogene Faktoren

Zum einen scheinen virale Infektionen wie z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) maßgeblich daran beteiligt zu sein eine Immunreaktion gegen chromatingebundene DNA auslösen zu können (Granholm et al. 1992, Rahman et al. 2008). Daneben werden auch weitere Faktoren wie UV-Licht, Bakterien, Nahrungs- und Genussmittel, Drogen, Stress und Umweltschadstoffe (Schwermetalle, Hormone, Pestizide) vermutet (Miller et al. 2007, Sarzi-Puttini et al. 2005). Gerade die UV-Lichtexposition (vor allem UVB) ist bei einem Großteil der Patienten (10 – 50%) für Exazerbationen verantwortlich (Provost et al. 2001), die zur Apoptose von Keratinozyten führt.

Medikamente

Einige Medikamente wie Antihypertensiva, Antiarrhythmika, Antikonvulsiva oder auch Neuroleptika können einen sog. „drug-induced Lupus“ hervorrufen (Hettnerkofer 1998). Im Vergleich zum idiopathischen SLE beschränken sich die Symptome in der Regel allerdings auf Haut und leichte Formen einer Polyarthritits, Pleuritis und Perikarditis. Beteiligungen der Niere und des ZNS kommen nur selten vor (Herold et al. 2008, Rahman et al. 2008). Obwohl bei dieser Form alle Patienten antinukleäre Antikörper (ANA) aufweisen, finden sich Ak gegen dsDNA nie. Nach Absetzen der Medikamente verbessert sich die Symptomatik meist rasch und hinterlässt nur in seltenen Fällen ernsthafte Folgeschäden (Herold et al. 2008).

Genetische Disposition

Eine erhöhte SLE-Prävalenz ist insbesondere bei Familienmitgliedern sowie Verwandten ersten und zweiten Grades festzustellen (Buckman et al. 1978). Die kombinatorischen Varianten verschiedener Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA-DR 1 – 3), des Komplementsystems (C1q, C2, C4) und auch des Fc γ -

Rezeptors sind vermutlich für die starke genetische Suszeptibilität mitverantwortlich (Braun-Falco 2005, Koene et al. 1998, Rahman et al. 2008, Vyse et al. 1998).

1.1.6 Ätiopathogenese

Die Ätiologie des SLE ist aufgrund ihrer Komplexität auch nach vielen Jahren der Forschung noch nicht vollständig verstanden und weitgehend unbekannt.

Als auslösende Faktoren gelten neben den zuvor erwähnten Triggerfaktoren eine wohl insgesamt **erhöhte Apoptose-Rate**, ein **Defekt in der Phagozytose** von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen (Ardoin et al. 2008, Davidson et al. 2001, Mok/Lau 2003, Munoz et al. 2008), sowie eine **veränderte humorale Antwort** (Herrmann et al. 1998). Als entscheidend für die Produktion pathogener Autoantikörper zählen laut Mok eine gestörte Immuntoleranz in Verbindung mit überschießender T-Lymphozyten-Aktivierung, defekter Unterdrückung von B-Lymphozyten sowie die Verschiebung des Gleichgewichts von T-Helferzellen der Untergruppe Th1 hin zu Th2 (Mok/Lau 2003). Die durch eine Fehlregulation der Apoptose ausgelöste Freisetzung von Antigenen (Maekawa et al. 2001), die als subzelluläre Strukturen auch die Oberfläche der sterbenden Zelle in Form sogenannter „Blebs“ formen (Rahman et al. 2008), führen schließlich zu einer, noch unvollständig geklärten, überschießenden Produktion von Autoantikörpern. Die Autoreaktivität ist unter anderem vermutlich durch somatische Mutationen bedingt. Dies ist jedoch nur eine Hypothese, denn daneben gibt es auch ein anderes Erklärungsmodell, in dem die Autoreaktivität naiver B-Zellen durch polyklonale B-Zell-Aktivierung und damit antigenunabhängig (Zhang et al. 2008a) zur Produktion von Autoantikörpern führen soll.

Diese Autoantikörper sind im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen nicht gezielt gegen organspezifische Antigene, sondern gegen apoptotische Zellkernbestandteile wie dsDNA, Histone, Nukleosomen und Ribonukleoproteine (Tan 1989) gerichtet. Außerdem scheinen sie sogar die Zellmembran durchdringen zu können (Kotzin 1996) und somit durch Anbindung an intrazelluläre Strukturen den Krankheitsprozess zu beeinflussen. Durch akkumulierende apoptotische Zellbestandteile

angeregt, werden besagte Antikörper von aktivierten Plasmazellen (ausdifferenzierten B-Lymphozyten) produziert. Eine gesteigerte Zytokinproduktion der T-Zellen (Interleukine) sowie durch Makrophagen zur Apoptose freigesetztes TNF- α sind als chemotaktisch und immunmodulatorisch wirksame Substanzen vermutlich für die veränderte zelluläre Immunantwort mitverantwortlich. In mehreren Studien wurde ein gewisser, wenn auch kontrovers beurteilter, Zusammenhang zwischen Serumkonzentrationen besagter Signalstoffe und der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten nachgewiesen (Davas et al. 1999, Postal et al. 2011, Rahman et al. 2008, Tokano et al. 1999). Die entstandenen Antigen-Antikörper-Immunkomplexe zirkulieren im gesamten Körperkreislauf und führen durch Ablagerungen in unterschiedlichen Geweben zu lokalen komplementvermittelten Entzündungsreaktionen, die zu Zerstörung und irreversiblen Schäden führen können.

1.1.7 Diagnose

Die Diagnosestellung SLE ist nach wie vor schwierig und häufig ein längerer Prozess, da der Facettenreichtum und die variablen Erscheinungsformen dieser Erkrankung die Grenzen einzelner medizinischer Fachrichtungen sprengen und daher erfahrenen Rheumatologen und spezialisierten Fachärzten vorbehalten bleibt. Vom Auftreten erster Symptome bis zur eigentlichen Diagnose vergehen durchschnittlich 24 Monate (Cervera et al. 1993). Als Hilfestellung für die Diagnostik wurden 1971 von der American Rheumatism Association (ARA) die ersten klinischen Klassifikationskriterien aufgestellt (Cohen et al. 1971). Diese wurden 1982 und zuletzt 1997 überarbeitet, um serologische Tests erweitert und in ACR-Kriterien (American College of Rheumatology) umbenannt (Hochberg 1997, Tan 1982). Diese bis heute gültige Formulierung besteht aus einer Auflistung 11 verschiedener klinischer und immunologischer Merkmale. Wenn zu einem beliebigen Zeitpunkt der Erkrankung mindestens 4 der 11 Kriterien vorliegen, (Tab. 2, modifiziert nach Hochberg 1997, Tan 1982) kann mit hoher Sicherheit (Spezifität ~ 95%, Sensitivität ~75%) die Diagnose SLE gestellt werden (Hahn 2005).

Tabelle 2: Diagnostische Kriterien des American College of Rheumatology (ACR)

Kriterium	Definition
1. Schmetterlingserythem	Symmetrisches, flaches oder erhabenes Erythem der Wangen und des Nasenrückens unter Aussparung der Nasolabialfalten
2. Diskoide Hautveränderungen	Druckschmerzhafte Plaques mit folliculären Hyperkeratosen, Pigmentverschiebungen und Atrophie
3. Fotosensibilität	Hautausschlag als Folge einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenlicht
4. Orale Ulzera	Schmerzlose orale oder nasopharyngeale Geschwüre
5. Arthritis	Nichterosive Arthritis in zwei oder mehreren Gelenken - Steifigkeit, Schwellung oder Gelenkerguss
6. Serositis	a) Pleuritis b) Perikarditis
7. Renale Beteiligung	a) persistierende Proteinurie > 0,5 g/Tag oder > 3+, falls keine Quantifizierung erfolgt, oder b) Erythrozyten-, granuläre, tubuläre oder gemischte Zylinder, Hämoglobinurie
8. ZNS-Beteiligung	a) Krampfanfälle ohne erkennbare Ursache oder b) Psychosen unklarer Genese
9. Hämatologische Störung	a) hämolytische Anämie mit Retikulozytose oder b) Leukopenie < 4000 Leukozyten/ μ l oder c) Lymphopenie < 1500 Lymphozyten/ μ l oder d) Thrombozytopenie < 10000 Thrombozyten/ μ l
10. Immunologische Störung	a) Anti-DNA: Antikörper gegen native dsDNA in abnormem Titer oder b) Autoantikörper gegen das Ribonukleoprotein Sm oder c) Autoantikörper gegen Phospholipide
11. Antinukleäre Antikörper	Abnormer Titer antinukleärer Antikörper

Diese Kriterien sollten von Klinikern aber stets kritisch und jeweils im Kontext zu jedem einzelnen Patienten betrachtet werden. Genauso wie ein NICHT-SLE-Patient mehr als 4 ACR-Kriterien aufweisen kann, gibt es auch Konstellationen, in denen ein an SLE-Erkrankter im Krankheitsverlauf und unter Therapie nur noch 1 oder 2 ACR-Kriterien aufzeigt (Smith et al. 1999). Die Krankheitsaktivität jedes SLE Patienten

kann zusätzlich anhand verschiedener Indices individuell eingestuft und weiter beurteilt werden. In den letzten 25 Jahren wurden zur Objektivierung des Krankheitszustandes mehrere Systeme (Griffiths et al. 2005) eingeführt, die sich mitunter allerdings grundsätzlich unterscheiden. Einige gängige Indices sind:

- British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) index
- European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM)
- Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)
- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)
- Lupus Activity Index (LAI)

Während BILAG insbesondere einzelne Organe beurteilt, werden die anderen Indices als globale Punkte-Systeme zur Messung der Krankheitsaktivität im Hinblick auf den gesamten Organismus eingesetzt. Weitere Unterschiede sind der beobachtete Zeitraum für die Messung der Krankheitsaktivitäten (Griffiths et al. 2005), der von wenigen Tagen bis hin zum gesamten letzten Monat reichen kann, sowie die Erfassung von anti-dsDNA Antikörpern, die beispielsweise nur durch den SLEDAI berücksichtigt werden.

1.2 Autoantikörper gegen dsDNA

Autoantikörper unterschiedlichster Formation mit niedriger Affinität gegen einzelsträngige (ss) oder dsDNA gerichtet, vorwiegend in Form des Isotyps IgM, kommen physiologisch in niedrigen Konzentrationen auch bei gesunden Individuen vor (Davidson/Diamond 2001, Hahn 1998) und scheinen sogar eine protektive Funktion zu erfüllen (Rahmann/Isenberg 2008). Daher sind nur ganz bestimmte Arten von anti-dsDNA Autoantikörpern als echt pathogen einzustufen (Mok/Lau 2003).

Die bei etwa 95% (Mok/Lau 2003) aller Lupus-Patienten vorkommenden antinukleären Antikörper (ANA) sind zwar sehr sensitiv, aber wenig spezifisch für SLE. Genau entgegengesetzt verhält es sich mit Antikörpern gegen doppelsträngige DNA

(anti-dsDNA), die sehr spezifisch für SLE sind. Da sie unter Berücksichtigung des verwendeten Nachweisverfahrens jedoch nur in etwa 50% (Classen 2004) bis höchstens 80% (im aktiven Krankheitsstadium) (Rahman/Isenberg 2008) der untersuchten Patientenseren nachzuweisen sind, sind sie nicht ganz so sensitiv (Classen 2004). Aber sie sind oft schon einige Jahre vor Auftritt klinischer Symptome vorhanden (Arbuckle et al. 2003, Shmerling 2003) und deshalb von hoher diagnostischer und therapeutischer Bedeutung (Heinlen et al. 2007). Antikörper gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA) sind, passend zu ihrer hohen Spezifität für SLE, besonders hilfreich im Bezug darauf, die Diagnose in die richtige Richtung zu lenken (Isenberg 2004). Als antigene Determinanten (Epitope) fungieren Bestandteile des Ribose-Phosphat-Rückrats, Basenpaare oder insbesondere bestimmte Konformationen der DNA Doppelhelix, die physiologisch vorwiegend in der rechtsgängigen B-Form vorliegt (Hahn 1998). Außerdem sind sie auch für Nachbeobachtungen zulässig, da ansteigende Titer von hochaviden Immunglobulinen, insbesondere des Isotyps G, Krankheitsschübe, besonders den Beginn oder die Verschlechterung der gefürchteten Glomerulonephritis vorhersagen können (Ballou/Kushner 1979, Bootsma et al. 1997, Hahn 1998, Hughes et al. 1971, Riboldi et al. 2005, Smeenk et al. 1990b, ter Borg et al. 1990). IgM sowie IgG niedriger Affinität sind dagegen mit dem Krankheitsverlauf weniger gut assoziiert (Bootsma et al. 1996, Rahman/Isenberg 2008). IgM scheint sogar eine negative Korrelation im Hinblick auf eine Glomerulonephritis aufzuweisen (Witte 2008) und vorwiegend mit kutanen Manifestationen assoziiert zu sein (Förger et al. 2004, Witte et al. 1998b). IgA dagegen wird hauptsächlich mit auftretenden Vaskulitiden in Verbindung gebracht (Witte et al. 1998a).

1.3 Anti-dsDNA Laboranalytik

Anti-dsDNA-Bestimmungen sind, wie bereits geschildert, von entscheidender klinischer Relevanz und eignen sich sowohl für eine frühzeitige Diagnostik als auch zur Verlaufskontrolle. In Abhängigkeit des prädominanten Immunglobulin-Isotyps sind oftmals zusätzlich weitere Informationen hinsichtlich des Risikos für bestimmte klinische Manifestationen herauszulesen (Förger et al. 2004).

In der Routinediagnostik kommen zur Detektion von Antikörpern gegen doppelsträngige DNA im Wesentlichen die drei folgenden Analysemethoden zum Einsatz, auf die jeweils kurz etwas näher eingegangen werden soll.

1.3.1 Farr Radioimmunoassay

Der Farr RIA, benannt nach Richard Farr, verwendet mit dem Radioisotop ^{125}I markierte dsDNA aus bakterieller Plasmid-DNA. Diese wird zunächst mit dem Proben Serum und den darin potentiell vorhandenen dsDNA-Antikörpern auf einem Schüttelmixer inkubiert. Die dabei entstehenden Immunkomplexe werden anschließend mit 50% Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präzipitiert. Nach Zentrifugierung sind die im Präzipitat enthaltenden Immunkomplexe durch Messung der Radioaktivität quantifizierbar. Ohne zwischen den Immunglobulinen vom Isotyp IgG und IgM zu unterscheiden (Hahn 1998, Rouquette/Desgruelles 2006), weist der Farr-Assay vorrangig Antikörper mit hoher Avidität gegen dsDNA nach (Isenberg/Smeenck 2002, Isenberg 2004), da es durch die hohe Ionenkonzentration häufig zur Dissoziation von niedrig aviden DNA/anti-DNA Komplexen kommt (Smeenck et al. 1982). Die hohe Spezifität dieses Nachweisverfahrens führt dazu, dass der Farr-Assay bei Klinikern häufig immer noch als „Goldstandard“ (Smeenck et al. 1990a) in der serologischen Diagnostik von SLE angesehen wird. Dabei gelten Anstiege der gemessenen anti-dsDNA Werte häufig als prädiktiv für Exazerbationen (z. B. Lupus-Nephritis) (Rouquette/Desgruelles 2006, ter Borg et al. 1990).

1.3.2 Nichtradioaktive Immunoassays

ELISAs sind durch ihre relative einfache Durchführung die am weitesten verbreiteten Nachweisverfahren in der labormedizinischen Praxis. Dabei basieren die meisten Verfahren auf folgendem Prinzip (Königshoff/Brandenburger 2004):

Auf Mikrotiterplatten ist zumeist rekombinante dsDNA in eukaryontisch oder prokaryontischer Form (Rouquette/Desgruelles 2006) als Antigen in Vertiefungen, sogenannten Kavitäten, bereits vorimmobilisiert. Nach Zugabe des verdünnten Patienten-

serums und entsprechender Inkubationszeit kommt es zur Ag/Ak-Bindung. Anschließend werden alle ungebundenen Serumbestandteile ausgewaschen. Um den gebundenen, humanen – auch primär genannten Ak – nun sichtbar zu machen, wird dem Ag/Ak-Komplex ein sekundärer enzymgebundener Ak zugefügt. Dieser bindet an den F_c Teil des primären humanen AK. Nach einem weiteren Inkubations- und Waschvorgang wird auf die Trägerplatte ein farbloses Substrat zugegeben, das von dem sekundären Ak mit dem kovalent angebindenen Enzym (meist Peroxidase) in einen Farbstoff umgewandelt wird. Dessen optische Dichte kann anschließend mit einem Mikrotiterplatten-Reader erfasst werden. Je intensiver die Farbreaktion, desto höher die Konzentration des primären AKs.

Im Gegensatz zum Farr-RIA, der nicht nach Isotypen trennt, detektieren die meisten ELISAs häufig eine Subklasse, vorwiegend Immunglobuline vom Isotyp G. Je nach Aufbau gibt es aber auch Assays, die neben IgG auch IgA oder IgM oder eine Kombination derer erfassen (Brinkmann et al. 1991, Rouquette/Desgruelles 2006). Neben neuen Systemen, die sich ähnlich wie der Farr durch eine hohe Spezifität auszeichnen, gibt es auch Systeme, die vorwiegend niedrig affine AK nachweisen, was zwar zu einer guten diagnostischen Sensitivität führt, dies allerdings auf Kosten der Spezifität (Brinkmann et al. 1991, Rouquette/Desgruelles 2006, Villalta et al. 2003).

1.3.3 *Crithidia luciliae* indirekte Immunfluoreszenz

Aarden beschrieb 1975 (Aarden et al. 1975) erstmals die Technik der indirekten Immunfluoreszenz zur Bestimmung von anti-dsDNA in Verbindung mit dem Hämoflagellaten *Crithidia luciliae*. Dieser Einzeller besitzt ein einziges großes Mitochondrium, in dem sich nahe der Geißel der sogenannte Kinetoplast befindet, eine Matrix bestehend aus fibrillärer DNA. Zu den einfach kultivierbaren Crithidien, die für Messungen auf Objektträgern bereits vorfixiert sind, werden Patientenserum in unterschiedlicher Verdünnung zugegeben und inkubiert. Gebundene Patienten-Ak werden in einem weiteren Schritt mit Hilfe von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten anti-human Ig-Serum mikroskopisch ausgelesen. Ähnlich wie beim ELISA kann durch die Wahl spezieller Antiseren zwischen den verschiedenen Isotypen

differenziert werden. Dabei überzeugt der CLIF zwar durch ähnlich gute Spezifität wie der Farr RIA, ist aber wie dieser im direkten Vergleich zu ELISAs ebenfalls nur wenig sensitiv (Ballou/Kushner 1979, Smeenk et al. 1990, Smeenk et al. 1982, Wong et al. 1998). Problematisch bei diesem Test ist allerdings der enorm große experimentelle Aufwand und die fehlende Quantifizierbarkeit, da jeweils nur ein Grenztiter bestimmt wird, der die höchste noch als positiv bewertete Verdünnung der einzelnen Probe widerspiegelt. Daraus ergibt sich das nächste Problem, denn die Auswertung des Verfahrens erfordert vom Anwender viel Erfahrung und somit sind die Ergebnisse nutzerabhängig und aufgrund der fehlenden Vergleich- und Objektivierbarkeit häufig unterschiedlich und als subjektiv einzuschätzen.

1.4 Therapie und Prognose

Da es bislang noch keine kausale Therapieoptionen für SLE gibt, wird die Behandlung interdisziplinär organisiert und stadiengerecht unter Berücksichtigung der Krankheitsaktivität und sekundärer Zusatzerkrankungen durchgeführt (Classen 2004). Folgende Ziele sind vorrangig:

- Erhaltung der Organfunktionen
- Schmerzreduktion
- Remission

Bei milden Verlaufsformen ohne viszeralem Befall genügt meist eine Kombination aus Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) in Verbindung mit Hydrochloroquin (Herold et al. 2008) und darüber hinaus Kortikosteroide bei entzündlichen Schüben.

Schwerere Fälle mit Beteiligung lebenswichtiger Organe erfordern dagegen eine aggressivere hochdosierte Kortikosteroid-Stoßtherapie zusammen mit dem Einsatz von Immunsuppressiva (Herold et al. 2008, Hettenkofer 1998). Da etwa 40% aller Patienten zusätzlich von einem sekundären Antiphospholipid-Syndrom (APS) betroffen sind, das zu Thrombembolien führen kann, muss häufig zusätzlich eine orale Antikoagulation erfolgen (Braun-Falco 2005). Ebenso müssen Lebensgewohnheiten (Rauchen, Sonnenexposition, Ernährung) und kardiovaskuläre Begleitsymptome wie Hy-

pertonie und Hyperlipidämie frühzeitig behandelt werden, um die Prognose nachhaltig beeinflussen zu können. Die enorme Schwierigkeit für den Kliniker ist es, in enger Zusammenarbeit mit dem Patienten die richtige Mitte zu finden, um einerseits die Progredienz der Erkrankung möglichst hinauszuzögern und andererseits die Nebenwirkung der Medikation auf ein für den Patienten erträgliches Maß zu reduzieren. Die Lebenserwartung hat in den letzten Jahren auch aufgrund verbesserter Diagnostik und Therapie deutlich zugenommen. So kann man heute davon ausgehen, dass ein adäquat behandelter SLE Patient eine durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate von $\geq 90\%$ (Herold et al. 2008) aufweist. Dennoch hat eine Frau, bei der Lupus im Alter von 20 diagnostiziert wurde, noch ein Risiko von 1:6 im Alter von 35 Jahren an Lupus direkt oder einer mit der Erkrankung assoziierten Infektion zu sterben (Rahman/Isenberg 2008). Häufigste Todesursachen sind neben vereinzelt vorkommenden Infektionen auch kardiovaskuläre Erkrankungen, Urämie sowie neurologische Komplikationen.

1.5 Biosensorik

1.5.1 Grundlagen der Biosensorik

Für Biosensoren gibt es eine ganze Reihe von Definitionen und unterschiedlichen Beschreibungen (IUPAC 1997, Luppä et al. 2001, Sethi 1994), die sich in ihrer Kernaussage jedoch kaum unterscheiden. Bringt man diese in einen Kontext, so kann man Biosensoren ganz allgemein als miniaturisierte Analysensysteme charakterisieren, die biologische Aktivitäten in ein messbares Signal umwandeln und sich zumeist aus folgenden Bestandteilen zusammensetzen:

- einer **biologisch, aktiven Schicht** zur Erkennung und reversiblen Interaktion des Analyten einer Analysenprobe.
- einem sich in unmittelbarer Nähe befindlichen Signalwandler, einem sog. **Transducer**, der die biomolekulare Erkennungsreaktion erfasst und in ein messbares Signal umwandelt.

- einem nachgeschalteten **Prozessor**, der das gemessene Signal empfängt und den Anforderungen des Nutzers entsprechend weiterverarbeitet.

Das Signal, das vom Transducer übertragen wird, ist dabei allerdings ein sekundäres Signal, da es nicht durch den Analyten selbst entsteht, sondern durch dessen Reaktion mit der Biokomponente, die häufig auch als Biorezeptor bezeichnet wird. Sowohl anhand unterschiedlicher Erkennungselemente, die als biologische Komponente fungieren, als auch durch verschiedenartige Transducer lassen sich Biosensoren weiter einteilen und klassifizieren.

Als Erkennungselemente kommen zum Beispiel Enzyme (Clark/Lyons 1962), Rezeptoren (Kriz/Mosbach 1995), Nukleinsäuren (Sawata et al. 1999), Antigen/Antikörper (Brecht et al. 1995) oder ganze Zellen/zelluläre Strukturen zum Einsatz (Vèdrine et al. 2003). Signalwandler kann man hinsichtlich ihres Messverfahrens in elektrochemische (Korpan et al. 2000), optische (Metzger et al. 2007), mikrogravimetrische (Zhang et al. 2008b) und thermometrische (Ramanathan/Danielsson 2001) Transducer-Systeme einteilen. Während die Sensitivität des Messsystems dabei in erster Linie von der Wahl eines geeigneten Transducers abhängt, wird die Spezifität des Biosensors durch die biologische Komponente vorgegeben, da jeweils nur ganz bestimmte Analyten mit dem ausgewählten Biorezeptor interagieren können.

1.6 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Biosensoren

Die Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendeten optischen Biacore X-Biosensors, der mit einem auf dem SPR-Effekt (Surface Plasmon Resonance) basierenden Transducer arbeitet, soll im Folgenden etwas ausführlicher dargelegt werden.

1.6.1. Oberflächenplasmonresonanz

Das Auftreten von Oberflächenplasmonen wurde 1957 erstmals von Ritchie (Ritchie 1957) theoretisch beschrieben. Im Gittermodell bestehen Metalle aus einem Grundgerüst, das sich aus positiv geladenen Atomrümpfen zusammensetzt. Diese werden von frei beweglichen Valenzelektronen umgeben, die ein dichtes Elektronengas bil-

den. Diese freien Elektronen an der Oberfläche sehr dünner Edelmetalle können nun zur kollektiven, longitudinalen Schwingung angeregt werden. Dabei wird das Quant einer solchen Plasmaschwingung als Plasmon bezeichnet. Die Anregung des Leitungselektronengases in Metallen kann durch Licht erreicht werden, auf das die Oberflächenplasmonen sehr empfindlich reagieren.

Das Phänomen der Oberflächenplasmon-Resonanz wurde unter anderem von Kretschmann (Kretschmann 1969) erstmals in einer Messanordnung genutzt. Deren Grundprinzip beruht darauf, dass polarisiertes, monochromatisches Licht unter den Bedingungen der internen Totalreflektion schräg auf ein Prisma trifft, an dessen Unterseite eine dünne Metallschicht aufgetragen ist. Dabei gelangt der Lichtstrahl von einem optisch dichten Medium mit hohem Refraktionsindex (RI) auf die Grenzfläche zu einem optisch „dünnere“ Medium, das einen niedrigeren RI aufweist. Auf der dem Prisma abgewandten Seite der Metallschicht befindet sich ein Dielektrikum. Der Lichtstrahl kann das Metall zwar nicht durchdringen, ruft aber durch die daraus resultierenden und bereits erwähnten Plasmon-Oszillationen eine elektrische Feldintensität, ein Evaneszenzfeld, hervor. Die dabei entstehende und exponentiell abnehmende sogenannte Evaneszenzwelle dringt in das Medium mit geringerem RI ein. Deren Reichweite entspricht der des einfallenden Lichts. Die Evaneszenzwelle an der Grenzfläche von Metall und Dielektrikum bewirkt dabei eine Abschwächung der Intensität des reflektierten Lichtstrahls (attenuated total reflection, ATR), die gemessen werden kann. Der Winkel der Intensitätssenke, auch als Resonanzwinkel bezeichnet, reagiert sehr sensitiv auf eine Brechungsindexveränderung, die an der Grenzschicht Metall und Dielektrikum zustande kommt. Interagieren dort Biomoleküle mit einem immobilisierten Liganden, verändert sich der RI und damit auch der Resonanzwinkel. Dies ermöglicht eine quantifizierbare Erfassung der Massen- und Konzentrationsänderung oder eine kinetische Analyse der stattfindenden Reaktion an der Oberfläche in Echtzeit (Biacore 1998, Jönsson/Malmqvist 1992).

1.6.2. Aufbau des SPR-Biosensor Biacore X

Die Biosensoren von BIACore sind Systeme zur markierungsfreien, biomolekularen Interaktionsanalyse (BIA, Biological Interaction Analysis) unter Nutzung des SPR-Effekts als Detektionsprinzip. Die Messung, die eine Änderung der Massenkonzentration erfasst, erfolgt dabei in Echtzeit. Einen schematischen Aufbau zeigt Abb. 1. Wesentliche Bestandteile sind dabei:

- Prisma
- Lichtquelle zur Erzeugung von monochromatischem, polarisiertem Licht
- Photodetektoreinheit
- Mikrofluidische Einheit
- austauschbare Goldoberflächen im Chipformat, versehen mit einer biologischen Schicht

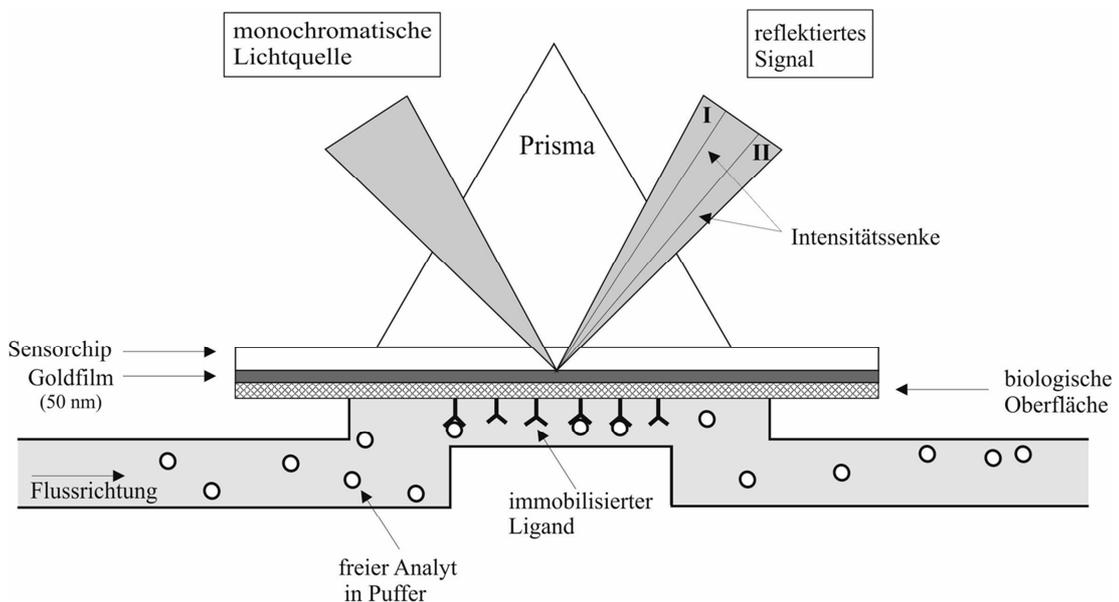


Abbildung 1: SPR-Funktionsprinzip des Biacore X. Bindung freier Analyten an der Sensoroberfläche führt zu einer Verschiebung der Intensitätssenkung des reflektierten Lichts von Position I in Position II.

Der Fragestellung für das Messsystem entsprechend gibt es unterschiedliche Chipoberflächen. Alle bestehen aus einem Plastikträger, in den ein Glasplättchen eingeklebt ist, das auf einer Seite mit einer etwa 50 nm starken Goldschicht bedampft ist. Auf die Goldoberfläche können aufgrund der monoatomar aufgedampften Edelmetallschicht verschiedene Ankermoleküle angekoppelt werden. Am häufigsten kommen mit Carboxymethyldextran beschichtete Goldoberflächen zum Einsatz, die in modifizierter Ausführung auch mit Streptavidin oder Nitrilotriessigsäure vorbehandelt sein können. Nach Einlegen des gewünschten Chips wird dessen Oberseite, die aus unbeschichtetem Glas besteht, an die optische Detektionseinheit angedrückt. Die Detektionseinheit besteht aus einer Lichtquelle (LED) und einem als Detektor funktierenden Diodenarray. Die goldbeschichtete und mit Biomolekülen bestückte Unterseite lässt sich nun gezielt mit Analyt- bzw. Pufferlösungen überspülen. Auf jedem Chip entstehen durch dessen eigene Oberfläche zusammen mit der mikrofluidischen Einheit jeweils vier Flusszellen (flow cells, FC). Davon nutzt der Biacore X jedoch lediglich zwei (FC1 und FC2). Neben der seriellen Ansteuerung beider Flusszellen gibt es auch die Möglichkeit, diese jeweils separat zu nutzen. So kann man diese verschiedenartig beladen und dabei eine Flusszelle (z.B. FC1) als Referenzzelle nutzen, während die andere als eigentliche Messzelle zum Einsatz kommt. Die Mikrofluidik kann über eine Öffnung für Probeninjektionen mit einer Pipette beladen werden und verfügt über eine insgesamt 100 µl fassende Probenschleife. Neben zwei Ausgängen für verbrauchte Lösungen besitzt diese noch einen Eingang für die Pufferlösung. Eine 500-µl-Hamilton-Spritze sorgt für die Aufrechterhaltung eines konstanten Laufpufferflusses. Die Pufferlösung kann mit einem Analyten kontinuierlich über die mit einem Liganden benetzte Goldoberfläche überspült werden.

Kommt es nun zu einer Bindung zwischen immobilisiertem Liganden und Analyt, erfolgt auch eine Zunahme der an der Chipoberfläche anhaftenden Masse und damit eine Änderung des RI an der Grenzfläche Puffer/Gold. Um diese Änderung zu erfassen, wird unter Nutzung des SPR-Effekts ein Lichtstrahl in einer Wellenlänge nahe des Infrarot-Spektrums erzeugt, der in einem Winkel zwischen 66° und 69° auf die Goldoberfläche des Sensorchips auftrifft. Der totalreflektierte Lichtstrahl trifft anschließend auf eine aus mehreren Bildpunktzeilen bestehende Fotodetektoreinheit.

Diese erfasst sehr präzise die Vergrößerung des Resonanzwinkels, bedingt durch eine Intensitätssenke des reflektierten Lichts von Position I auf Position II, wie in Abb. 1. dargestellt. Visualisiert werden die Messungen in einem Sensorgramm, das die Änderung des Resonanzwinkels als Funktion der Zeit in der willkürlich festgelegten Einheit Resonance Unit (RU) grafisch abbildet (Ordinate [RU], Abszisse [Zeit]). Somit können die Interaktionen eines auf dem Goldchip immobilisierten Liganden mit einem Analyten in Echtzeit beobachtet werden. Äquivalent zu einer Positionsverschiebung der Intensitätssenke um $0,1^\circ$ kann man im Sensorgramm eine Anbindung von 1000 RU verfolgen. Das entspricht etwa einer Ligand-Massenzunahme von 1 ng/mm^2 auf der Chipoberfläche (Biacore 1998, Fagerstam et al. 1992, Jönsson/Malmqvist 1992). Des Weiteren ist unter Verwendung einer geeigneten Regenerationslösung eine mehrfache Nutzung der Chipoberfläche möglich. Dabei müssen diese Lösungen für jedes Messsystem individuell optimiert werden, um dabei einerseits den gebundenen Analyten vollständig abzuwaschen und andererseits die Oberfläche möglichst unbeschädigt zu lassen (Andersson et al. 1999).

Abb. 2 zeigt einen typischen Bindungskurvenverlauf des SPR-Biosensors. Die Basislinie bleibt unter Überspülung des Laufpuffers stabil. Wird die Probenlösung injiziert, die spezifische Analyten für die Oberflächenanbindung erhält, ändert sich nach Anbindung der RI an der Grenzfläche zwischen Gold und Puffer mit einem sichtbaren Kurvenanstieg im Sensorgramm. Nach vollständiger Passierung der Liganden entlang der Chipoberfläche werden gebundene Anteile durch erneuten Einsatz des Laufpuffers weggespült und es folgt die Dissoziation, die sich in einem Kurvenabfall darstellt. Nach Verwendung einer geeigneten Regenerationslösung sollte wieder die Basislinie erreicht werden.

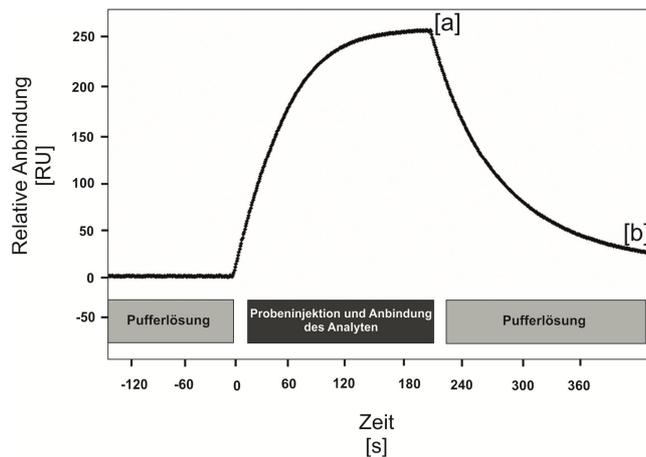


Abbildung 2: SPR-Sensorgramm mit typischem Verlauf. [a], Ende der Injektionsphase; [b], Ende der Dissoziationsphase

1.7 Zielsetzung der Arbeit

- Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, die klinische Wertigkeit eines SPR-Biosensors mit einer bereits etablierten Chip-Oberfläche auf dessen Fähigkeit zur Erfassung der für SLE spezifischen dsDNA Antikörper hin zu beurteilen. Dabei beruht diese Methode auf dem SPR-Prinzip und ermöglicht die markierungsfreie Messung der Interaktion zwischen Antikörpern und einer auf der Oberfläche immobilisierter dsDNA unter homogenen Bedingungen. Es gibt Vorergebnisse bezüglich der Sensoroberfläche von Buhl (Buhl et al. 2007):

DNA auf die Oberfläche zu bringen ist aus mehreren Gründen problematisch:

- 1) DNA sollte im Durchflusssystem aufgetragen werden.
- 2) Standard-Chips sind lediglich mit Carboxymethyldextran beschichtet, die aufgrund ihrer 3-dimensionalen Matrix zwar die Ligandenimmobilisierung verbessern, durch die negative Ladung jedoch starke elektrostatische Abstossung zur Folge haben.
- 3) Die Auswahl an zur Verfügung stehenden organischen, aprotischen Lösungsmitteln ist aufgrund der chemischen Beständigkeit des Biosensors limitiert.

Lösung: Ein Immobilisierungsprozess, der die anspruchsvollen Anforderungen mit zwei verschiedenen Kopplungsschemata erfüllt.

Biotin/Streptavidin für schnelles und effizientes Komplexieren des Liganden auf Streptavidin-beschichteten Chips, gefolgt von einer kovalenten Amin-Kopplung für die endgültige Stabilisierung und feste Oberflächenpräsentation von dsDNA.

Zusätzlich sind aus dem Messsystem Informationen zur Bindungskinetik und Affinität abzulesen.

- Zweitens wurde das neue SPR-Verfahren mit kommerziellen Immunoassays verglichen. Getestet wurden ELISA-Methoden der neuesten Generation (Farrzyme, Bindazyme, EliA) und auch der Farr-RIA.

Als Kriterium zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit wurde für jedes Verfahren die diagnostische Effizienz berechnet.

2 Material und Methodik

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

0,2 µm Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S Filtereinheit von Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)

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

Analysenwaage (Analytic AC 1203, Sartorius AG, Göttingen)

Milli-Q-Plus-Anlage zur Gewinnung von destilliertem Wasser (Millipore, Billerica, USA)

Eppendorf Reaktionsgefäße in den Größen 2 ml, 1,5 ml und 0,2 ml (Eppendorf AG, Hamburg)

Helium aus Gasflasche von SWF (Friedrichshafen, Deutschland)

Mikroliterzentrifuge Mikro 120 (Hettich GmbH Co, Tuttlingen)

Schüttelgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)

Schüttelinkubator (Thermomixer comfort, 535000.011, Eppendorf AG, Hamburg)

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

SPR-Biosensor Biacore X (GE Healthcare, Freiburg)

Vivaclear Zentrifugalfilter (VK01P042, Sartorius, Göttingen)

Alle für die Versuche verwendeten Glaswaren stammten von der Firma Schott (Mainz, Deutschland).

2.2 Chemikalien und Antikörper

Albumin aus bovinem Serum ~99% (BSA, A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Amine Coupling Kit (BR-1000-50, GE Healthcare, Freiburg)

- 0,2 M EDC (N-ethyl-N'-[(dimethylamino)propyl]-carbodiimid hydrochlorid)

- 0,05 M NHS (N-hydroxysuccinimid)
- 1M Ethanolamin-HCl (pH 8,5)

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)

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)

HEPES (H4034, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumchlorid (1.01540.5000, Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxidplätzchen (1.06495.0250, Merck, Darmstadt)

n-Octyl β -D-Glucopyranosid $\geq 99\%$ (39473, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Salzsäure rauchend 37% (1.00317.1000, Merck, Darmstadt)

2.3 Puffer und Lösungen

2 M Hydrochlorid zur pH-Werteinstellung

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

2 M Natriumchlorid zur pH-Werteinstellung

NaOH-Plätzchen	2 M	8 g
Aqua pur.		100 ml

HBS-N (Biosensor Chip-Beladungspuffer)

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

HBS-BO (Biosensor Lauf – und Verdünnungspuffer)

HEPES	10 mM	1,19 g
NaCl	150 mM	4,38 g
BSA	0,1% (w/v)	0,5 g
n-OGP	0,005% (w/v)	0,025 g
Aqua pur.		ad 500 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

Zusätzlich zu den angegebenen Verbrauchsmaterialien wurden die etablierten und bereits vorbereiteten Bestandteile

- modifiziertes, biotinyliertes humanes Transferrin (hTf)
- DNA-Konjugat mit spezifischer bp-Länge (hTf-dsDNA)

gemäß der von Buhl et al. (2007) entwickelten Methodik zur Beladung der Biosensoroberfläche als Antigen eingesetzt. Auf die dafür notwendigen Reagenzien (Buhl et al. 2007) soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

2.4 Patientenseren und Kontrollen

Für die Messungen am Biosensor und den Immunoassays wurde ein Kollektiv aus 50 anonymisierten Serumproben klinisch und serologisch gut charakterisierter SLE-Patienten eingesetzt. Diese stellte Dr. H.-P. Jäkel (Dietrich Bonhoeffer Klinikum, Institut für Labordiagnostik, Neubrandenburg) aus der Serumbank für Autoimmunerkrankungen des Klinikums Neubrandenburg zur Verfügung. Die Seren stammten aus einer Vergleichsstudie verschiedener anti-dsDNA Nachweismethoden (Jäkel et

al. 2006) und waren bereits mit fünf verschiedenen anti-dsDNA Labormethoden gemessen. Alle Patienten erfüllten mindestens 4 der ACR-Diagnose-Kriterien (Hochberg 1997, Tan et al. 1982) und waren positiv auf ANA getestet. Der positive Test für anti-dsDNA im Serum wurde dabei nicht als eines der ACR-Kriterien betrachtet. 22 der 50 SLE Patienten litten an Lupus-Nephritis. Deren Diagnose wurde durch Biopsie und/oder klinisch-chemische Parameter (signifikante Proteinurie: >0,5 g/d, Erythrozyturie und erhöhte Kreatinin-Werte im Serum) geprüft. Zum Zeitpunkt der Probenabnahme stand jedoch noch keiner der Nephritis-Patienten unter Dialyse. Die klinische Symptomatik des SLE-Kollektivs äußerte sich insgesamt in folgender Verteilung und Ausprägung, wie in Tab. 3 angegeben.

Tabelle 3: Prävalenz klinischer Symptome der SLE-Studien-Patienten

Nephritis 44%	Anämie 18%	Raynaud-Symptomatik 12%
Arthritis/Arthralgien 80%	Leukopenie 6%	Serositis 16%
Schmetterlingserythem 12%	Kardiopulmonale Beteiligung 16%	Sek. APS-Syndrom 10%
ZNS-Symptomatik 12%	Hautbeteiligung 40%	Sicca-Syndrom 12%

Die 59 Seren umfassende Kontrollgruppe bestand zum einen aus 20 freiwilligen, gesund erscheinenden Spendern. Diese waren Medizinstudenten bzw. Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie, bei denen auf Basis von medizinischen und klinisch-chemischen Untersuchungen kein Hinweis auf eine akute oder chronische Erkrankung vorlag. Zum anderen aus 39 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen außer SLE und dem damit oftmals assoziierten Antiphospholipidsyndrom. Diese stammten vom Klinikum rechts der Isar und dem Klinikum München. Deren Diagnosen wurden durch erfahrene Kliniker insbesondere auf das Vorhandensein relevanter Autoantikörper geprüft. Es handelte sich bei diesen Proben um left over Material. Die individuell nicht identifizierbaren Serenproben waren 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 September 25, 2006). Cha-

rakteristisch für die Kontrollgruppe mit Autoimmunopathien waren unter anderem das Vorhandensein folgender Antikörper:

- Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
- Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid
- Anti-mitochondriale Antikörper
- Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper
- Antikörper gegen Ribonukleoproteine
- Autoantikörper gegen Gliadin, Transglutaminase und Endomysium

Die demographischen Daten der Patienten und Kontrollen sind in Tab. 4 zusammengefasst. Sämtliche Serenproben wurden zunächst nach Zentrifugation aliquotiert, bei -80°C tiefgefroren und erst unmittelbar vor Verwendung wieder aufgetaut.

Tabelle 4: Merkmale der Patienten und Kontrollen

Untersuchte Gruppe	Untergruppe	n (weiblich/männlich)	Mittleres Alter (Jahre)
SLE		50 (47/3)	41,0 ± 14,3
	Lupus Nephritis	22 (20/2)	36,9 ± 13,1
Kontrollen		59 (39/20)	53,4 ± 12,9
	Morbus Wegener	10 (5/5)	62,0 ± 14,4
	Rheumatoide Arthritis	16 (11/5)	63,8 ± 13,4
	Myasthenia gravis	3 (2/1)	74,0 ± 5,2
	Primäre biliäre Zirrhose/ Autoimmunhepatitis	7 (6/1)	54,7 ± 19,9
	Mischkollagenose	2 (2/0)	85
	Zöliakie	1 (0/1)	55
	Gesunde Probanden	20 (13/7)	36,2 ± 14,0

2.5 Immunoassays zur Detektion von anti-dsDNA

Da bereits Messdaten der 50 SLE-Seren von mehreren Immunoassays vorlagen, musste nur die Kontrollgruppe (39 + 20) mit folgenden vier immunologischen Nachweisverfahren erfasst werden.

2.5.1 Farr-Assay

Verwendet wurde der anti-dsDNA Farr RIA der Firma Trinity Biotech (Bray, Irland). Dieser Assay nutzt radioaktiv markierte dsDNA des Bakteriophagen PM2 (6×10^6 Da) als Antigen, um die spezifischen Antikörper im Serum zu detektieren. Den Angaben des Herstellers entsprechend werden Werte $> 7,0$ IU/ml als indikativ für SLE angesehen.

2.5.2 Bindazyme-Elisa

Der anti-dsDNA Immunoassay von Bindazyme (The Binding Site Ltd, Birmingham, UK) misst IgG-spezifische dsDNA Antikörper. Die Kavitäten sind mit nativer Kalbsthymus dsDNA als Antigen vorbeschichtet.

2.5.3 Farrzyme-Elisa

Der Farrzyme Elisa (The Binding Site Ltd, Birmingham, UK) ist ein selektiv hoch-avidier anti-dsDNA Enzymimmunoassay, ebenfalls für Antikörper der Klasse IgG. Dabei verwendet er wie der Bindazyme-Assay nativen Kalbsthymus als Antigen.

2.5.4 EliA

Der EliA dsDNA (Phadia GmbH, Freiburg) ist ein IgG selektiver anti-dsDNA Enzymimmunoassay, der rekombinante doppelsträngige Plasmid-DNA als Antigen nutzt und mit einem ImmunoCAP 250 Analysegerät gemessen wird.

Alle kommerziellen Assays für die anti-dsDNA Messungen sind auf den früheren, 1988 eingeführten, WHO-Referenzstandard Wo/80 (Feltkamp et al. 1988) kalibriert und wurden entsprechend den Anleitungen der Hersteller benutzt. Die verwendeten Cut-Off Werte der einzelnen Verfahren sind im Ergebnisteil angegeben.

2.6 SPR-Biosensor

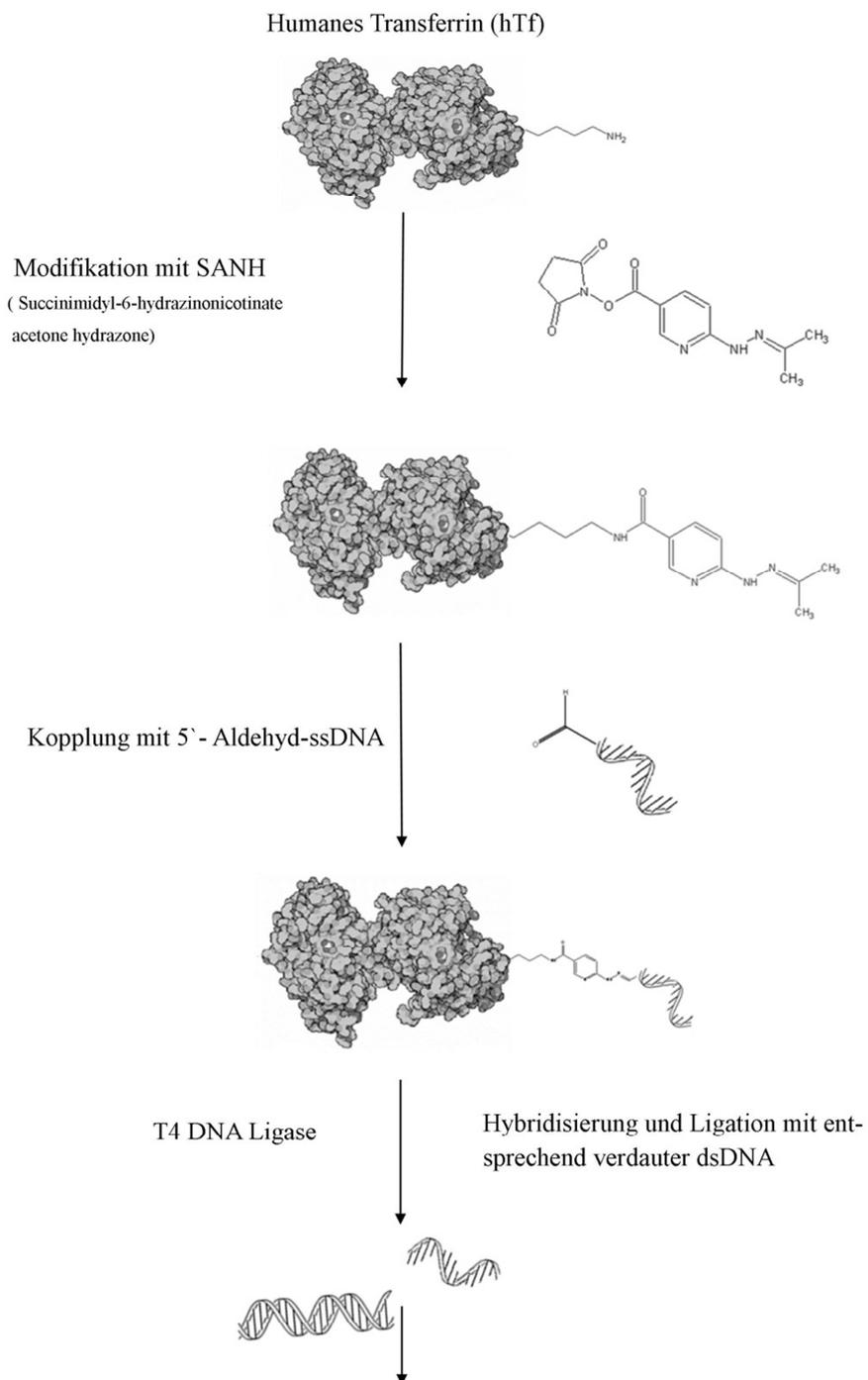
Alle Biosensor-Messungen wurden auf dem Biacore X (GE Healthcare, Freiburg) bei einer konstanten Temperatur von 25° C durchgeführt. Pufferlösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert und anschließend für 10 Minuten mit Helium entgast.

2.6.1 Chipbeladung

Vor Beginn der Messreihen musste zunächst einmal der Sensorchip für den Biosensor mit einem als Antigen dienenden dsDNA-Konstrukt beladen werden. Aufgrund der bereits auf S. 21 genannten Probleme (Buhl et al. 2007) im Einsatz mit den häufig verwendeten Carboxymethyldextran (CMD) beschichteten Goldchips (Sensorchip CM5), wurden für die Messungen nur Sensorchips des Typs SA (GE Healthcare) verwendet. Diese bestehen aus einer CMD-Schicht, an der Streptavidin kovalent präimmobilisiert ist. Für die Beladung wurde die bereits von Buhl et al. (2007) etablierte und sich durch zahlreiche Vorversuche als geeignet erwiesene Methode angewandt. Auf die genaue Herstellung des verwendeten ds-DNA-Protein-Konjugats sei ebenfalls auf (Buhl et al. 2007) verwiesen und das Prinzip daher nur in Kurzform dargestellt:

Ein synthetisches Oligonukleotid wird unter Verwendung der Hydrazin-Aldehyd-Biokonjugation zunächst an biotinyliertes humanes Transferrin gekoppelt. Dieses Gerüst wird anschließend mit dem komplementären Gegenstrang hybridisiert. Nach erfolgter Ligation des rekombinanten humanen dsDNA-Fragments in einer Länge von 233 bp kann das fertige Konstrukt im Durchflusssystem des Biosensors auf die Oberfläche eines SA-Chips immobilisiert werden. Dabei vereint das Immobilisie-

rungsprotokoll von Buhl eine effiziente Biotin/Streptavidin-Bindung mit der guten Stabilität der Aminkopplung. Abb. 3a zeigt den Herstellungsprozess und Abb. 3b den fertigen Chip mit der angebundenen ds-DNA.



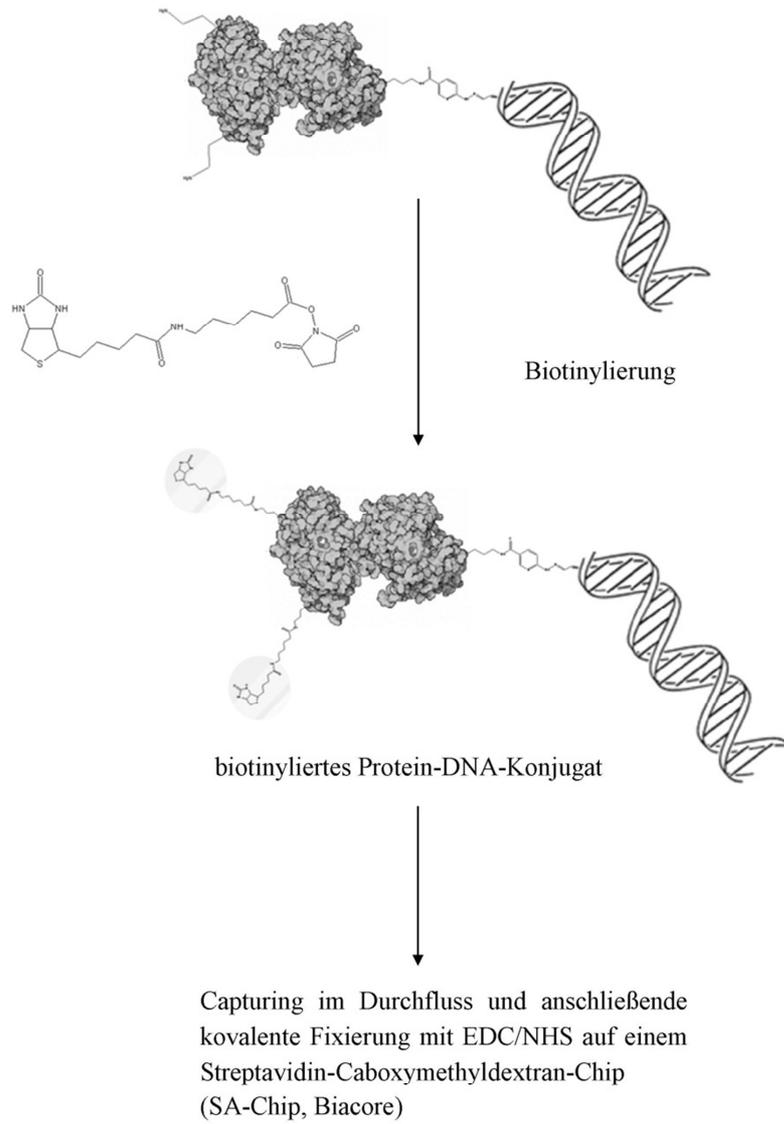


Abbildung 3a: Herstellungsprozess des biotinylierten Protein-DNA-Konjugats

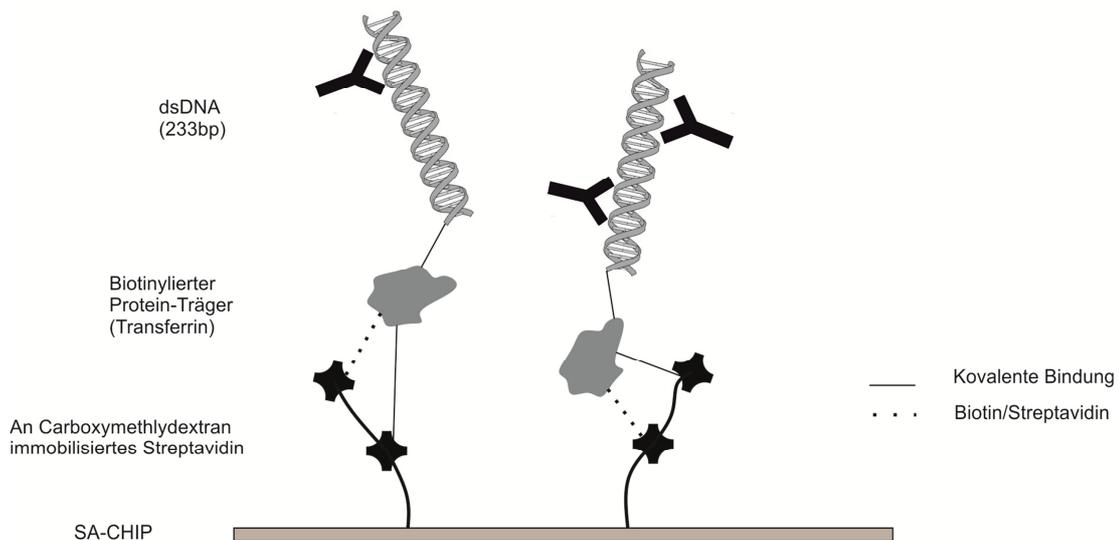


Abbildung 3b: SA-Chip-Oberflächendesign (modifiziert nach Buhl et al. 2009)

Beladungsschema: Zu Beginn wird ein SA-Chip Rohling in den Biosensor eingesetzt, der Beladungspuffer HBS-N, zuvor filtriert und entgast, an das Messsystem angeschlossen und das Sensorgramm gestartet. Die eigentliche Beladung erfolgt in drei Biosensor-Zyklen, wie in Abb. 4 dargestellt.

1.Zyklus: *Konditionierung*

Nach Einstellung der Messtemperatur auf 25° C wird die Chipoberfläche zunächst konditioniert. Dabei wird bei einer Flussrate von 30 µl/min in beide Flusszellen (FC1 und FC2) insgesamt dreimal 30 µl Regenerationslösung (50 mM NaOH/1M NaCl) injiziert mit dem Ziel einer konstant verlaufenden Basislinie.

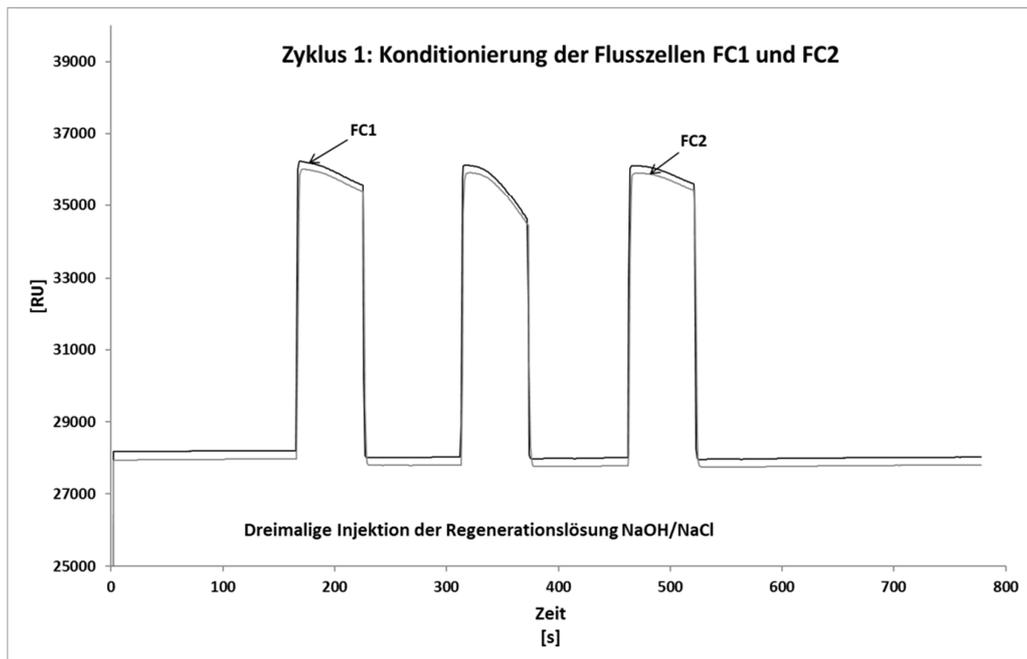
2.Zyklus: *Immobilisierung von hTf-dsDNA auf der Messzelle*

Danach erfolgt die Beladung der Messzelle (FC2) bei einer Flussrate von 2 µl. Der bereits vorhandene DNA-Protein-Konjugatansatz (hTf-dsDNA) wird zunächst im Verhältnis 1:10 mit HBS-N verdünnt und 60 µl davon injiziert. Anschließend wird die Flussrate auf 5 µl erhöht und es erfolgt zur Ligandenkopplung die Injektion von 60 µl einer 1:1 Mischung aus 0,2 M EDC und 0,05 M NHS bei einer nachfolgenden Dissoziationszeit von 120 s (120 s Delay). Delay ist dabei die Zeit, in der das System

bei kontinuierlicher Flussrate der Pufferlösung einen Gleichgewichtszustand erreicht. Dadurch werden N-Hydroxysuccinimid-Ester auf der Oberfläche aufgebracht und die Carboxymethylgruppen der Dextranoberfläche des SA-Chips aktiviert. Die Carboxylfunktionen können nun mit Aminen aus hTf reagieren. Alle nicht abreagierten NHS-Ester werden schließlich durch eine weitere Injektion von 35 μ l Ethanolamin-HCl (pH 8,5) entfernt.

3.Zyklus: *Immobilisierung von hTf auf der Referenzzelle*

Im letzten Zyklus erfolgt die Beladung der Referenzzelle (FC1) mit der Applizierung von biotinyliertem hTf, 1:100 in HBS-N verdünnt, bei einer Flussrate von 5 μ l. Die Injektion erfolgt allerdings manuell und wird nach kurzem, schnellem Anstieg des SPR-Signals [RU] abgebrochen. Das weitere Prozedere erfolgt, den letzten beiden Schritten des zweiten Zyklus entsprechend, zunächst wieder mit der Injektion von 60 μ l einer 1:1 Mischung aus 0,2 M EDC und 0,05 M NHS und einer abschließenden Applizierung von 35 μ l Ethanolamin-HCl (pH 8,5).



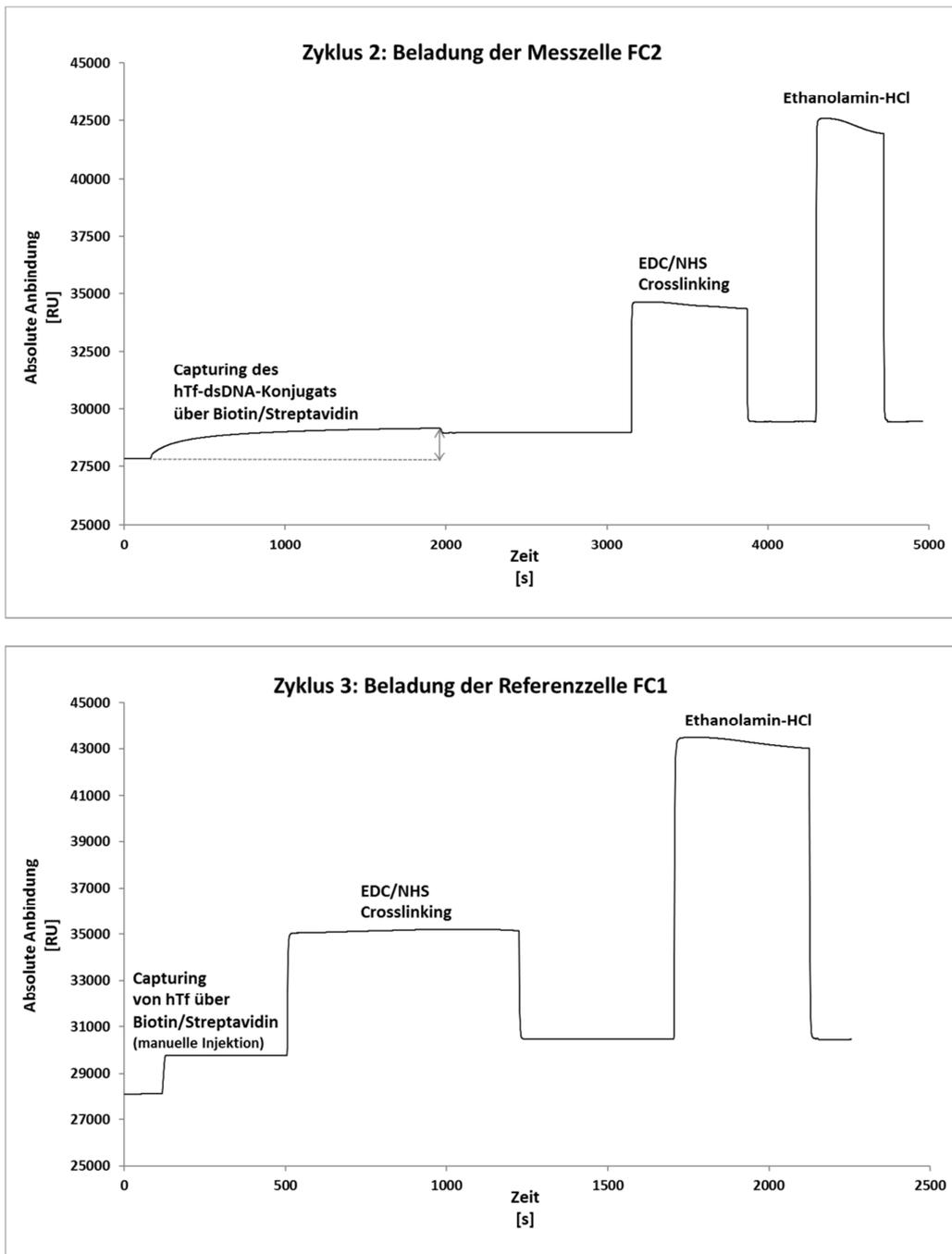


Abbildung 4: Die drei Schritte des SA-Chip-Beladungsschemas im SPR-Biosensorgramm.

2.6.2 Einsatz eines anti-dsDNA Kalibrators zur Quantifizierung der Biosensorergebnisse

Zur Durchführung der Messungen wurden mehrere Chips verwendet. Da die erhaltenen Anbindungswerte im Sensorgramm jeweils in [RU] angegeben werden, musste eine gewisse Kalibrierung eingeführt werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Dazu wurde der monoklonale Antikörper dsDNA-mAB-32 (DIARECT AG, Freiburg) (Buhl et al. 2009) verwendet. Entsprechend den Herstellungsangaben weist dieser eine Aktivität von $1,4 \times 10^5$ IU/ml bei einer Proteinkonzentration von 0,43 g/l auf. Der Antikörper wurde nun in definierten Abständen, jeweils vor fünf Seruminjektionen, injiziert. Nach jeweils fünf dann vermessenen Seren wurde die relative Anbindung am Ende der Injektionsphase in RU abgelesen und als Anteil der Anbindung des Antikörperkalibrators berechnet. Durch die vorgegebene Aktivitätsangabe von dsDNA-mAB32 konnten nun die Reaktivitäten der Seren in IU/ml ausgedrückt werden.

2.6.3 Biosensormessungen der SLE- und Kontroll-Seren

Als Laufpuffer wurde HBS-BO, zuvor mit Helium entgast und durch $0,2 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert, verwendet und die kontinuierliche Flussrate auf $30 \mu\text{l}$ gestellt. Zu Beginn wurde die Oberfläche zunächst durch dreifache Injektion der Regenerationslösung 50 mM NaOH/1M NaCl konditioniert und der Chip somit für die ersten Messungen vorbereitet. Die Serenproben wurden vor den Messungen jeweils 1:100 mit HBS-BO verdünnt. $90 \mu\text{l}$ der vorverdünnten Seren wurden anschließend injiziert mit einem nachfolgenden Delay von 300 s. Dies ist eine 300 Sekunden dauernde Periode nach Ende der Injektion, um die Dissoziation der Immunkomplexe zu beobachten. Als eigentlicher Wert diente aber nur der RU Wert nach vollständiger Injektion der $90 \mu\text{l}$. Danach wurde die Biosensor-Oberfläche zur Regeneration (Abspaltung der zurückgebliebenen Immunkomplexe) für eine Minute mit der Regenerationslösung 50 mM NaOH/1M NaCl gespült, sodass das Signal wieder die Basislinie erreichte. Die Messung des als Kalibrator eingesetzten Antikörpers dsDNA-mAB32 in einer

Verdünnung von 1:200 in HBS-BO erfolgte jeweils nach dem selben Schema. Die Gesamtdauer für eine einzelne Messung betrug ungefähr 12 - 15 Minuten.

2.6.4 Isotypspezifische Abreicherung von Immunglobulinen aus Serum

Da Immunglobulinisotyp-abgereicherte Seren für die anschliessende Messung am Biosensor gedacht sind, wurden alle Abreicherungsschritte mit HBS-BO durchgeführt. Für die Messungen wurden allerdings vorwiegend Seren verwendet, die im Biosensor eine relativ hohe Anbindung [RU] zeigten.

Die drei eingesetzten anti-human-Ig-Agarose-Gele werden vor ihrer Benutzung zunächst mehrmals gründlich mit dem relevanten Laufpuffer gewaschen. Anschliessend werden 18 µl Serum mit 582 µl HBS-BO vermischt und auf fünf Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Der übriggebliebene Rest wird verworfen.

Entsprechend dem folgenden Schema werden nun zu den fünf Aliquots die drei gut homogenisierten Antiisotyp-Agarose-Slurrys dazupipetiert:

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

Darauf werden die Proben für 60 Minuten bei 25° C unter kräftigem Schütteln inkubiert und anschließend durch Filtration mit Vivaclear-Zentrifugalfiltern von Agarosegel befreit. Das resultierende Volumen muss nun mit dem Laufpuffer HBS-BO auf exakt 300µl aufgefüllt werden.

Das Messschema am Biosensor entspricht den herkömmlichen Messungen mit 30 µl Flussrate, einem Injektionsvolumen von 90 µl mit 300s Delay und der Abspaltung durch 30 µl Regenerationslösung 50 mM NaOH/1 M NaCl.

2.7 Auswertung der Daten

Alle angegebenen Mittelwerte sind als arithmetisches Mittel zu verstehen, zu denen vereinzelt auch die Standardabweichungen bzw. die Variationskoeffizienten angegeben sind. Deren Werte wurden mit der Tabellenkalkulation Windows-Excel 2003 der Firma Microsoft (Redmond, WA, USA) berechnet. Alle weiteren Berechnungen und statistischen Darstellungen (ROC-Plots, Box-and-Whisker-Plots, Korrelationskoeffizienten nach Spearman usw.) erfolgten mit Hilfe des Add-in-Makros Analyse-it 1.61 (Analyse-it Software, Leeds, UK), SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, Illinois) und GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Für das Fitting, die Auswertung und Anpassung der Biacore Sensorgramme, kam die Software BIAevaluation 3.2 RC1 (GE Healthcare, Freiburg) zum Einsatz.

3 Ergebnisse

Es wurden mit dem SPR-Biosensor die Sensorgramme von 50 SLE-Patienten den Ergebnissen von 39 Patienten mit anderen Autoimmunopathien und 20 Gesunden gegenübergestellt.

3.1 Auswertung der SPR-Sensorgramme

Die Biosensor-Signale wurden als Funktion der Zeit dargestellt, ausgedrückt in der Einheit [RU] pro 0,90 μ l (90 μ l Injektionsvolumen, 1:100 verdünnt). In Abb. 5 werden exemplarisch einige Kurvenverläufe auf SA-Chip 1 dargestellt. Ausgewertet und bearbeitet wurden die Sensorgramme, die sich aus der Differenz der beiden Flusszellen ergaben (Messzelle FC2 – Referenzzelle FC1). Dadurch wurden zusätzliche unspezifische Signale, die durch unterschiedliche Brechungsindices von Laufpuffer und Probenlösung auf der Oberfläche entstanden, eliminiert. Als Messwerte für die Antikörper-Interaktionen und anschließenden Berechnungen wurden diejenigen RU-Werte gewählt, die jeweils nach vollständiger Seruminjektion ausgehend von der Basislinie die maximale Anbindung am Ende der Assoziationsphase aufzeigten (R_{Max}). Dieses Anbindungsmaximum war zugleich der Umschlagspunkt [a] zwischen Assoziations- und Dissoziationsphase im Sensorgramm. Alle anderen Versuche, eine Kombination mit einer weiteren Variablen, die auch das Dissoziationsverhalten der anti-dsDNA (RU Wert nach 300s Dissoziation [b]; zum Beispiel $[a-b]/[b]$) miteinbezogen, verbesserten die Ergebnisse dabei jedoch nicht. Mit der bereits dargelegten Assay-Kalibration wurden die RU Werte aller gemessenen Seren (SLE und Kontrollen) mit Hilfe der dsDNA-mAB32-Spezifikationen in die jeweiligen IU/ml Konzentrationen umgerechnet.

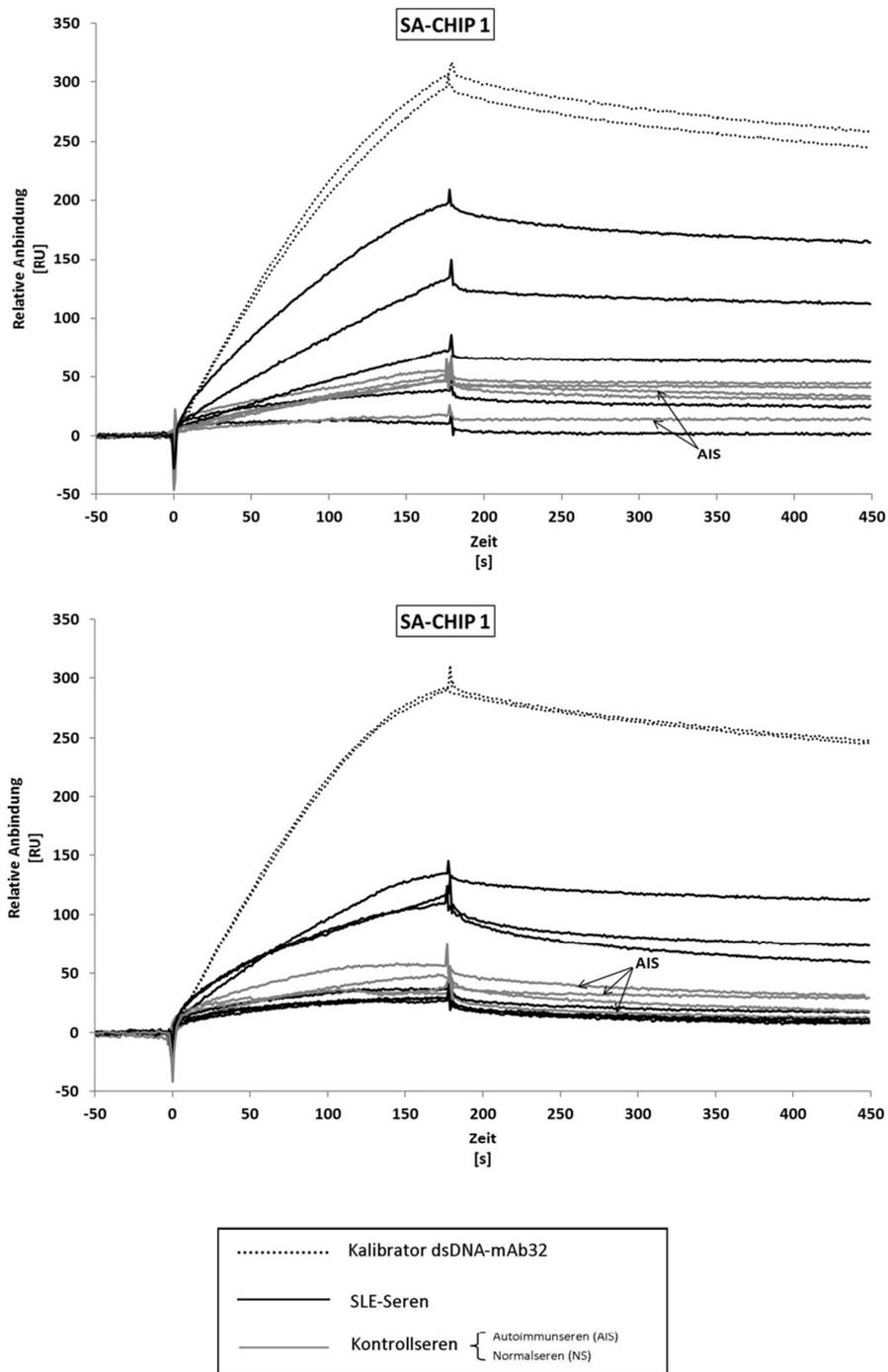


Abbildung 5: Beide Sensorgramme zeigen jeweils 10 Seren-Messungen mit den dazugehörigen und für die Auswertung erforderlichen Kalibratorinjektionen.

3.1.1 Ak-Isotypbestimmung einzelner Seren

Bei der SPR-Spektroskopie kommt die Änderung des Resonanzwinkels letztlich durch eine Abweichung des Brechungsindex im dielektrischen Medium zustande, wenn Masse an der Oberfläche des Biosensors bindet. Im Sensorgramm ist jedoch keine Information über die genaue Eigenschaft des Isotyps des anti-dsDNA Antikörpers ersichtlich. Daher wurden einzelne Seren, vorzugsweise solche mit hoher relativer Anbindung, mit Hilfe einer isotypspezifischen anti-human-Ig-Agarose gezielt von den Immunglobulinfraktionen befreit, um anschließend die verbleibenden Anbindungswerte der Seren zu untersuchen. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die beobachtete Anbindung durch Immunglobuline und nicht durch unspezifische und nicht genau zuzuordnende Effekte zustande kommt. Die sich daraus ergebenden Sensorgramme stellen sich jeweils mit folgenden 5 Bindungskurven dar (siehe Abb. 7):

Positivkontrolle: von allen drei relevanten Isotypen IgG, IgM und IgA befreit — sehr geringe Anbindung.

Negativkontrolle: ohne Agarose — deutlicher Anbindung.

Übrige 3 Kurven: jeweils von zwei Antikörperfraktionen befreit — die Kurven mit nur noch einem Isotyp liegen zwischen den Extremwerten der Positiv- und Negativkontrolle.

Bei 7 der insgesamt 10 untersuchten SLE-Seren zeigte sich eine deutliche Dominanz des IgG-Isotyps. Für zwei Seren war die Dominanz eines einzigen Isotyps nicht ganz klar ersichtlich (Kombination aus IgG/IgM). Lediglich bei einer Probe waren Antikörper des Isotyps IgM nachweisbar. Dieses Serum war insofern interessant, weil es von den anderen 4 Liganden-Assays als SLE-negativ eingestuft wurde. Nennenswerte IgA-anti-dsDNA konnte in keinem der zehn getesteten Seren identifiziert werden. Exemplarisch sind in Abb. 6 zwei solcher Isootypverteilungen von zwei verschiedenen Seren, die auf unterschiedlichen Chips gemessen wurden, dargestellt.

Das Serum 1, gemessen auf SA-Chip 1 wurde nur im SPR-Biosensor als hochpositiv eingestuft und wies als einziges unter den Getesteten eine Prädominanz des Immunglobulins IgM auf. Die auf SA-Chip 5 analysierte Probe (Serum 2) mit dominierendem IgG war in allen Assays positiv.

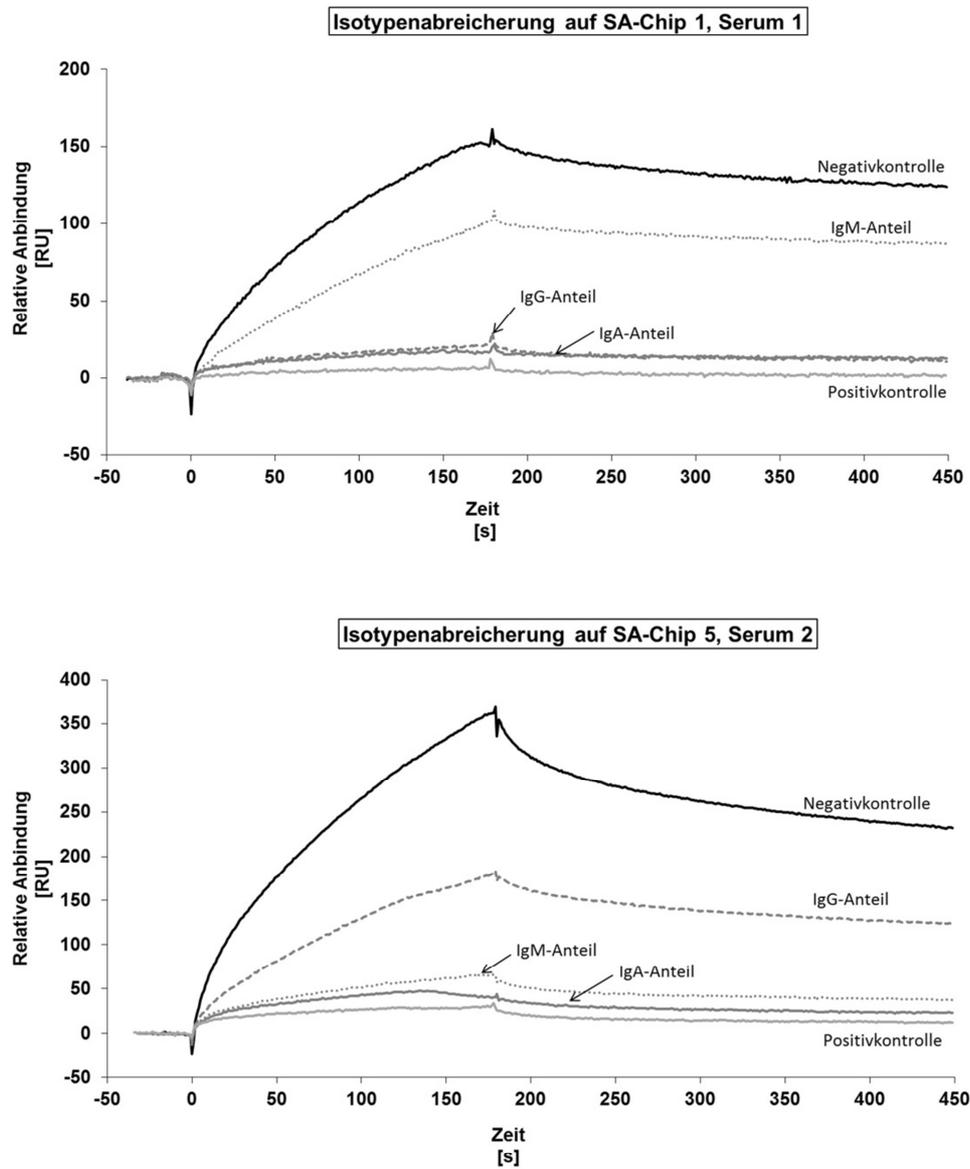


Abbildung 6: Isotypenspezifische Abreicherung zwei verschiedener Seren. Deutlich erkennbar sind die jeweils unterschiedlichen prädominanten Immunglobulinfraktionen.

3.2 Vergleichende Datenanalyse aller 5 anti-dsDNA-Bestimmungsmethoden

Die vier verwendeten anti-dsDNA-Liganden-Assays hatten jeweils individuell unterschiedliche Mess-Bereiche und detektierten die SLE-Seren verschiedenartig, obwohl sie alle gegen den selben WHO Standard Wo80 standardisiert sind. Die SPR-Methodik beruht auf einer anderen Technik und die quantifizierbaren RU-Ergebnisse der R_{Max} -Werte können nicht mit den quantitativen Resultaten der Liganden-Assays verglichen werden. Die SPR-Signale konnten allerdings mit Hilfe des Kalibrators dsDNA-mAB32 in IU/ml umgerechnet werden. Tab. 5 stellt die unterschiedlichen Datensätze dar und zeigt zudem die vorgegebenen diagnostischen Cut-Off-Werte für alle verschiedenen Methoden, außer für das SPR-Verfahren. Nach Angaben des Herstellers gibt es bei Bindazyme allerdings eine „Grauzone“ für positive Seren im Bereich zwischen 30-75 IU/ml. In der Auswertung wurde der Cut-off jedoch zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit auf 30 IU/ml festgelegt. Bei allen verwendeten Assays konnten keine entscheidenden Unterschiede in den Wertebereichen zwischen den gesunden Kontrollen (n=20) und den Kontrollpatienten mit Autoimmunopathien außer SLE (n=39) beobachtet werden. Daher wurden beide Untergruppen in eine gemeinsame Kontrollgruppe zusammengefasst. Wie am Beispiel für die Ergebnisse am SPR-Biosensor zu sehen, liegen jeweils etwa 75% der Messwerte der Autoimmunseren (AIS) und Normalseren (NS) im unteren Quartil der SLE-Werte-Verteilung (Abb. 7).

Tabelle 5: Ergebnisse der anti-dsDNA-Datensätze der verwendeten Methoden

Methode (Einheit)	Cut-off*	Ergebnisse für SLE Patienten	Ergebnisse für Kontrollen
		(n=50; MW \pm SD)	(n=59; MW \pm SD)
SPR (IU/ml)		147,1 \pm 107,4	63,7 \pm 23,0
Farr (IU/ml)	7,0	14,6 \pm 24,4	2,4 \pm 1,7
Bindazyme (IU/ml)	30,0	146,0 \pm 184,1	11,6 \pm 4,7
Farrzyme (IU/ml)	30,0	49,9 \pm 98,1	6,7 \pm 3,4
EliA (IU/ml)	10,0	66,6 \pm 127,3	3,8 \pm 11,4

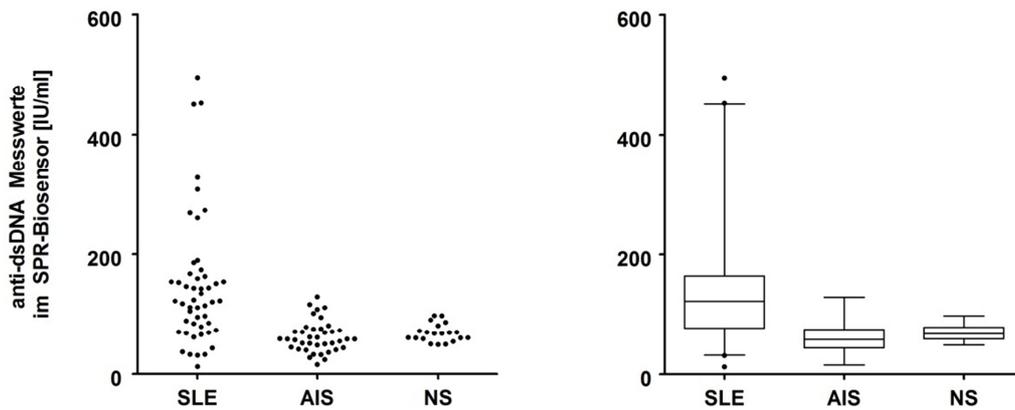


Abbildung 7: Dot-Plot und Box-Whisker Plot aller im SPR-Biosensor gemessenen SLE- und Kontrollseren (AIS + NS), umgerechnet in IU/ml mit Hilfe der Kalibrators dsDNA-mAB32.

3.3 Methodenvergleich

Für die vier Ligandenassays und das SPR-Biosensor-Verfahren wurden lediglich die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) berechnet, die einerseits sehr robust gegenüber Ausreißern sind und andererseits keine lineare Beziehung zwischen den Variablen voraussetzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Alle r_s Werte sind signifikant auf einem Level von 0,01 (zweiseitiger t-Test; $p < 0,01$). Die höchsten r_s Werte weisen der Vergleich Bindazyme-EliA und der Vergleich SPR-Bindazyme auf. Die niedrigste Korrelation zeigt SPR verglichen mit dem Farrzyme.

Tabelle 6: Rangkorrelationskoeffizienten aller 5 Methoden

	Bindazyme	Farrzyme	Farr	EliA	SPR
Bindazyme	—	0,51	0,61	0,71	0,67
Farrzyme		—	0,48	0,47	0,38
Farr			—	0,56	0,59
EliA				—	0,55
SPR					—

3.4 ROC-Analysen und Bestimmung der diagnostischen Effizienz

Für die Evaluierung der Diskriminationseigenschaften der untersuchten Testsysteme zur Detektion von SLE-Patienten diente die Receiver-Operating-Characteristics (ROC) Analyse. Mithilfe dieses Verfahrens kann die Fähigkeit eines Tests zwischen zwei Krankheitszuständen zu unterscheiden, analysiert und visualisiert werden: es bestehen die Optionen: Krankheit vorhanden (richtig positiv, TP) oder Krankheit nicht vorhanden (richtig negativ, TN). Die Entscheidung zwischen diesen beiden Zuständen erfolgt mittels des Cut-off-Wertes. Die Ergebnisse können allerdings auch falsch negativ (FN) oder falsch positiv (FP) ausfallen. Aus diesen vier Möglichkeiten lassen sich nun Sensitivität (Anteil der richtig gemessenen positiven Proben) und Spezifität (Anteil der richtig negativ gemessenen Kontrollen) wie folgt berechnen:

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

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

Die Darstellung erfolgt dabei in einem Diagramm mit der Sensitivität als Ordinate, der Differenz aus 1-Spezifität als Abszisse und der graphischen Auftragung sämtlicher Sensitivität/Spezifitäts-Paare gegeneinander für die möglichen Grenzwerte. Die Trennschärfe eines Tests ist umso besser, je größer der Abstand der ROC-Kurve zur Diagonalen ist. Die Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the curve, AUC) ist ein Maß für die Güte des Tests und beträgt im Idealfall 1, im schlechtesten Fall 0,5.

Um den jeweils optimalen Cut-Off-Wert zu erhalten, wurde zusätzlich der Youden Index (YI) eingesetzt, der ein Maß zur Beurteilung der Güte eines diagnostischen Tests darstellt. Der YI lässt sich innerhalb der ROC-Analysedaten wie folgt berechnen:

$$\text{Youden Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$$

Der jeweilige Cut-Off wurde beim höchsten YI (höchster theoretischer Wert, der am nächsten bei +1 liegt) ermittelt.

Als statistisches Kriterium wurde außerdem die Diagnostische Effizienz (DE) jeder Testmethode wie folgt berechnet:

$$\text{Diagnostische Effizienz} = DE = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

In der ersten ROC Analyse wurde der gesamte Datensatz der 50 SLE Patienten und 59 Kontrollen mit eingeschlossen. Um die Genauigkeit für die Diagnose SLE sicherzustellen, wurden die DE-Werte jeder Methode berechnet. Dabei zeigten alle Nachweisverfahren DE-Werte, die höher als 0,5 sind. Der höchste Wert wurde bei BINDAZYME und dem EliA-Assay gefunden, SPR folgte als dritter (Tab. 7). Alle erstellten ROC-Kurven (A, Bindazyme; B, EliA, C, SPR; D, Farr; E, Farrzyme) sind in Abb. 8 und 9 dargestellt. Der AUC-Wert des Farr RIA ist besser als der des Farrzyme Elis, auch wenn sich die DE-Werte dieser zwei Assays umgekehrt verhalten. Eine Gegenüberstellung der Subgruppe der Nephritis-Patienten (n=22) zum Kontroll-Kollektiv zeigt eine Verbesserung der AUC-Werte bei allen Nachweisverfahren.

Tabelle 7: AUC und DE-Werte aller Testmethoden, AUC-Werte der 22 Nephritis Patienten

ROC Kurven	Bindazyme	EliA	SPR	Farrzyme	Farr
AUC (alle SLE Patienten)	0,885	0,886	0,820	0,645	0,770
AUC (Nephritis Patienten)	0,979	0,945	0,928	0,879	0,886
Youden (max) Cut-off (IU/ml)	18,6	6,4	110,5	11,1	2,4
DE (alle SLE Patienten)	0,88	0,86	0,80	0,77	0,70

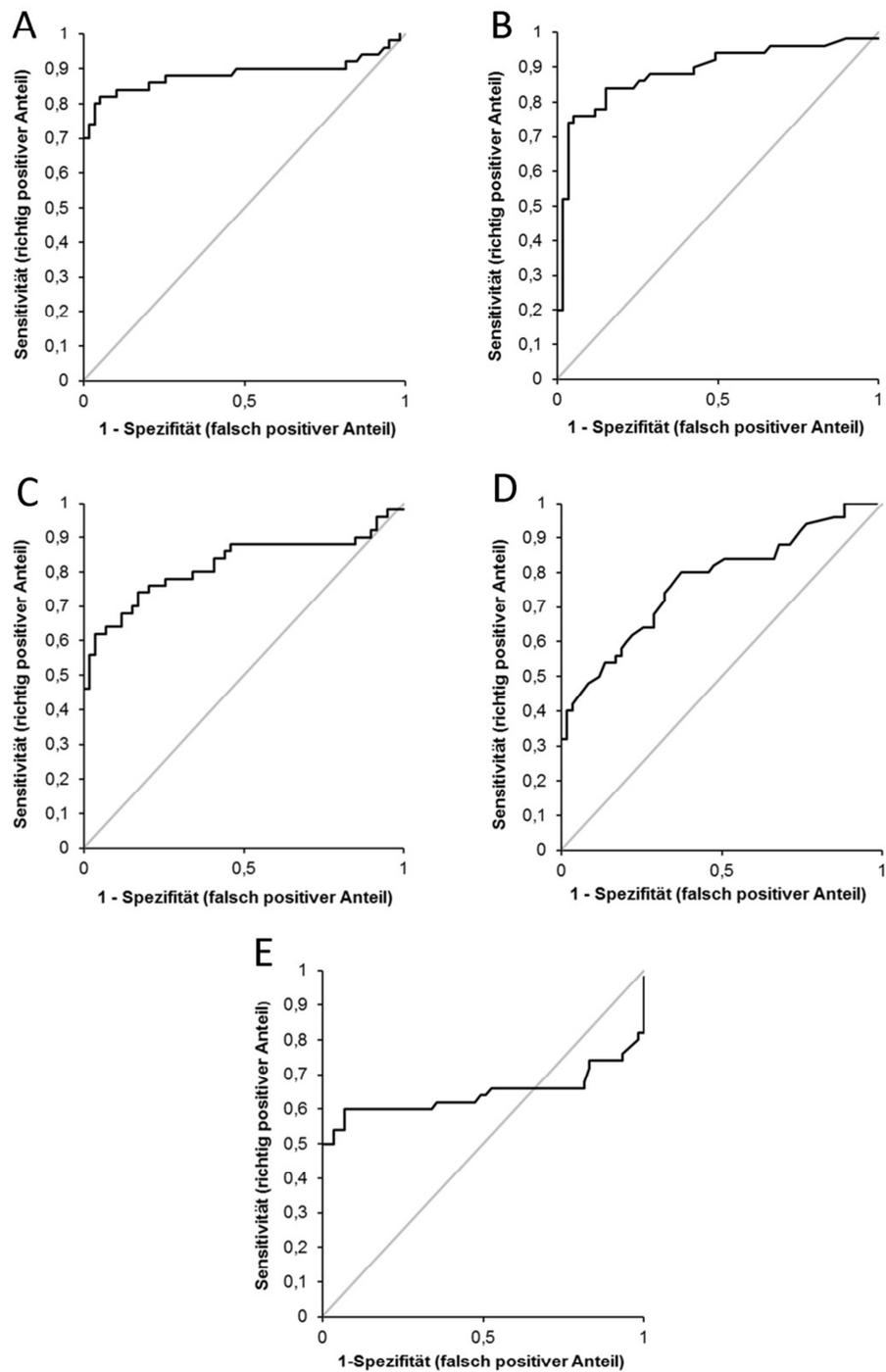


Abbildung 8: ROC-Kurven aller untersuchten Methoden. A, Bindazyme; B, EliA, C, SPR; D Farr; E, Farrzyme

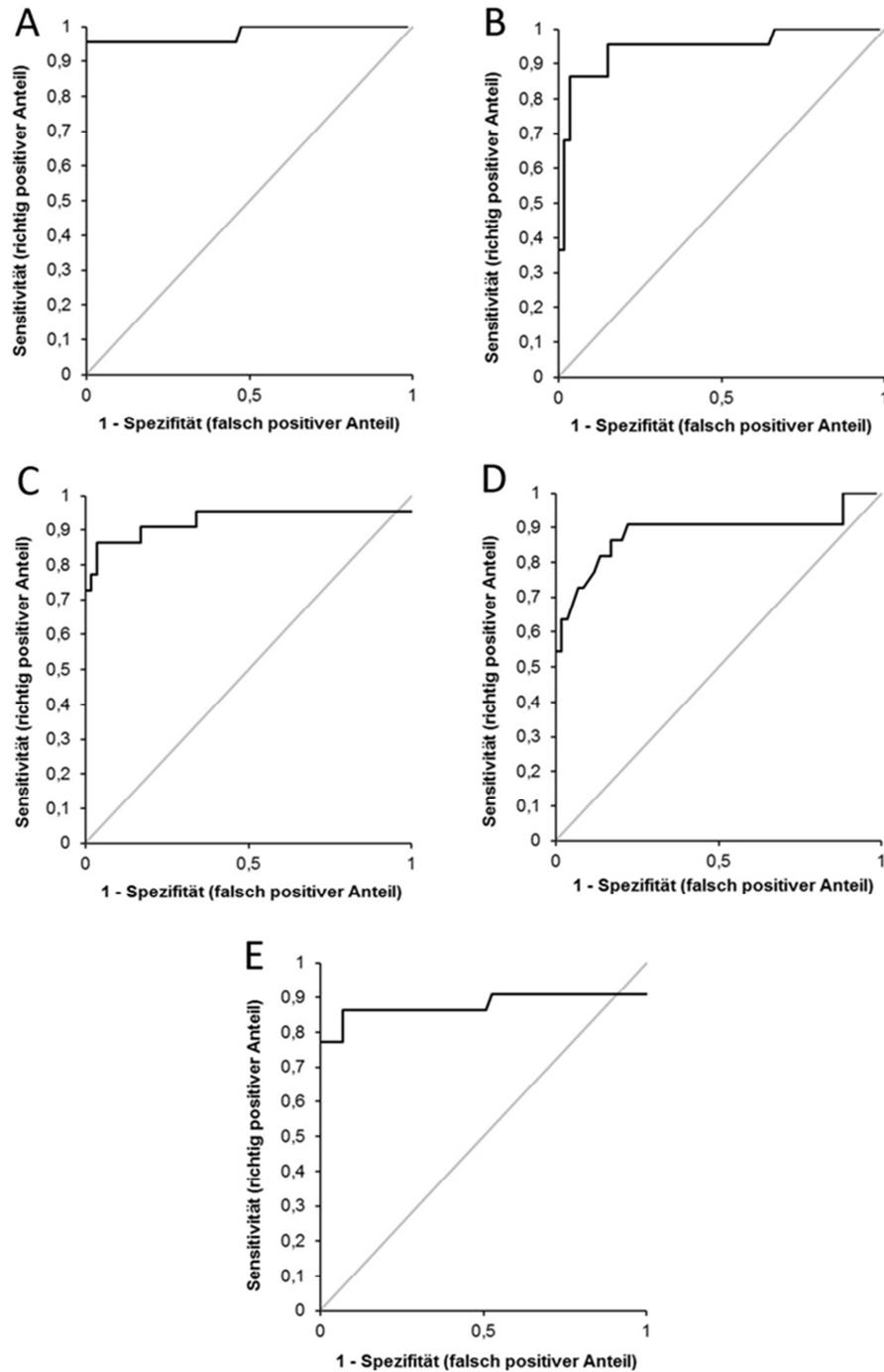


Abbildung 9: ROC-Kurven der Subgruppe der Nephritis-Patienten. A, Bindazyme; B, EliA; C, SPR; D, Farr; E, Farrzyme

3.6 Repetitive Messungen des Kalibrators

Für die Messungen am Biosensor kamen insgesamt 5 SA-Chips zum Einsatz. Durch den regelmäßigen Einsatz des humanen monoklonalen Antikörpers dsDNA-mAB32 innerhalb der einzelnen Messzyklen konnten die Chips zusätzlich auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft werden. Abb. 10 zeigt die in RU angegebenen relativen Anbindungen des Kalibrators dsDNA-mAB32 (Diarect AG, Freiburg). Stichprobenartig wurden einige Injektionen mit dem Antikörper dsDNA-mAB33 (Diarect AG, Freiburg) getätigt. Dieser besitzt allerdings eine tendenziell höhere Affinität gegen Einzel-

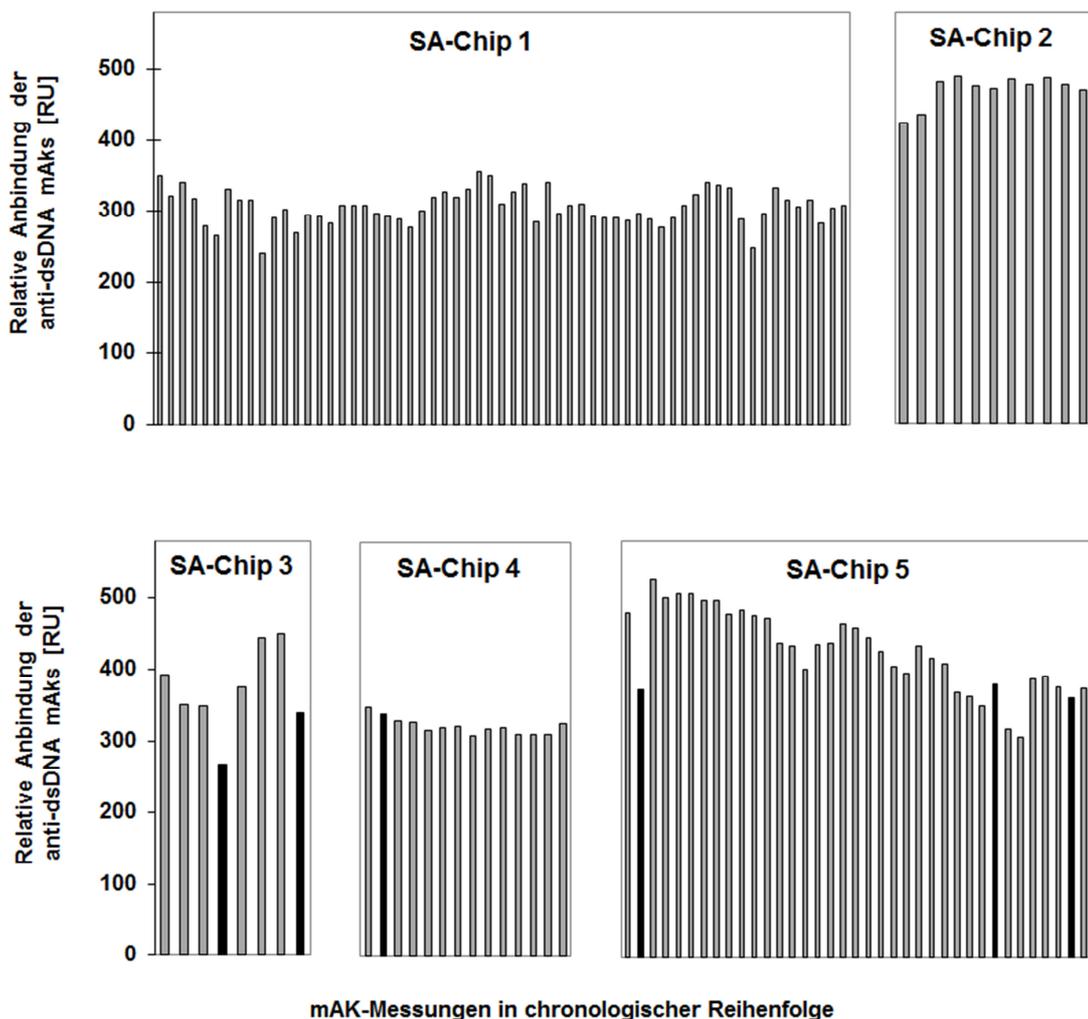


Abbildung 10: Injektionen von dsDNA-mAB32 (hellgrau) und dsDNA-mAB33 (schwarz) auf den Biosensor SA-Chips 1-5

Stränge und keine echte Doppelstrangspezifität (Buhl et al. 2009).

Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der dsDNA-mAB32-Injektionen auf den einzelnen Chips zeigt Tab. 8. Wie zu sehen, erfolgte die Großzahl der Messungen auf dem ersten Chip, der im Vergleich zu den folgenden die niedrigste Antigenbeladungsdichte bei einem Mittelwert von 305,6 RU aufwies. Die unterschiedlichen RU-Werte wurden jedoch immer mit der gleichen Menge des Kalibrators dsDNA-mAB32 bei einer Verdünnung von 1:200 erzeugt, nämlich 2,15 ng/ μ l. Betrachtet man die Absolutmenge bei der Applizierung von jeweils 90 μ l Injektionsvolumen, entspricht das 193,5 ng des Antikörpers. Mit der vom Hersteller angegebenen Deklaration von $1,4 \times 10^5$ IU/ml konnten die RU-Werte am SPR-Biosensor anschließend so in IU/ml umgerechnet werden.

Tabelle 8: Anbindungswerte des Kalibrators dsDNA-mAB32

	Mittelwert [RU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Chip 1 (n = 61)	305,6	23,9	7,8 %
Chip 2 (n = 11)	470,4	21,3	4,5 %
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 %

4 Diskussion

4.1 Anti-dsDNA bei SLE und assoziierter Lupus Nephritis

Ein Charakteristikum bei SLE Autoantikörpern ist die Eigenschaft, sich gegen körpereigene nukleäre Bestandteile (Mills 1994) zu richten. Einige von ihnen sind klinisch und diagnostisch relevant, andere dagegen krankheitsbegleitend. Im Speziellen spielen Autoantikörper gegen dsDNA und daneben auch Nucleosomen (Förger et al. 2004, Heidenreich et al. 2009, Rahman/Hiepe 2002) eine entscheidende Rolle. Hinsichtlich der Entwicklung einer Lupus-Nephritis gibt es Einigkeit darüber, dass diese zwei Antikörper pathogene Faktoren darstellen und möglicherweise eine Nephritis auslösen können. Dennoch sind nicht alle anti-dsDNA Ak an der Entwicklung dieser Komplikation involviert (Rekvig et al. 2003). Es gibt unterschiedliche Hypothesen über die Eigenschaften, die einen anti-dsDNA nephrotoxisch machen (Mortensen/Rekvig 2009). Besonders schlüssig scheint das Affinitäts-Reifungs-Model zu sein. Antigen-Stimuli von kurzer Dauer resultieren zunächst in niedrig aviden anti-dsDNA Ak, welche sich in einigen Fällen lediglich als vorübergehende Begleiterscheinungen präsentieren. Hochavide Ak resultieren dagegen gewöhnlich aus einer ununterbrochenen Stimulation durch immunogene nukleäre Substrate (dsDNA, Nucleosomen) und könnten eine starke pathogene Auswirkung haben (Haugbro et al. 2004, Moens 2001, Rekvig et al. 2004). Trotz anhaltend hoher Konzentrationen niedrig aviden anti-dsDNA entwickeln einige SLE Patienten allerdings niemals hochavide Ak.

Die eigentliche renale Gewebeschädigung resultiert dabei zum einen durch direkte Bindung an die glomeruläre Basalmembran, beispielsweise über Heparansulfat oder durch zirkulierende Immunkomplexe, bestehend aus Antikörpern gegen Nucleosomen (vorwiegend gegen die Histon-Dimere H2A-H2B, die ein Subnucleosomenkomplex darstellen (Burlingame et al. 1994) und dsDNA (Förger et al. 2004). Insbesondere hochaffine Immunglobuline des Isotyps IgG und deren Subtypen werden dabei als ursächlich für die Entwicklung und Exazerbation einer Lupus-Nephritis

gesehen (Ballou/Kushner 1979, Bruns et al. 2000, Förger et al. 2004, ter Borg 1990). Eine besondere Rolle nehmen IgM-anti-dsDNA ein, die neben SLE auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis oder Autoimmunhepatitiden beobachtet werden können (Witte 2008). Somit erscheint auch das in dieser Arbeit verwendete Kontrollkollektiv als geeignet, da 23 der darin enthaltenen Patientenseren ebenfalls diesen beiden letzteren Erkrankungen zugeordnet waren.

Die Fähigkeit von IgM als Pentamer mit insgesamt zehn Bindungsstellen eine größere Anzahl an zirkulierenden Antigenen zu binden, spielt in der Pathogenese des SLE vermutlich auch eine Rolle. Diese Immunglobuline, die an dsDNA binden, verhindern möglicherweise über kompetitive Hemmung die Bildung von pathogenen Immunkomplexen (IgG und dsDNA) (Witte 2008) und ermöglichen außerdem die schnellere Beseitigung von Zelltrümmern.

Eine höhere Konzentration an IgM, sowie ein verzögerter oder möglicherweise nicht erfolgender Klassenwechsel von IgM zu IgG, könnten sogar als Schutz vor einer Lupus-Nephritis angesehen werden (Förger et al. 2004, Rahman/Isenberg 2008, Witte 2008). In einer Studie von Förger mit 202 SLE-Patienten (Förger et al. 2004) konnte gezeigt werden, dass ein IgG/IgM Verhältnis $> 0,8$ signifikant mit renaler Beteiligung korreliert und somit als prognostischer Marker für Nephritis-assoziierte Fragestellungen im Krankheitsverlauf verwendet werden kann.

4.1.1 Weitere Marker

Die Zahl an verschiedenen pathogenen Antikörpern und dazugehörigen spezifischen Antigenen, die mit SLE insgesamt, aber im speziellen mit der Lupus-Nephritis vergesellschaftet sind, ist groß und auch noch nicht vollständig erfasst. Das pathogene Potential der Antikörper hängt vermutlich aber nicht nur von der reinen Affinität und Avidität oder der Spezifität für nukleäre Strukturen ab, sondern an einer Vielzahl bisher ungeklärter Qualitäten, da bei einigen SLE Patienten (~5%) mit und ohne Nierenbeteiligung bislang keine Auto-Ak erfasst werden können. Im aktiven Krankheitsstadium sind Antikörper jedoch bei nahezu 100% der untersuchten Patienten nachweisbar (DGKL, 2012).

Neben Nukleosomen und dsDNA spielt auch α -Actinin als Antigen eine Rolle im Mechanismus zur Entstehung einer Nephritis (Rahman/Isenberg 2008). Dieses Protein hat vermutlich strukturelle Ähnlichkeiten zum Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA Doppelhelix (Mostoslavsky et al. 2001) und führt zu Kreuzreaktivitäten mit vorhandenen anti-dsDNA Antikörpern. Antikörper gegen antigene Substanzen wie C1q (Jäkel et al. 2006), Ro und Sm sind ebenfalls wichtige Marker bei einer Nierenbeteiligung. Letztgenannte sind jedoch häufig erst nach einer bereits längeren renalen Manifestation, vermutlich ausgelöst durch verstärkte Zellapoptose im entzündeten Nierengewebe, nachzuweisen. Dennoch ist die Suche nach diesen Antikörpern bei nephrogenen Fragestellungen durchaus sinnvoll (Rahman/Isenberg 2008), auch wenn die Prävalenz im Vergleich der zu Nukleosomen und dsDNA insgesamt niedriger ist.

4.2 Interpretation des Vergleichs der fünf anti-dsDNA- Methoden

4.2.1 Rangkorrelationskoeffizienten

In dieser Arbeit wurden die Leistungsmerkmale von fünf verschiedenen Methoden zur Bestimmung von anti-dsDNA in Seren von SLE Patienten verglichen. Zu diesem Zweck wurden klar definierte Patienten- und Kontrollgruppen ausgewählt.

Das in der Klinischen Chemie häufig verwendete lineare Regressionsverfahren von PASSING & BABLOK (Passing/Bablok 1983) kam ebenso wie die Darstellungsmethode der Ergebnisse in einem Bland-Altman-Diagramm nicht zum Einsatz. Grund dafür ist die fehlende Standardisierung der Mess-Methoden zur Bestimmung von anti-dsDNA, die als Voraussetzung zum Anwenden dieser Methodenvergleiche gewährleistet sein sollte. Daher wurden nur die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Betrachtet man nun Tab. 6, ist es etwas überraschend, dass die Rangkorrelationskoeffizienten für den Vergleich der fünf Methoden trotzdem alle signifikant waren ($r_s = 0,38 - 0,71$; two-tailed t test $p < 0,01$). Die Korrelationen sind als „mäßig“ bis „deutlich“ einzustufen. Der höchste r_s -Wert ergab sich zwischen EliA und Bindazyme, die in dieser Arbeit insgesamt die besten Ergebnisse lieferten.

Allerdings kann eine Scheinkorrelation zwischen diesen beiden Verfahren, ebenso wie für alle anderen Konstellationen, unter singulärer Verwendung nur des Spearman-Korrelationskoeffizienten, nicht völlig ausgeschlossen werden.

4.2.2 Diagnostische Effizienz und ROC-Analyse

Für die Auswertung wurde neben den ROC-Analysen und den daraus abzulesenden AUC-Werten auch die jeweilige diagnostische Effizienz der verschiedenen Verfahren berechnet (Wasmuth et al. 2002). Die DE wird zur Beurteilung der Test-Validität verwendet, da sie als deskriptiver Faktor die diagnostischen Testmethoden bewerten kann. Man muss jedoch berücksichtigen, dass die DE im Gegensatz zu AUC der ROC-Kurven stark von der Prävalenz der jeweiligen Krankheit abhängig ist und damit nicht als alleiniger Wert für die Güte eines Tests verwendet werden, sondern immer unter sorgfältiger Berücksichtigung von Sensitivität und Spezifität gesehen werden sollte.

Die ROC-Analysen für die vier Immuno-Assays und dem SPR-Biosensor zeigen, dass die AUC-Werte und die DE für alle fünf Methoden als zufriedenstellend eingestuft werden können. Drei Methoden hatten DE-Werte $\geq 0,8$ (Bindazyme, EliA und SPR), zwei wiesen DE Werte $< 0,8$ (Farrzyme und Farr RIA) auf. Hinsichtlich der AUC-Werte für alle SLE Patienten sowie speziell nur für die Nephritis-Untergruppe lieferten Bindazyme, EliA und SPR die besten Werte. Der AUC-Wert von 0,82 bei der SPR-Methode für alle SLE-Patienten (50 + 59) hat dabei jedoch nicht die Bedeutung, dass ein positives Resultat mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,82 auftritt, oder ein positives Ergebnis in 82% der Fälle mit Krankheit einhergeht. Er gibt lediglich an, dass ein zufällig ausgewähltes Individuum der SLE-Gruppe in 82% der Fälle einen höheren Labor-Test-Wert aufweist als ein zufällig ausgewähltes Individuum der Kontrollgruppe (Hanley/McNeil 1982, Hanley/McNeil 1983, Zweig/Campbell 1993). Die diagnostische Effizienz einer Methode steht und fällt allerdings mit der Auswahl und Anzahl des Patientengutes bei den Methoden zum Nachweis von anti-dsDNA. Besonders die Sensitivität variiert in Abhängigkeit vom Assay sehr stark. Die in dieser Studie untersuchten 50 SLE Patienten-Seren waren schon Bestandteil einer um-

fangreicheren Studie mit einem größeren SLE-Kollektiv (n=100) (Jäkel et al. 2006), in der unterschiedliche anti-dsDNA Assays unter der Berücksichtigung der jeweiligen Sensitivität und Spezifität für SLE verglichen wurde. Alle SLE-Patienten erfüllten mindestens vier der ACR-Kriterien. Das Kollektiv bestand dabei sowohl aus Individuen mit aktivem als auch inaktivem Krankheitsstadium oder waren bereits unter Immunsuppressionstherapie. Mit nur der Hälfte der SLE-Patienten, die aus dieser größeren Studie von Jäkel stammten und mit einem anderen Kollektiv, das als Kontrollgruppe fungierte, ergaben sich in dieser Arbeit dennoch weitgehend ähnliche Ergebnisse. Die bei Jäkel veröffentlichten AUC-Daten für EliA (0,841), Farrzyme (0,705) und Farr (0,78) können als analog zu den hier vorgestellten Daten gewertet werden. Das „schlechtere“ Abschneiden des Farrzyme und Farr hinsichtlich der DE und des AUC-Werte darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Leistungsfähigkeit dieser beiden Verfahren besonders in ihrer hohen Spezifität zu sehen ist, dies allerdings auf Kosten der Sensitivität. Etwas anders verhält es sich mit dem Bindazyme-Assay, der sich durch eine sehr gute Sensitivität mit einer etwas schlechteren Spezifität auszeichnet. Mit einem AUC-Wert von 0,76 wurde bei diesem Assay im Vergleich zu dieser Arbeit die größte Diskrepanz festgestellt. In einer aktuellen Arbeit von Heidenreich (2005) erwies sich allerdings auch der Bindazyme insbesondere für die Unterscheidung zwischen Lupus-Nephritiden und anderen Formen der Glomerulonephritis als geeignet und das bei sehr guter Sensitivität (87%) und Spezifität (90%) bei Verwendung des niedrigen Cut-Offs von 30 IU/ml.

Abschließend lieferte der Bindazyme und der EliA-Assay also die besten Ergebnisse. Letztgenannter bewies schon in mehreren Studien seine Eignung im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren (Hernando et al. 2002, Lopez-Hoyos et al. 2005, Villalta et al. 2002, Wasmuth et al. 2002).

Insbesondere bei der Selektion auf Patienten mit Nephritis zeigt sich allerdings in allen Nachweisverfahren einschließlich der Biosensor-Methode eine Verbesserung der AUC-Werte. Gerade bei dieser Patientensubgruppe ist anti-dsDNA im Serum durch höhere Affinität/Avidität krankheitsspezifischer und kann daher als prognostischer Marker für nephrogene Erstmanifestationen oder Exazerbationen angesehen

werden. Wie bei allen anderen Assays auch wird dennoch ein Teil der SLE-Patienten auch vom Biosensor nicht erfasst. Erklärbar ist dies wohl unter anderem auch im Hinblick auf eine bei einigen Patienten bereits erfolgte Therapie, die mit einem tatsächlichen Rückgang an anti-dsDNA verbunden ist.

4.3 Anti-dsDNA SPR Biosensor

Im Gegensatz zu etablierten analytischen Verfahren wird die SPR-Technologie gegenwärtig nur selten genutzt, um Autoantikörper zu bestimmen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete anti-dsDNA Biosensor-Chip wurde in einem Pilotprojekt bereits evaluiert. Dabei wurden Seren von gesunden Individuen, Patienten, die an nicht-SLE Autoimmunopathien litten und Patienten, die die SLE- Kriterien erfüllten, verwendet (Buhl et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der Biosensor bei Gebrauch eines Cut-off-Wertes von 25 RU eine hohe Spezifität (98%) bei einer Sensitivität von 83% aufweist. Dadurch hat dieses neue System seine Eignung für die Labordiagnose von SLE bereits bewiesen. Im Besonderen ist die analytische Sensitivität des Verfahrens bemerkenswert. Doch bei den Pilotmessungen gab es hinsichtlich der Durchführung im Vergleich zur Ausführung in dieser Arbeit zwei entscheidende Unterschiede. Zum einen bestand das SLE-Patientenkollektiv nur aus 13 Individuen, von denen insgesamt 42 Serumproben aus unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs zur Verfügung standen und durch hohe Werte bei Messungen im Farr-Assay bereits vorselektiert waren. Zum anderen wurden sämtliche Pilot-Messungen am Biosensor nur auf einem einzigen Chip und ohne Kalibration durchgeführt.

Obwohl die Biosensor Assoziationsbindungskurven im SPR-Sensorgramm nicht nur von der Antikörper-Konzentration abhängen, sondern auch von deren Affinitäten, zeigten die untersuchten Patientenserumproben nahezu einheitliche SPR-Sensorgramme. Der Grund dafür scheint zu sein, dass alle Patienten, die schon über einen längeren Zeitraum hinweg an SLE litten, vorwiegend anti-dsDNA vom Isotyp IgG hatten. Unterschiedliche Kurvenverläufe sind hinweisend auf die Prädominanz von IgG oder IgM. Während IgM generell eine verzögerte Assoziationsphase und eine schwache Dissoziation, korrelierend mit einer hohen verbleibenden Bindung aufweist, zeigt IgG eine

schnellere Assoziation bei schnellerer Dissoziation. In den SPR-Biosensorgrammen konnten jedoch hauptsächlich nur letztgenannte Kurvenverläufe beobachtet werden. Das Biosensor-Prototypverfahren für anti-dsDNA, das Antigen/Antikörper Interaktionen in Echtzeit darstellt, lieferte im Vergleich zu den vier anderen Methoden durchweg gute AUC und DE Werte und kann mit guter analytischer Qualität als Ergänzung zu den herkömmlichen Verfahren angesehen werden. Besonders für die Diagnosestellung und zur klinischen Verlaufskontrolle und Überwachung von SLE-Patienten kommt ein Einsatz in Frage. Eine etwas ausgereifere Biosensor-Einheit mit einer besseren Oberflächenstabilität wird sicher bessere AUC und DE Werte liefern.

4.3.1 Ak-Isotyp-Bestimmung

Gerade für klinisch-serologische Fragestellungen, beispielsweise hinsichtlich der Risikoeinschätzung der Entwicklung einer Lupus-Nephritis, kann die Bestimmung des prädominanten anti-dsDNA Isotyps wertvolle Hinweise liefern. Durch den Einsatz isotypspezifischer anti-human-Ig-Agarose konnten ausgewählte Seren (nämlich solche mit hoher relativer Bindung im Sensorgramm) von Immunglobulinen befreit werden und die verbleibende Anbindung untersucht werden. Die in dieser Arbeit verwendete Chip-Oberfläche stellte sich auch für diese Anwendung als geeignet dar. Nur bei zwei der getesteten Seren war die Dominanz eines Isotyps nicht eindeutig erkennbar.

4.3.2 Kalibration des SPR-Biosensors

Trotz einheitlichem Beladungsprotokoll und Herstellungsprozedur wiesen die fünf verwendeten Chips keine identische, sondern lediglich eine ähnliche Oberflächenantigendichte auf, was sich in Abweichungen in ihrer Bindungskapazität widerspiegelte. Dies zeigt auch die zwingende Notwendigkeit für den Einsatz eines Kalibrators. Die Präzision zwischen den einzelnen Chips reichte für Anwendungen innerhalb der Autoimmundiagnostik gut aus. Chip 1 wurde mit frisch hergestelltem hTf-dsDNA-

Konjugat chronologisch als erstes hergestellt. Dessen Oberfläche überdauerte etwa 400 Messungen bei einem insgesamt relativ konstanten Bindungsverhalten (VK=7,8%; SD=23,9). Chip 5 hingegen (VK=12,9%; SD=55,8) lässt einen Abwärtstrend in der Oberflächenantigendichte beobachten und damit einen Alterungsprozess vermuten. Durch weitere Optimierung der Stabilität des hTf-dsDNA-Konstrukts auf der Chip-Oberfläche lässt sich die Qualität der Biosensormessungen zukünftig wahrscheinlich noch weiter verbessern. Eine zusätzliche Hilfe wäre die Charakterisierung weiterer monoklonaler Antikörper am Biosensor mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, die außerdem auch für bereits etablierte Labormethoden als Lösungsansatz bei der Suche nach einem neuen, einheitlichen Kalibrator dienen könnte. dsDNA-mAB33 mit höherer Affinität zu ssDNA, der in dieser Arbeit nur sechsmal genutzt wurde, könnte auch als Zweitkalibrator zum Einsatz kommen.

Ähnlich wie auch dsDNA-mAB32 könnte dieser ebenfalls zur Qualitätskontrolle eingesetzt werden, beispielsweise zur Feststellung einer zunehmenden Unbrauchbarkeit der Chip-Oberfläche durch Auftrennung der hybridisierten dsDNA-Moleküle in ssDNA.

4.3.3 Besonderheiten der SPR-Methodik

Im Vergleich zu anderen Verfahren sollen einige für die SPR-Biosensorik spezifische Qualitäten Erwähnung finden.

Ist die Chip-Oberfläche der Anwendung entsprechend optimiert, weist das Verfahren zur Bestimmung einzelner Serenproben einen nur geringen Zeitaufwand auf, mit dem sich aufgrund der markierungsfreien Technik über 100 Messungen ohne Qualitätsverlust durchführen lassen. Bei Nutzung modernerer automatisierter Systeme wie z.B. BIAcore T100 oder BIAcore A100 oder durch zusätzliche parallele Messungen unter Verwendung eines BIAcore-Flexchips kann noch effizienter gearbeitet werden (Thaler et al. 2009). Außerdem ist für das System in der Regel nur eine einzige Pufferlösung nötig, die während der Analysen nicht gewechselt werden muss.

Im SPR-Biosensorprogramm lassen sich zudem Aussagen über die Affinitäten im Anbindungsverhalten der Antikörper einzelner Seren anhand der in Echtzeit dargestell-

ten Bindungskurven treffen. Für Routine-Labor-Bestimmungen ist dies allerdings nur für spezielle Fragestellungen interessant und somit besteht in der Regel keine Notwendigkeit einen Gleichgewichtszustand (z.B. mit 300s delay) zu erreichen. Verwendet wird stattdessen, wie auch in dieser Arbeit geschehen, lediglich der maximale relative Anbindungswert [RU] nach vollständiger Probeninjektion. Dies ermöglicht eine schnelle Messung innerhalb weniger Minuten.

Der in dieser Arbeit verwendete anti-dsDNA SPR-Assay detektiert nicht nur eine spezielle Subpopulation von dsDNA-Autoantikörpern, sondern liefert Affinitätsausagen, die helfen können, den für den Patienten jeweils eigenen anti-dsDNA Status zu verstehen. Doch neben den genannten Vorteilen muss berücksichtigt werden, dass SPR-Biosensoren bislang nur selten zum Einsatz kommen. Das liegt zum einen an den hohen Anschaffungskosten. Zum anderen muss die Chip-Oberfläche ausreichend validiert und für die entsprechende Fragestellung geeignet sein. Der Aufwand in der Entwicklung darf hierbei nicht unterschätzt werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden hat man jedoch hier die Möglichkeit die Antigenoberfläche komplett selbst zu gestalten.

4.4 Die serologische SLE-Diagnostik

Durch die Entwicklung neuer Immunoassay-Methoden steigt die Bandbreite verschiedener Verfahren zur Detektion von anti-dsDNA-Antikörpern weiter an. Auch der in dieser Arbeit genutzte, auf dem SPR-Prinzip basierende Biosensor kennzeichnet einen neuen Ansatz mit viel versprechenden Möglichkeiten (Buhl et al. 2009, Jönsson/Malmqvist 1992, Thaler et al. 2009). Der Farr Assay gilt unter Klinikern nach wie vor als der Goldstandard. Vorteilhaft ist einerseits die hohe Spezifität zur Diagnosestellung von SLE und andererseits die gute Differenzierung zu anderen Autoimmunerkrankungen. Niedrig affine AK gegen dsDNA werden mit diesem Assay nicht erfasst.

ELISAs sind die wohl am meisten verbreiteten und genutzten Methoden im Routine-Labor für anti-dsDNA. Dies sind sensitive Verfahren, die grundsätzlich sowohl hoch als auch niedrig affine anti-dsDNA nachweisen können (in den meisten Fällen IgG).

Deren diagnostische Effizienz für SLE variiert allerdings erheblich (Jäkel et al. 2006, Rouquette/Desgruelles 2006). Des Weiteren wird auch der CLIF noch benutzt. Im direkten Vergleich zum Farr-Assay ist der CLIF in der Lage weitgehend hoch affine anti-dsDNA nachzuweisen. Gerade moderne Immunoassays werden durch ihre wachsende hohe diagnostische Genauigkeit zunehmend als mögliche Alternativen des Farr RIA gesehen (Jäkel et al. 2006, Wasmuth et al. 2002). Denn dieser ist durch generell höhere Kosten, der Notwendigkeit in der Verwendung radioaktiven Materials und der vergleichsweise anspruchsvollen Durchführung mit einigen Nachteilen behaftet. Im Gegensatz zu den hier verwendeten IgG-spezifischen Verfahren EliA, Farrzyme und Bindazyme erfassen der SPR-Biosensor und der Farr-Assay grundsätzlich alle Immunglobulin-Klassen, was der Fragestellung entsprechend jedoch eher als Vorteil gewertet werden kann.

Anti-dsDNA im Serum ist aber weder stellvertretend noch der einzige Marker für SLE, hat jedoch die Eigenschaft pathologische Veränderungen, die typisch für SLE sind, auszulösen. Hohe Antigen-Affinität und Komplement-Aktivierung über die Fc-Rezeptor Bindungen machen anti-dsDNA für viele Organe bei SLE-Patienten pathogen. Dies ist in Verbindung mit der Insuffizienz und fehlerhaften Ausführung der Phagozytose apoptotischer Zellen zu sehen (Munoz et al. 2008). Basierend auf den gegenwärtig verfügbaren Daten hinsichtlich anderer SLE-Autoantikörper, wie zum Beispiel anti-C1q oder anti-poly(ADP) Ribose, ist die Verwendung von anti-dsDNA als ein Kriterium für die Diagnose von SLE aber immer noch geeignet (Isenberg 2004, Rahman/Isenberg 2008).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Bestimmungsverfahren, die vorwiegend hoch-afide anti-dsDNA detektieren, spezifischer für SLE sind und im Gegensatz zu Nachweisverfahren, die niedrig affine Antikörper nachweisen, maßgeblich an einer Nierenbeteiligung involviert sind (Munoz et al. 2008). Erst kürzlich wurde in einer Longitudinal-Studie mit 16 Patienten mit neu festgestellter biopsiegeprüfter Lupus-Nephritis festgestellt, dass hochafide anti-dsDNA Antikörper die besten Prädiktoren für das renale Outcome sind (Manson et al. 2009).

4.4.1 Hindernisse für eine Vereinheitlichung der serologischen Autoantikörper-Diagnostik

Ein Problem in der serologischen Diagnostik ist neben der Heterogenität der Antikörper die Unterscheidung zwischen klinisch und pathologisch relevanten und irrelevanten Antikörpern. Interesse besteht dabei nicht ausschließlich nur für SLE, sondern auch für andere Autoimmunerkrankungen. Rheumatologen und Laborärzte müssen sich zusätzlich mit vielen analytischen Problemen hinsichtlich der vorhandenen Nachweisverfahren auseinandersetzen. Wesentliche Schwachstellen wie von Jäkel und Isenberg beschrieben sind (Isenberg 2004, Jäkel et al. 2006):

- Unterschiedliche DNA-Quellen (eukaryontisch oder prokaryontisch, genomisch oder mitochondrial, Diskrepanz in Größe und Homogenität)
- Reaktionsbedingungen (Antigen in Lösung oder Festphase gebunden, Beschichtungseigenschaften, Ammoniumsulfatpräzipitation, unterschiedliche Ionenstärken der Pufferlösungen, Bestimmung lediglich eines Isotyps wie z.B. nur IgG oder mehrere)
- Unterschiedliche Cut-Off-Werte verschiedener Assays trotz des Gebrauchs des selben Wo/80 Kalibrators

Neben den genannten analytischen Unterschieden stellen die Labor-Parameter der ACR-Kriterien für SLE selbst ein weiteres Problem (Nossent/Rekvig 2005, Smith/Shmerling 1999) dar, da sie die Ergebnisse der Methodenvergleiche durch Selektion von möglicherweise fehldiagnostizierten Patienten und Kontrollen in einigen Studien beeinflussen. Denn viele Patienten, bei denen früher SLE diagnostiziert wurde, im Verlauf aber weniger als vier ACR-Kriterien aufwiesen, werden in einigen Therapie-Studien nur unzureichend berücksichtigt, obwohl sie möglicherweise für das Gesamtverständnis von SLE wertvolle Hinweise liefern könnten. So erscheint die Forderung von Smith (Smith/Shmerling 1999) die ACR-Klassifikationskriterien in regelmäßigen Abständen zu überarbeiten und zu ergänzen in Anbetracht des schnellen Fortschritts in der Diagnostik und der genannten Probleme durchaus angebracht.

5 Zusammenfassung

Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) gilt als Chamäleon unter den Autoimmunerkrankungen. Der Facettenreichtum und die variablen Erscheinungsformen dieses Krankheitsbildes erschweren häufig eine frühe Diagnose. Charakteristisch und spezifisch für diese Erkrankung ist neben vielen klinischen Manifestationen das Auftreten von anti-dsDNA-Autoantikörpern. Deren Nachweis ist von hohem diagnostischem Wert sowohl für die Erstdiagnose als auch für den weiteren Krankheitsverlauf, da Exazerbationen wie beispielsweise die Entwicklung oder Verschlechterung einer Lupus-Nephritis mit ansteigenden Titern von anti-dsDNA korrelieren.

Als diagnostische Nachweisverfahren kommen dafür neben ELISAs auch der *Crithidia luciliae* Immunfluoreszenztest, sowie der Farr RIA zum Einsatz, der durch seine hohe Spezifität nach wie vor als Goldstandard in der SLE-Diagnostik betrachtet wird. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Biosensor-System auf dessen Leitungsfähigkeit zur Detektion von anti-dsDNA getestet. Der verwendete Biosensor basiert auf dem Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz und ermöglicht die markierungsfreie Erfassung von Massenänderungen bzw. Reaktionen zwischen anti-dsDNA und oberflächenimmobilisierter Doppelstrang-DNA. Mit einer bereits etablierten Methodik wurde dazu im Durchfluss ein Protein-dsDNA-Konstrukt mit einer dsDNA-Länge von 233bp auf die Chip-Oberfläche aufgetragen, um als Antigen in den gemessenen Seren potentiell vorhandene dsDNA-Antikörper erfassen zu können. Als Probenmaterial wurden 50 SLE-Seren, sowie ein aus 59 Individuen bestehendes Kontrollkollektiv, bestehend aus 20 gesunden Spendern sowie 39 an anderen Autoimmunerkrankungen Erkrankten, verwendet.

Diese wurden jedoch nicht ausschließlich am SPR-Biosensor vermessen, sondern auch, unter dem Gesichtspunkt zur Einschätzung der klinischen Wertigkeit dieses Verfahrens, in kommerziellen Assays wie den ELISAs von Bindazyme, Farrzyme, dem EliA sowie dem Farr RIA analysiert. Im Hinblick auf die Leistungsfähigkeit wurde für alle verwendeten Verfahren nach vollständiger Analyse die diagnostische Effizienz (DE) berechnet. Zur Quantifizierung wurde das Biosensor-Verfahren gegen

den kommerziell verfügbaren humanen monoklonalen Antikörper dsDNA-mAB32 kalibriert. Zugleich diene dieser Kalibrator auch als Qualitätsmarker, da er in regelmäßigen Abständen zwischen den gemessenen Proben zum Einsatz kam und somit fortwährend die Funktionsfähigkeit der dsDNA-Oberflächenstruktur des Biosensorchips geprüft werden konnte.

Die Prüfung des SPR-Biosensor Prototyps auf Funktionalität und Leistungsfähigkeit in der anti-dsDNA-Analytik im Vergleich zu vier gängigen leistungsstarken Nachweisverfahren ergab folgende Ergebnisse: Im direkten Vergleich zu den anderen Methoden bestätigt der Biosensor eine hohe DE zur Analytik von anti-dsDNA und beweist durch seine gute Diskriminierung seine Eignung für die serologische SLE-Diagnostik. Gegenüber den konventionellen Nachweismethoden hat die SPR-Biosensormethodik einige Vorteile: Durch das markierungsfreie Verfahren sind auf einer stabilen Oberfläche konsekutiv mehrere hundert Messungen möglich. Die Sensorgramme erlauben eine Echtzeit-Analyse und ermöglichen zusätzliche Aussagen zur Bindungskinetik der unterschiedlichen anti-dsDNA. Die Charakterisierung besonders von hochaffinen und aviden anti-dsDNA, die bei der Lupus Nephritis eine wichtige Rolle spielen, könnte mit einem weiter optimierten SPR-Biosensor möglich sein. Damit würde eine neue Qualität der serologischen anti-dsDNA-Analytik ermöglicht, die bei der Diagnostik und beim klinischen Monitoring des SLE nützlich sein könnte.

Literaturverzeichnis

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.

Alacron G, Friedman A, Straaton K, Moulds J, Lisse J, Bastian H, McGwin G, Bartolucci A, Roseman J, Reveille J: *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. Lupus in minority populations: Nature vs. Nurture.* Lupus 1998a; **8**: 197-209.

Alacron G, Roseman J, Bartolucci A, Friedman A, Moulds J, Goel N, Straaton K, Reveille J: *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: II. Features predictive of disease activity early in its course. LUMINA Study Group. Lupus in minority populations, nature vs. nurture.* Arthritis Rheum 1998b; **41**: 1173-1180.

Andersson K, Haemaelaenen M, Malmqvist M: *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multi-variate cocktail approach.* Anal Chem 1999; **71**: 2475-2481.

Arbuckle MR, McClain 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.

Ardoin SP, Pisetsky DS: *Developments in the scientific understanding of lupus.* Arthritis Res Ther 2008; **10**: 218.

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.

Biacore AB: *BIAtechnology Handbook.* 1998

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.

Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, Hummel EJ, de Boer G, Limburg PC, Kallen-

berg 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.

Braun-Falco O: Lupus erythematoses. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M (Hrsg.): *Dermatologie und Venerologie.* Heidelberg: Springer-Verlag; 2005

Brecht A, Piehler J, Lang G, Gauglitz G: *A direct optical immunosensor for atrazine detection.* Anal Chim Acta 1995; **311**: 289-299.

Brinkman K, Termaat R, Van den Brink H, Berden J, Smeenk R: *The specificity of the anti-dsDNA ELISA. A closer look.* J Immunol Methods 1991; **139**: 91-100.

Bruns A, Bläss S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F: *Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum 2000; **43**: 2307-2315.

Buckman K, Moore S, Ebbin A, Cox M, Dubois E. *Familial systemic lupus erythematosus.* Arch Intern Med 1978; **138**: 1674-1676.

Buhl A, Metzger JH, Heegaard NH, von Landenberg P, Fleck M, Lippa PB: *Novel biosensor-based analytic device for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies.* Clin Chem 2007; **53**: 334-341.

Buhl A, Page S, Heegaard NH, von Landenberg P, Lippa PB: *Optical biosensor-based characterization of anti-double-stranded DNA monoclonal antibodies as possible new standards for laboratory tests.* Biosens Bioelectron 2009; **25**: 198-203.

Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL: *The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus.* J Clin Invest 1994; **94**: 184-192.

Cazenave PLA: *Lupus erythemateux (erythema centrifuge).* Ann Mal Peau Syph 1851; **3**: 297-299.

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.

Clark LC, Lyons C: *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Ann N Y Acad Sci 1962; **102**: 29-45.

Classen M: *Systemischer Lupus erythematosus (SLE)*. München: Urban und Fischer; 2004.

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.

Davas E, Tsirogianni A, Kappou I, Karamitsos D, Economidou I, Dantis P: *Serum IL-16, TNF- α , p55 sr TNF- α , p75 sr TNF- α , srIL-12 α levels and disease activity in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol 1999; **18**: 17-22.

Davidson A, Diamond B: *Autoimmune diseases*. N Engl J Med 2001; **345**: 340-350.

D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR: *Systemic lupus erythematosus*. Lancet 2007; **369**: 587-596.

DGKL: *Arbeitsgruppe Autoimmundiagnostik*.

(http://www.dgkl.de/CMS100011PA100064_DE_VAR100?sid=b2oT82YX0m61)

Stand:06.02.2012.

Fagerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Rönnerberg I: *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding-site and concentration analysis*. J. Chromatogr., 1992; **597**: 397-410.

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.

Fessel W: *Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women*. Arch Intern Med 1974; **134**: 1027-1035.

Fiegel F, Buhl A, Jaekel HP, Werle E, Schmolke M, Ollert M, Lippa PB: *Autoantibodies to double-stranded DNA--intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device*. Lupus 2010; **19**: 957-964.

Förger F, Matthias T, Oppermann 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.

Granholm N, Cavallo T: *Autoimmunity, polyclonal B cell activation and infection*.

Lupus 1992; **1**: 63-74.

Griffiths B, Mosca M, Gordon C. *Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices*. Best Pract Res Clin Rheumatol 2005; **19**: 685-708.

Hahn B: Systemischer Lupus erythematosus. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, Kaspar DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Lono DL, Jameson JL (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag; 2005

Hahn BH: *Antibodies to DNA*. N Engl J Med 1998; **338**: 1359-1368.

Hanley JA, McNeil BJ. *A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases*. Radiology 1983; **148**: 839-843.

Hanley JA, McNeil BJ: *The Meaning and use of the area under receiver operating characteristic (ROC) curve*. Radiology 1982; **143**: 29-36.

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.

Heidenreich U, Mayer G, Herold M, Klotz W, Stempf Al-Jazrawi K, Lhotta K: *Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis*. Lupus 2009; **18**: 1276-1280.

Heinlen LD, McClain MT, Merrill J, Akbarali YW, Edgerton CC, Harley JB, James JA.: *Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms*. Arthritis Rheum 2007; **56**: 2344-2351.

Hernando M, Gonzalez C, Sanchez A, Guevara P, Navajo JA, Papisch W, Gonzalez-Buitrago JM: *Clinical evaluation of a new automated anti-dsDNA fluorescent immunoassay*. Clin Chem Lab Med 2002; **40**: 1056-1060.

Herold G und Mitarbeiter. VII Rheumatologie. Systemischer Lupus Erythematosus. In *Innere Medizin*. Köln 2008.

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. *Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1998; **41**: 1241-1250.

Hettenkofer HJ: Kollagenosen. In: Hettenkofer HJ (Hrsg.), *Rheumatologie: Klinik-*

Diagnostik-Therapie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1998

Hochberg MC: *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 1725

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.

Isenberg D, Smeenk R: *Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now?* *Lupus* 2002; **11**: 797-800.

Isenberg D: *Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus?* *Lupus* 2004; **13**: 881-885.

IUPAC: *Compendium of Chemical Terminology, (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

Jaekel HP, Trabandt A, Grobe N, Werle E. *Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-Clq antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. *Lupus* 2006; **15**: 335-345.

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 and Technology, 1992; 291-336

Kaposi M: *Neue Beiträge zur Kenntnis des Lupus erythematosus*. *Arch Derm Syphilol* 1872; **4**: 36-78.

Koene HR, Kleijer M, Swaak AJG, Sullivan E, Bijl M, Petri MA, Kallenberg CGM, Roos D, von dem Borne AEGK, de Haas M: *The Fc RIII-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1813-1818.

Königshoff M, Brandenburger T: Kapitel 12 Immunologie. In *Kurzlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004

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.

Kotzin BL: *Systemic lupus erythematosus*. *Cell* 1996; **85**: 303-306.

Kretschmann E: *Die Bestimmung optischer Konstanten dünner Schichten in der Nähe der Plasmafrequenz aus Kurvenfeldern konstanter Transmission.* Z Physik 1969; **221**: 346–356.

Kriz D, Mosbach K: *Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilized molecularly imprinted polymer.* Anal Chim Acta 1995; **300**: 71-75.

Lopez-Hoyos M, Cabeza R, Martinez-Taboada VM, Crespo J, SanSegundo D, Blanco R, Lopez-Escribano H, Pena M, Rodriguez-Valverde V: *Clinical disease activity and titers of anti-dsDNA antibodies measured by an automated immunofluorescence assay in patients with systemic lupus erythematosus.* Lupus 2005; **14**: 505-509.

Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW: *Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry.* Clin Chim Acta 2001; **314**: 1-26.

Maekawa Y, Yasutomo K: *Defective clearance of nucleosomes and systemic lupus erythematosus.* Trends Immunol 2001; **22**: 662-663.

Manson JJ, Ma A, Rogers P, Mason LJ, Berden JH, van der Vlag J, D`Cruz DP, Isenberg DA, Rahman A: *Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study.* Arthritis Res Ther 2009; **11**: R154

Manzi S. *Epidemiology of systemic lupus erythematosus.* Am J Manag Care 2001; **7**: 474-479.

Masood S, Jayne D, Karim Y: *Beyond immunosuppression - challenges in the clinical management of lupus nephritis.* Lupus 2009; **18**: 106-115.

Metzger J, von Landenberg P, Kehrel M, Buhl A, Lackner KJ, Luppa 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**: 1137-1143.

Miller F, Cooper G. *Environmental aspects of lupus.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.

Mills JA: *Systemic lupus erythematosus.* N Engl J Med 1994; **330**: 1871-1879.

Moens U, Rekvig OP: *Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection.* In: Khalili K, Sonner GL (eds), *The human polyomaviruses. Molecular and clinical perspectives.* New York: John Wiley & Sons, Inc; 2001

Mok CC, Lau CS: *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. J Clin Pathol 2003; **56**: 481-490.

Mortensen ES, Rekvig OP: *Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes*. J Am Soc Nephrol 2009; **20**: 696-704.

Mostoslavsky G, Fischel R, Yachimovich N, Yarkoni Y, Rosenmann E, Monestier M, Baniyash M, Eilat D: *Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry*. Eur J Immunol 2001; **31**: 1221-1227.

Munoz LE, Gaipf US, Herrmann M: *Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay*. Autoimmun Rev 2008; **7**: 594-597.

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.

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.

Postal M, Appenzeller S: *The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Cytokine 2011; **56**: 537-543.

Potter B: *The history of the disease called lupus*. J Hist Med Allied Sci 1993; **48**: 80-90.

Provost T, Flynn J. Lupus erythematosus. In Cutaneous Medicine: Cutaneous Manifestations of Systemic Disease. London: Elsevier Science; 2001.

Rahman A, Hiepe F: *Anti-DNA antibodies--overview of assays and clinical correlations*. Lupus 2002; **11**: 770-773.

Rahman A, Isenberg DA: *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med 2008; **358**: 929-939.

Ramanathan K, Danielsson B: *Principles and applications of thermal biosensors*. Biosens Bioelectron 2001; **16**: 417-423.

Rekvig OP, Kalaaji M, Nossent H: *Anti-DNA antibody subpopulations and lupus*

nephritis. Autoimmun Rev 2004; **3**: 1-6.

Reuter P: *Springer Lexikon Medizin*. Springer-Verlag 2004.

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.

Ritchie RH: *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*. Phys Rev 1957; **106**: 874-881.

Rouquette AM, Desgruelles C: *Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays*. Lupus 2006; **15**: 403-407.

Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccardino L, Doria A: *Environment and systemic lupus erythematosus: an overview*. Autoimmunity 2005; **38**: 465-472.

Sawata S, Kai E, Ikebukuro K, Iida T, Honda T, Karube I: *Applification of peptide nucleic acid to the direct detection of desoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction*. Biosens Bioelectron 1999; **14**: 397-404.

Sethi RS: *Transducer aspects of biosensors*. Biosens Bioelectron 1994; **9**: 243-264.

Shmerling RH. *Autoantibodies in systemic lupus erythematosus--there before you know it*. N Engl J Med 2003; **349**: 1499-1500.

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.

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.

Smeenk R, Van der Lelij G, Arden L: *Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay*. J Immunol 1982; **128**: 73-78.

Smith EL, Shmerling RH: *The American College of Rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: strengths, weaknesses, and opportunities for improvement*. Lupus 1999; **8**: 586-595.

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.

Tan EM: *Antinuclear antibodies: diagnostic marker for autoimmune diseases and probes for cell biology*. *Adv Immunol* 1989; **44**: 93-151.

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.

Thaler M, Buhl A, Welter H, Schreiegg A, Kehrel M, Alber B, Metzger J, Lippa PB: *Biosensor analyses for serum autoantibodies: application to antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus*. *Anal Bioanal Chem* 2009; **393**: 1417-1429.

Tokano Y, Morimoto S, Kaneko H, Amano H, Nozawa K, Takasaki Y, Hashimoto H. *Levels of IL-12 in sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)-relation to Th1 and Th2 derived cytokines*. *Clin Exp Immunol* 1999; **116**: 169-173.

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.

Villalta D, Bizzaro N, Corazza D, Tozzoli R, Tonutti E: *Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsDNA antibodies in SLE*. *J Clin Lab Anal* 2002; **16**: 227-232.

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.

Vyse TJ & Kotzin BL: *Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus*. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 261–292.

Wasmuth JC, Oliver y Minarro D, Homrighausen A, Leifeld L, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U: *Phospholipid autoantibodies and the antiphospholipid syndrome: diagnostic accuracy of 23 methods studied by variation in ROC curves with number of clinical manifestations*. *Clin Chem* 2002; **48**: 1004-1010.

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 1998a; **18**: 63–69.

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 1998b; **18**: 85–91.

Witte T: *IgM antibodies against dsDNA in SLE*. Clin Rev Allergy Immunol 2008; **34**: 345-347.

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.

Zhang J, Jacobi AM, Wang T, Diamond B: *Pathogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus are derived from both self-reactive and non-self-reactive B cells*. Mol Med 2008a; **14**: 675-681.

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 2008b; **332**: 103-111.

Zweig MH, Campbell G: *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem 1993; **39**: 561-577.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter B. Luppä für die Bereitstellung des interessanten Themas und das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alexander Buhl für die engagierte und vorbildliche, intensive Betreuung, die entscheidend zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Danken möchte ich auch Frau Anita Schreiegg für die zuverlässige technische Unterstützung, sowie Frau Dürmeyer für die Durchführung des Farr-Assays.

Auch Herrn Dr. H.-P. Jäkel vom Dietrich Bonhoeffer Klinikum in Neubrandenburg für die zur Verfügung gestellten SLE-Seren sei an dieser Stelle gedankt.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau Dipl.-Math. Raymonde Busch für die statistische Beratung bedanken.

Abschließend gebührt der Dank meinen Großeltern für Ihre Geduld, ihren Rückhalt und die moralische Unterstützung während des Studiums und der Arbeit an der Dissertation.