



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Klinikum rechts der Isar

**Entwicklung fluoreszenzbasierter
Immunoassays für den neuen
Inflammationsmarker Chitinase 3-like 1
(YKL-40)**

Michael Reiner Schmalenberg

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Groll
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. apl. Prof. Dr. Peter B. Lippa

Die Dissertation wurde am 20.06.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.07.2017 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter:

Schmalenberg, M., Beaudoin, C., Bulst, L., Steubl, D. & Lippa, P.B. "Magnetic bead fluorescent immunoassay for the rapid detection of the novel inflammation marker YKL-40 at the point-of-care", *Journal of Immunological Methods*, Vol. 427, S. 36-41, 2015

Zusammenfassung

Respiratorische Infektionen zählen zu den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Neugeborene, Säuglinge und kleine Kinder, aber auch ältere Menschen (> 65 Jahre) haben ein besonders hohes Risiko, schwere Manifestationsformen von Pneumonien zu entwickeln. Diese können gut mit antiviralen bzw. antibakteriellen Medikamenten behandelt werden, wenn sie rechtzeitig diagnostiziert werden.

Den Goldstandard für die Diagnose von Pneumonien stellen radiologisch nachgewiesene Infiltrate in der Lunge dar. Radiologische Untersuchungen sind allerdings vor allem in kleineren Arztpraxen oft nicht verfügbar, und rein klinische Diagnosen sind oft nur eingeschränkt valide. Die Messung von Inflammationsmarkern kann hier dem Arzt wertvolle Anhaltspunkte für die Stellung der Diagnose geben.

Point-of-Care (POC)-Geräte ermöglichen dabei eine Unterstützung der Diagnostik vor Ort, da sie direkt in kleinen Arztpraxen von nicht spezialisiertem Personal oder sogar vom Patienten selbst ausgeführt werden können. Diese Geräte müssen nach kurzer Einführung und ohne tiefergehende Kenntnisse fehlerfrei bedient werden können, günstig in der Anschaffung und Betrieb sein und eine möglichst kurze Zeit bis zum Erhalt des Ergebnisses benötigen, wobei die Ergebnisse mit denen konventioneller Analytik vergleichbar sein sollen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines dezentralen Diagnostiksystems zur Unterstützung der Diagnose von Pneumonien am POC.

Dazu wurde zunächst der neue Inflammationsmarker YKL-40 in einer klinischen Studie auf seine Eignung als organselektiver Inflammationsmarker im Vergleich zu CRP untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass YKL-40 einerseits wie CRP als Inflammationsmarker einzuordnen ist. Im Gegensatz zu CRP erlaubt YKL-40 jedoch eine Unterscheidung zwischen Pneumonien und anderen inflammatorischen Erkrankungen, und erreichte für diese Fragestellung in der untersuchten Patientengruppe einen negativ prädiktiven Wert von 100 % bei einem Cutoff von 57,3 ng/mL. Aufgrund dieser Ergebnisse und zahlreicher Literaturwerte ist YKL-40 ein interessanter Inflammationsmarker, der bei einer Pneumonie schneller und spezifischer als CRP reagiert, und dieses sinnvoll ergänzen könnte.

Für diesen Marker wurden anschließend verschiedene fluoreszenzbasierte Immunoassay-Formate entwickelt. Als Entwicklungsplattform diente der Tubescanner, ein miniaturisiertes Fluoreszenzmessgerät, das Tube-Strips als Testformat verwendet. Die Assayentwicklung verfolgte dabei das Ziel, die Assays später auf der mikrofluidischen LabDisk-Plattform zu automatisieren.

Ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierter Demonstrationsassay konnte in dem verwendeten Detektionssystem nicht die für YKL-40 notwendige analyti-

sche Leistung erreichen, könnte sich aber für höher konzentrierte Marker eignen.

Ein ebenfalls entwickelter, auf magnetischen Beads basierender Fluoreszenzimmunoassay entsprach hingegen den analytischen Anforderungen, erlaubt eine Messung in unter 17 Minuten und konnte erfolgreich mit humanen Serumproben getestet werden. Dabei zeigen sich im kritischen Konzentrationsbereich nur geringe Abweichungen von bereits etablierten Methoden.

Um diesen Assay im nächsten Schritt auf die vollautomatische LabDisk-Plattform zu portieren, mussten zwei zentrale Probleme gelöst werden:

Zunächst musste ein Weg gefunden werden, kleinere Mengen superparamagnetischer Beads durch Gasphasen-Transitions-Magnetophorese (GTM) zu transportieren, was durch die Kombination mit einer größeren magnetischen Masse in der Probenkammer erreicht werden konnte.

Zum Zweiten musste eine Stabilisierung des Assaygemisches durch die Entwicklung einer geeigneten Lyophilisierungsstrategie ermöglicht werden. Der Zusatz von humanem Serumalbumin, Trehalose und Phenylalanin resultierten zusammen mit einer Prozedur zur Verarbeitung kleiner Lyophilisatmengen in Pellets mit ausreichender Stabilität und Löslichkeit für eine Verwendung in dem automatisierten System.

Durch diese Entwicklungen konnte ein vollautomatisiertes System zum Nachweis für YKL-40 erfolgreich an humanen Serumproben getestet werden.

Summary

Respiratory infections are among the most abundant infectious diseases of man. New-borns and infants, but also elderly people (> 65 years) are at high risk to develop severe manifestations of pneumonia. These can be treated satisfactorily with antiviral or antibacterial drugs, if a timely diagnosis is provided.

The gold standard for the diagnosis of pneumonia are radiographically determined new infiltrates in the lung. These examinations are not ubiquitously available, and diagnosis based on clinical signs has limited validity. Additional measurement of inflammation markers can provide meaningful additional diagnostic information.

Point-of-Care (POC)-devices facilitate a fast and distributed aid for diagnosis, as they can be used directly in local physician's offices by not specially qualified staff or even by the patients themselves. These devices need to provide failproof usability after a short training period without deeper knowledge by the user. At the same time, they need to be cost-efficient in purchase and sustaining while the delivered results need to be comparable to conventional laboratory analytics.

The aim of this thesis was the development of a decentralized diagnostics-system to support the diagnosis of pneumonia at the POC.

Initially, a clinical study was conducted to investigate the novel inflammation marker YKL-40 for its value as organ-selective inflammation marker in comparison to CRP. The results indicate that YKL-40 on the one hand is to be classified as inflammation marker, as is CRP. In contrast to CRP, YKL-40 allows a differentiation between pneumonia and other inflammatory diseases, and reached a negative predictive value of 100 % at a 57.3 ng/mL cutoff for this question in the examined patient collective. Based on this study and literature data, YKL-40 is a promising inflammation marker that reacts faster and more specific than CRP, and could add supplemental diagnostic information.

Subsequently, different types of fluorescence-based immunoassay formats have been developed for this marker. The tubescanner, a miniaturized fluorescence measurement device using PCR-Strips as disposables, was used for development purposes. The assay development aimed on a following automatization on the microfluidic LabDisk-platform.

The Förster-resonance energy transfer (FRET)-based demonstration assay could not reach the required analytical performance in this system, but could be suitable for highly concentrated markers.

An alternative approach using magnetic beads as solid phase and fluorescence as detection method met the requirements for YKL-40 detection,. It allows a measurement in 17 minutes and could be successfully applied to human sera, thereby showing

little deviation from established methods in the critical concentration range.

To facilitate automatization of this assay format on the LabDisk, two central problems had to be solved:

First, a way to allow the transport of small amounts of superparamagnetic beads using gas-phase transition magnetophoresis (GTM) had to be found. This could be achieved combining the assay with a large magnetic mass in the sample chamber.

Additionally, a means to stabilize the assay mixture had to be achieved by developing a suitable lyophilization strategy. The addition of HSA, trehalose and phenylalanin together with a handling procedure for small lyophilisates resulted in pellets with sufficient stability and solubility for further processing.

Due to this developments, a fully-automated system for the determination of YKL-40 could be successfully applied to human sera.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Einleitung	18
1.1 Pneumonie	18
1.1.1 Systematische Einordnungen	19
1.1.1.1 CRB/CURB65	19
1.1.1.2 PSI (Pneumonia severity index)	19
1.1.2 Diagnostik	20
1.1.2.1 Symptomatik und Radiologie	20
1.1.2.2 Klassische Erregernachweise	21
1.1.2.3 PCR-gestützte Erregernachweise	22
1.1.2.4 Zusammenfassung	23
1.2 Inflammationsmarker	24
1.2.1 Inflammationsmarker in der Pneumoniediagnostik	25
1.2.1.1 Pentraxine und CRP	26
1.2.1.2 Procalcitonin	26
1.2.1.3 Interleukin-6	27
1.2.2 Chitinase 3-like 1 (YKL-40)	27
1.2.2.1 Biologische Funktion	29
1.2.2.2 YKL-40 in der Pneumoniediagnostik	30
1.2.2.3 Eignung als Biomarker	31
1.3 Immunoassays	33
1.3.1 Kenngrößen zur Charakterisierung von Immunoassays	36
1.3.1.1 Präzision und Richtigkeit	36
1.3.1.2 Experimentelle Bestimmung der Unpräzision	36
1.3.1.3 Nachweisgrenzen	37
1.3.1.4 Kalibrierfunktion	37
1.3.1.5 Fehlerquellen und Einschränkungen	39
1.3.2 Magnetische Partikel in Immunoassays	40
1.3.3 Fluoreszenz und Förster-Resonanzenergietransfer	40
2 Material	44
2.1 Reagenzien	44

2.2	Geräte	46
2.2.1	Fluoreszenzdetektion	46
2.2.1.1	Tubescanner	46
2.2.1.2	LabDisk Player	46
2.2.2	Sonstige Geräte	49
3	Methoden	51
3.1	Kopplungschemie	51
3.2	Anionenaustauschchromatographie	53
3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung	53
3.4	Statistische Methoden	55
3.4.1	ROC-Analyse	55
3.4.2	Methodenvergleiche	55
3.4.2.1	Bland-Altman-Plot	55
3.4.2.2	Passing-Bablok-Regression	56
3.4.2.3	Signifikanz	56
3.5	Klinische Studie	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Untersuchung des neuen Inflammationsmarkers YKL-40	59
4.2	Förster-Resonanzenergietransfer basierter Immunoassay	63
4.2.1	Assayprinzip	63
4.2.2	Konjugation der Reagenzien	63
4.2.3	Aufbau und Charakterisierung des Assays	67
4.2.4	Zusammenfassung	69
4.3	Magnetpartikel-basierter Fluoreszenzimmunoassay	70
4.3.1	Assayprinzip	70
4.3.2	Charakterisierung von DDAO-Phosphat als Substrat	71
4.3.3	Optimierung	71
4.3.3.1	Annahmen zur Bestimmung der Anfangszusammen-	
	setzung des Assays	71
4.3.3.2	Konzentration der alkalischen Phosphatase	72
4.3.3.3	Waschschritte	73
4.3.3.4	Konzentrationsverhältnis der Antikörper	74
4.3.3.5	Substratumsatz und Inkubationszeit	75
4.3.4	Charakterisierung des Assays	75
4.3.4.1	Kalibrationskurve und Assayparameter	75
4.3.4.2	Linearität und Wiederfindung nach Standardaddition	77
4.3.4.3	Messung von Serumproben	79

4.3.4.4	Methodenvergleich	79
4.3.5	Zusammenfassung	81
4.4	Portierung auf LabDisk	82
4.4.1	Design der Disk	82
4.4.2	Frequenzprotokoll	82
4.4.3	Automatisierter magnetophoretischer Transport	84
4.4.4	Lyophilisierung	86
4.4.5	Proof-Of-Concept	88
4.4.6	Zusammenfassung	88
5	Diskussion	91
5.1	Untersuchung des neuen Inflammationsmarkers	91
5.2	Förster-Resonanzenergietransfer basierter Immunoassay	93
5.3	Magnetbead-basierter Fluoreszenzimmunoassay	95
5.4	Portierung	96
	Literaturverzeichnis	100
	Tabellenverzeichnis	113
	Abbildungsverzeichnis	114
	Danksagung	116
	Ehrenwörtliche Erklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

4PL 4-Parameter logistic regression

AKT Protein-kinase B

BMBF Bundesministerium für Bildung und Forschung

BRK Bayerisches rotes Kreuz

brp-39 Breast regressing protein39 Kd

CAP Community-acquired pneumonia

cfDNA Zellfreie DNA

CHI3L1 Chitinase 3-like1

COP Cyclo Olefin Polymer

COPD Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung

CRB65 Confusion, respiratory rate, blood pressure, age above 65 years

CRP C-Reaktives Protein

CURB65 Confusion, urea, respiratory rate, blood pressure, age above 65 years

DDAO (9H-(1,3-Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One-7-yl)

DDAO-P DDAO-Phosphat

DNA Desoxyribonukleinsäure

EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EGFR Endothelial growth factor receptor

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK Extracellular-signal regulated kinase

FCS Fetales Kälberserum

FPF False positive fraction

FRET Förster-Resonanzenergietransfer

GlcNAc N-Acetylglucosamin

gp38k 38 kDa heparin-binding glycoprotein

GTM Gasphasen-Transtions-Magnetophorese

HAP Hospital-acquired pneumonia

HC gp39 human cartilage glycoprotein-39

HSA Humanes Serumalbumin

ICD International statistical classification of diseases and related health problems

IL-1 β Interleukin-1 β

IL-6 Interleukin-6

IL-8 Interleukin-8

IL-18 Interleukin-18

LOD Limit of detection

LOQ Limit of quantification

MAPK Mitogen-activated protein kinase

MB-FIA Magnetbead-basiertes Fluoreszenzimmunoassay

MERS-CoV middle east respiratory syndrome coronavirus

MGP-40 40 kDa mammary gland protein

MMP-9 Matrixmetalloprotease-9

NGAL Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NHS N-Hydroxysuccinimid

NIST National Institute of Standards and Technologies

NPV Negative predictive value

PAMPs Pathogen-associated molecular patterns

PBS Phosphate-buffered saline

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PCT Procalcitonin

PEG Polyethylenglycol

PI3K Phosphoinositid-3-kinase

POC Point-of-Care

PPV Positive predictive value

PSI Pneumonia severity index

PTX3 Long-Pentraxin-3

PVC Polyvinylchlorid

ROC Receiver operating characteristic

RT Raumtemperatur

RT-PCR Real-time PCR

SAP Serum Amyloid P-Komponente

s Standardabweichung

SRM Standard Reference Material

STAT-3 Signal transducer and activator of transcription 3

TLR Toll-like Rezeptor

TNF Tumornekrosefaktor

TPF True positive fraction

TRACE Time-resolved amplification of cryptate emission

YKL-40 N-Terminal Tyrosin-Lysin-Leucin, 40 kDa

1 Einleitung

1.1 Pneumonie

Pneumonien sind akute Entzündungen der Lunge, und wurden seit dem ausgehenden 19. Jahrhundert intensiv studiert (1). Dennoch sind sie in Deutschland mit 400.000 - 600.000 Patienten und etwa 20.000 Todesfällen pro Jahr nach wie vor häufige und gefährliche Erkrankungen (2).

Eingeteilt werden Pneumonien nach Lokalisation oder Ausdehnung in der Lunge: Unterschieden werden die Lungenbläschen (alveoläre) und das Interstitium betreffende (interstitielle), sowie auf einen Lappen (lobäre) oder auf einen Herd beschränkte (lobuläre) Pneumonien (3). Ausgelöst werden Pneumonien oft durch Infektionen, sowie physikalische oder chemische Noxen. Unterschieden wird zudem zwischen ambulant erworbenen (CAP) und im Krankenhaus erworbenen (HAP) Pneumonien. Die häufigste Ursache für CAP ist die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, gefolgt von *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, und anderen Gram-negativen Bacilli. HAP werden dabei häufiger als CAP von antibiotikaresistenten Keimen verursacht (1). Patienten mit einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) haben ein erhöhtes Risiko, an *H. influenzae* oder *Mor. catarrhalis* sowie *P. aeruginosa* zu erkranken, speziell wenn sie mit Glucocorticoiden behandelt werden (4). Im Zuge von Influenza-Ausbrüchen wird das zirkulierende Virus die vorwiegende Ursache für krankenhauspflichtige CAP, wobei sekundäre bakterielle Infektionen auch eine wichtige Rolle spielen. Respiratorischer Synzitalvirus, Parainfluenzavirus, humaner Metampneumovirus, Adenovirus, Coronavirus und Rhinovirus werden häufig bei CAP-Patienten nachgewiesen. Es ist aber unklar, in welchem Ausmaß diese Viren die Erkrankung direkt verursachen, oder ob sie eine sekundäre Infektion mit bakteriellen Erregern begünstigen (5). Weitere virale Verursacher können das *middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)* und die Vogelgrippe H7N9 sein. Beide Viren haben sich in letzter Zeit aus ihren Ursprungsgebieten in andere Regionen verbreitet (6, 7). Nichttuberkulöse Mykobakterien, und in manchen Gebieten, Pilzinfektionen wie *Histoplasma* und *Coccidioides*-Spezies verursachen subakute Infektionen die durch Husten, Fieber, und neue, pulmonare Infiltrate gekennzeichnet ist. *Coxiella burnetii* kann ebenfalls akute Pneumonien auslösen (1). CAP-ähnliche Syndrome können von verschiedenen Ursachen ausgelöst werden, und müssen nicht zwingend infektiösen Ursprungs sein. So kann beispielsweise bei bis zu 17 % der Patienten, die wegen CAP hospitalisiert werden die Ursache nicht-infektiös sein (8). Trotz großer Anstrengungen in der Mikrobiologie kann nur in etwa der Hälfte der mit CAP eingelieferten Patienten eine

Ursache der Erkrankung festgestellt werden (8, 9).

1.1.1 Systematische Einordnungen

Die Entscheidung, ob ein Patient mit Pneumoniesymptomen stationär oder ambulant behandelt werden muss, stellt ein wichtiges Problem dar. Einerseits entstehen durch die Behandlung nicht unerhebliche Kosten, andererseits sollten Patienten mit erhöhtem Sterblichkeitsrisiko die bestmögliche Behandlung zugeteilt bekommen. Daher wurden verschiedene Systeme entwickelt, die zwar nicht dem Nachweis der Pneumonie dienen, aber mit möglichst einfach zu messenden Parametern eine ausreichende Einordnung ermöglichen sollen.

1.1.1.1 CRB/CURB65

Ein sehr häufig verwendetes klinisches Scoring-System ist CRB65/CURB65. Bei diesem Einordnungssystem wird je 1 Punkt gegeben für: Confusion (Verwirrung), Urea (Serumharnstoff) > 7 mmol/L, Respirationsrate (Atemfrequenz) > 30 / min, Blutdruck unter 90 mmHg systolisch oder unter 60 mmHg diastolisch und Alter > 65 Jahre. Beim CRB65 entfällt der Serumharnstoff als Einordnungskriterium. Der CRB65 wird vor allem in der ambulanten Praxis verwendet, weil er sich auf einfach zu erhebende Parameter stützt. Insbesondere hilft er bei der Entscheidung, ob eine stationäre Therapie notwendig ist. Patienten mit einem CRB65-Wert von einem Punkt haben bereits ein signifikant erhöhtes Sterblichkeitsrisiko und sollten in Abhängigkeit von den Gesamtumständen stationär behandelt werden, ab 2 Punkten ist eine stationäre Therapie indiziert (10).

1.1.1.2 PSI (Pneumonia severity index)

Beim PSI werden bei Vorliegen einer Pneumonie zunächst Vorfaktoren abgefragt (Alter > 50 Jahre, Vorgeschichte (neoplastische Erkrankungen, kongestives Herzversagen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Nieren- oder Lebererkrankungen) und Abweichungen bei der körperlichen Untersuchung (veränderter Mentalstatus, Atemfrequenz ≥ 30 /min, systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg, Körpertemperatur ≤ 35 oder $\geq 40^\circ\text{C}$ und Puls ≥ 125 /min). Liegt keiner der Faktoren vor, wird der Patient in die niedrigste Risikoklasse I eingestuft. Wenn einer oder mehrere dieser Faktoren vorhanden sind, wird zur Einstufung eine Bewertungstabelle (Tabelle 1.1) angewendet, wobei die einzelnen Punkte unterschiedlich gewichtet sind. Anhand des so errechneten Score wird der Patient in eine der 5 Risikoklassen eingeteilt, wobei Klasse I die niedrigste Risikoklasse, Klasse V die höchste darstellt. Diese Regeln

Tabelle 1.1: Bewertungssystem für die Zuweisung in PSI-Risikoklassen. Klasse II ≤ 70 , III 71-90, IV 91-130, V ≥ 130 Punkte

Merkmal	Punkte
Demographische Faktoren	
Alter	
Männer	Alter(Jahre)
Frauen	Alter(Jahre)-10
Patient aus Pflegeheim	+10
Comorbiditäten	
Neoplastische Erkrankungen	+30
Lebererkrankungen	+20
Kongestives Herzversagen	+10
Zerebrovaskuläre Erkrankung	+10
Nierenerkrankung	+10
Ergebnisse der körperlichen Untersuchung	
Veränderter Mentalstatus	+20
Atemfrequenz ≥ 30 /min	+20
Systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg	+20
Temperatur ≤ 35 oder $\geq 40^\circ\text{C}$	+15
Puls ≥ 125 /min	+10
Labormedizin und Radiografie	
Arterieller pH $\leq 7,35$	+30
Harnstoff-Stickstoff im Blut ≥ 30 mg/dL	+20
Natrium ≤ 130 mM	+20
Glucose ≥ 250 mg/dL	+10
Hämatokrit ≤ 30 %	+10
Arterieller Sauerstoffpartialdruck ≤ 60 mmHg	+10
Pleuraerguss	+10

wurden anhand einer Kohorte mit 38.039 Patienten validiert. Hier starben 0,6 % der in Klasse I eingeteilten Patienten, jedoch 31 % der in Klasse V eingeteilten (11).

1.1.2 Diagnostik

1.1.2.1 Symptomatik und Radiologie

Üblicherweise wird eine Pneumonie durch das Vorhandensein eines neu aufgetretenen Lungeninfiltrates zusammen mit Fieber, Husten, Schleimproduktion, Kurzatmigkeit, veränderter Schallweiterleitung und Leukozytose diagnostiziert (12). Auch Verwirrtheit und pleuritische Brustschmerzen sind häufige Symptome. Das Hauptkriterium zur Diagnose einer Pneumonie stellt ein neu auftretendes Infiltrat im Thorax-Röntgenbild dar. Bei einer Lobärpneumonie kommt es hier zu großflächigen Transparenzminderungen im Bereich der Lungenlappen, wobei die luftgefüllten Bronchien im Vergleich zum infiltrierten Lungengewebe dunkel erscheinen (positives Bronchopneumogramm „airbronchogram“, Abbildung 1.1). Bei der Bronchopneumo-

nie finden sich segmentale Transparenzminderungen ohne positives Bronchopneumogramm. Die interstitielle Pneumonie hingegen ist durch fleckig-netzartige (retikuläre) Transparenzminderung gekennzeichnet.



Abbildung 1.1: Das Thorax-Röntgenbild (Frontalaufnahme) zeigt eine Lobärpneumonie des rechten Mittellappens; die diffusen Transparenzminderungen deuten auf eine Beteiligung der Bronchien hin. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Roberto Schubert, Radiopaedia.org, rID: 16074

Neue Lungeninfiltrate können allerdings bei Patienten mit chronischen Erkrankungen oder Adipositas schwer zu identifizieren sein. Außerdem stehen nicht immer qualitativ hochwertige Röntgenbilder zur Verfügung. Aufgrund der hohen Kosten und der eingeschränkten Verfügbarkeit radiologischer Untersuchungen werden Pneumonien daher häufig klinisch diagnostiziert. Dabei erreichen beispielsweise Allgemeinärzte mit 99 % Spezifität einen negativ-prädiktiven Wert von 96 %, allerdings mit nur 29 % Sensitivität in einer Population von 2810 Patienten mit akutem Husten, von denen 140 eine radiologisch nachweisbare Pneumonie aufwiesen (13). Einige, vor allem ältere Patienten, zeigen weder Husten noch Sputumproduktion und haben keine Leukozytose. Ca. 30 % der Patienten haben darüber hinaus bei der Aufnahme kein Fieber, was eine empirische Diagnose vor allem bei diesen Risikopatienten erschwert (8, 14).

1.1.2.2 Klassische Erregernachweise

Der Arzt sollte nach Möglichkeit das verursachende Pathogen und dessen Antibiotika-Empfindlichkeit identifizieren, um die Therapie darauf ausrichten zu können. Hierfür

werden häufig Blutkulturen, Gramfärbung des Sputums, Urintests für *Legionella* und *Pneumococcus* und seltener Multiplex-PCR zur Detektion für *Myc. pneumoniae*, *Chl. Pneumoniae* und respiratorische Viren eingesetzt. Weitere Tests sind bei Patienten mit spezifischen Risikofaktoren und Noxen-Exposition angezeigt (1). Die mikroskopische Untersuchung von pulmonalen Sekreten kann schnelle Informationen über mögliche Pathogene liefern. Liegt eine Probe ausreichender Qualität vor, liefert die Gramfärbung und Sputumkultur in über 80 % der Fälle von Pneumokokkenverursachter Pneumonie positive Resultate. Die Sputumproben werden dabei möglichst vor, in Ausnahmefällen aber auch 6 bzw. 12 Stunden nach dem Beginn der Antibiotikatherapie entnommen (15). Die Ausbeute verringert sich dabei mit längerer Antibiotikagabe und abnehmender Qualität der Sputumprobe. Diese kann durch Inhalation von hypotoner Salzlösung verbessert werden (induziertes Sputum). Blutkulturen sind in etwa 20-25 % der Fälle von Patienten mit Pneumokokken-Pneumonie positiv (15), allerdings seltener, wenn *H. influenzae* oder *P. aeruginosa* der Auslöser ist. *Mor. catarrhalis* kann nur in Ausnahmefällen durch Blutkultur nachgewiesen werden. Ein neuerer Ansatz ist der Nachweis des Pneumococccen-Zellwandpolysaccharids im Urin. Dieser gelingt in 77-88 % der Fälle mit einer bakteriämischen Pneumokokken-Pneumonie (16), allerdings nur in 64 %, wenn die Infektion auf die Lunge beschränkt ist (17). Ein *multiplex capture*-Assay für verschiedene Pneumokokken-Zellwandsaccharide ist zwar entwickelt, aber noch nicht im Einsatz (18). Ein ELISA für Legionellen-Antigen im Urin ist in ca. 74 % der Patienten mit *Legionella pneumophila*-Serotyp-1 verursachter Pneumonie positiv (19).

1.1.2.3 PCR-gestützte Erregernachweise

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Identifikation von respiratorischen Erregern, im Speziellen Viren. Kommerziell erhältliche PCR-Assays können die meisten wichtigen respiratorischen Viren, sowie *Myc. pneumoniae* und *Chl. pneumoniae* detektieren (20). Im Falle der Influenza ist die PCR sensitiver als der Antigentest und kann zur Diagnostik eingesetzt werden (21). Basierend auf PCR wurde in 20-40 % der wegen CAP hospitalisierten erwachsenen Patienten ein respiratorischer Virus nachgewiesen (8, 5). Die Interpretation eines positiven PCR-Nachweises ist allerdings problematisch, da die Viren entweder auslösend sind, oder nur eine sekundäre bakterielle Infektion bedingen (8, 22). Ein Nachweis von viralen Erregern schließt demnach eine bakterielle Ursache nicht zwingend aus. Eine PCR-Detektion von Bakterien in respiratorischen Proben ist ebenfalls problematisch; in den meisten Fällen erreichen pneumoniaauslösende Bakterien durch eine vorhergehende Besiedlung des oberen respiratorischen Traktes die Lunge. Eine positive PCR kann zwischen Kolonisierung und Infektion nicht unter-

scheiden.

1.1.2.4 Zusammenfassung

Die genaue Diagnose einer Pneumonie ist nach wie vor aufwändig. Erregernachweise müssen von anderen Methoden ergänzt werden, die eine Pneumoniediagnose stützen können, um so ein Ansprechen der Patienten auf die jeweilige Therapie zuverlässig und zum frühest möglichen Zeitpunkt feststellen können. Außerdem sollten Fehldiagnosen vermieden werden, gerade wenn radiologische Methoden nicht verfügbar sind. Daher wird versucht, die Pneumoniediagnostik mit der Messung von Inflammationsmarkern zu unterstützen und zu beschleunigen.

1.2 Inflammationsmarker

Inflammation ist die Reaktion des Körpers auf schädliche Stimuli wie Pathogene, Zellschädigungen oder Reizstoffe (23). Der Körper reagiert auf einen inflammatorischen Reiz mit Schmerz, Hitze, Rötung, Schwellung und Funktionsverlust des betroffenen Gewebes mit dem Ziel, den inflammatorischen Reiz zu beseitigen. Diese offensichtlichen inflammatorischen Symptome wurden als die Kardinalzeichen Dolor, Calor, Rubor und Tumor bereits 38-30 v. Chr. durch den römischen Arzt Celsus beschrieben. Durch Rudolf Virchow wurde der Funktionsverlust (*functio laesa*) ergänzt (24).

Diese makroskopisch erkennbaren Zeichen der Inflammation gehen mit einer Vielzahl an Veränderungen auf molekularer, zellulärer und Organismusebene einher. Dementsprechend zahlreich sind die Proteine, die als Inflammationsmarker im peripheren Blut in Frage kommen. Für das Extrembeispiel Sepsis sind mehr als 178 verschiedene Parameter eingehender auf ihren prognostischen und diagnostischen Wert hin untersucht worden (25). Diese lassen sich grob in 9 Gruppen einteilen:

Cytokine/Chemokine

Kleine Proteine (< 20 kDa) oder Oligopeptide, die das Verhalten von Zellen beeinflussen können, dazu zählen beispielsweise Interleukine (26).

Zelluläre Differenzierungsmarker

Proteine auf Zelloberflächen, die eine Differenzierung erlauben. Sie kommen in zellulärer und löslicher Form vor, und können entweder durchflusszytometrisch oder über Immunoassays bestimmt werden (27).

Rezeptoren

Durch den vermehrten Zelltod bei akuter Inflammation finden sich zahlreiche lösliche Rezeptoren bzw. deren Bestandteile im Patientenserum, die als Biomarker dienen können.

Blutgerinnungsfaktoren

Inflammation aktiviert die Koagulation und reduziert den Abbau von Fibrin. Gerinnungsparameter können als Biomarker eingesetzt werden (28).

Marker der Schädigung des vaskulären Endothels

Im Zuge der inflammatorischen Antwort kann es zu Schädigungen des vaskulären Endothels kommen. Dessen Bestandteile lassen sich auch peripher nachweisen.

Marker der Vasodilatation

Die inflammatorische Schwellung des Gewebes kommt durch lokale Vasodila-

tation zustande, deren Signalmoleküle sich ebenfalls im peripheren Blut nachweisen lassen.

Marker des Organversagens

Bei schweren Verläufen mit Organschädigung können organspezifische Proteine im Serum/Plasma nachgewiesen werden. Außerdem kann es zum Nieren- oder Leberversagen kommen.

Akutphaseproteine

Diese Proteine dienen der Regulation der akuten Phase der Inflammation, und sind damit klassische Inflammationsmarker.

Weitere assoziierte Proteine

Durch die komplexen Vorgänge während einer inflammatorischen Erkrankung sind zahlreiche weitere Moleküle prinzipiell als Biomarker geeignet. Dazu gehören beispielsweise so unterschiedliche Moleküle wie zellfreie DNA (cfDNA), Lactat und Harnsäure.

Mit einer inflammatorischen Reaktion einher gehen zahlreiche pathophysiologische Veränderungen. Diese Veränderungen können als Biomarker zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der inflammatorischen Antwort des Körpers gemessen und bewertet werden. Die Herausforderung ist, einen für eine bestimmte Fragestellung geeigneten Inflammationsmarker zu finden.

1.2.1 Inflammationsmarker in der Pneumoniediagnostik

Neben dem oben genannten Einordnungsschema für Inflammationsmarker lassen sich speziell Pneumonie-Biomarker in 3 Gruppen einteilen: Inflammationsmediatoren, Akutphaseproteine und stressinduzierte Proteine (29). Mikroorganismen werden durch Kulturen, Mikroskopie oder PCR nachgewiesen. Der Nachweis eines Pathogens allein bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass dieses auch pneumonieauslösend ist (siehe 1.1.2.2). Inflammationsmediatoren sind Cytokine, die direkt aufgrund eines inflammatorischen Reizes gebildet werden; dazu gehören $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF\alpha$ und $IL-8$. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit, niedrigen Spezifität und der Existenz von natürlichen inhibierenden Faktoren im Serum sind diese in der Regel jedoch nicht für diagnostische Zwecke geeignet (30, 31). Einige Studien weisen jedoch darauf hin, dass sie in manchen Fällen von Nutzen für die Pneumoniediagnostik sein können (32).

1.2.1.1 Pentraxine und CRP

Die Pentraxine sind eine Familie von Akutphase-Proteinen, die evolutionär hochkonserviert sind. Sie erkennen als Bestandteile des angeborenen Immunsystems bestimmte pathogenassoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPS). Aufgrund ihrer Primärstruktur lassen sie sich in kurze und lange Pentraxine einteilen. Das C-Reaktive Protein (CRP) und die Serum Amyloid P Komponente sind archetypische kurze Pentraxine, das Longpentraxin 3 (PTX3) ist ein typisches langes Pentraxin (33, 34). Plasmapentraxine sind unter normalen Umständen kaum nachweisbar, werden aber während einer inflammatorischen Reaktion stark exprimiert, und stellen damit gute Surrogatmarker dar.

Das CRP ist der heute am häufigsten gemessene Inflammationsmarker (35). Er wurde 1930 zuerst aus dem Serum von Pneumoniepatienten nachgewiesen, wobei die Serumkonzentrationen bei Ausheilung der Krankheit abnahmen. Bei gesunden Menschen war es hingegen nicht nachweisbar (35, 36). CRP bindet kalziumabhängig verschiedene PAMPs, die in Bakterien, Pilzen und Parasiten vorkommen, und ist an deren Beseitigung beteiligt. CRP wird von Hepatocyten nach Induktion durch Il-6 gebildet, wobei andere Cytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und Il-1 β auch eine Rolle spielen. Bei gesunden Erwachsenen liegt der Serumspiegel unter 0,3 mg/dL (37). Die Sekretion beginnt 4-6 Stunden nach der Stimulation, und erreicht ein Maximum nach etwa 36-50 h. Ist der inflammatorische Stimulus beseitigt, fällt die CRP-Serumkonzentration mit einer Halbwertszeit von 19 h (35). Der Serum CRP-Spiegel ist bei Pneumoniepatienten deutlich erhöht, was aber auch auf die meisten anderen inflammatorischen Erkrankungen zutrifft. CRP ist demnach ein allgemeiner Inflammationsmarker ohne Spezifität für Pneumonien. Der CRP-Wert kann allerdings eingesetzt werden, um das Ansprechen des Patienten auf antimikrobielle Therapie zu untersuchen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in einer Kohorte von 64 HAP-Patienten der Abfall des CRP 10 Tage nach Einlieferung zwischen gutem und schlechtem Ansprechen auf die Therapie unterscheiden konnte, mit Mortalitätsraten von 53% verglichen mit 20 % (38). Der CRP-Wert von CAP-Patienten, die auf eine antimikrobielle Therapie ansprechen, sollte 72-96 h nach Beginn der Therapie um 30-50 % sinken. Patienten, bei denen die CRP-Serumkonzentration konsistent sinkt, sprechen generell besser auf eine antimikrobielle Therapie an (39).

1.2.1.2 Procalcitonin

Procalcitonin (PCT) ist ein Prohormon mit einer Masse von 13 kDa, das von den Parafollikelzellen der Schilddrüse gebildet wird, und bei gesunden Personen in Konzentrationen deutlich unter 0,1 mg/mL im Serum vorhanden ist. Liegt ein inflamma-

torischer Stimulus vor, kann seine Serumkonzentration um das 1000-Fache ansteigen, wobei auch andere Gewebe als die Schilddrüse an der Bildung beteiligt sind (40). Nach einem septischen Stimulus kann eine PCT-Proteinproduktion von Parenchymzellen nach 10 Stunden nachgewiesen werden; PCT besitzt eine Halbwertszeit von 22-35 h (41, 42). Da ein schnell fallender PCT Serumspiegel auf ein gutes Ansprechen des Patienten auf eine antimikrobielle Therapie hindeuteten, konnte durch die Messung des PCT die Dauer des Antibiotikaeinsatzes bei CAP-Patienten von Median 12 auf 5 Tage reduziert werden (43). Der PCT-Wert steigt dabei vor allem bei bakteriell verursachten Infektionen an; daher könnten viral verursachte Pneumonien eventuell übersehen werden.

1.2.1.3 Interleukin-6

Interleukin-6 gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Interleukine, und ist ein Signalmolekül des Immunsystems. Es wird beispielsweise von T-Zellen und Makrophagen zur Stimulation des Immunsystems ausgeschüttet, und führt unter anderem in Hepatocyten zur Synthese von Akutphaseproteinen wie CRP. Innerhalb von Stunden steigen die IL-6 Plasmawerte auf über 1000 pg/mL an; nach erfolgter Immunreaktion normalisieren sich die Werte mit einer sehr kurzen Halbwertszeit wieder. IL-6 steigt nach einem inflammatorischen Reiz schneller als CRP an, und ist im Gegensatz zu diesem nicht von der Funktion der Leber abhängig. Zudem besitzt es eine kürzere Halbwertszeit; IL-6 erreichte beispielsweise nach Hüftoperationen in weniger als 48 h wieder Normalwerte, während CRP sich erst nach 157 h wieder normalisierte (44). Die relativ kurze Halbwertszeit und die geringen Serumkonzentrationen können allerdings zu einer hohen intraindividuellen Variabilität führen (45). Wie das CRP ist es ein genereller Inflammationsmarker ohne Organspezifität, der auch bei nichtinfektiösen Ursachen der Inflammation ansteigt (46).

1.2.2 Chitinase 3-like 1 (YKL-40)

Das hier YKL-40 genannte Protein wurde seit 1985 in vielen verschiedenen Geweben und Zelllinien gefunden. Die verwendete Bezeichnung geht zurück auf das Glycoprotein, das 1989 *in vitro* in großer Menge im Überstand der Osteosarkomzelllinie MG63 identifiziert wurde. Das Molekül wurde nach seinen N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L), und seiner molekularen Masse (40 kDa) benannt (47).

Dieses Molekül ist identisch mit einem von differenzierten glatten Muskelzellen aus Schweinethoraxexplantaten sezernierten Protein (48), einem Protein, das aus bovinen Milchdrüsensekreten während der nicht-laktierenden Periode isoliert wer-

den konnte (49), sowie einem Heparin- bindenden Protein, das von humanen Synovialzellen sezerniert wird (50). In der Literatur wird eine Anzahl verschiedener Bezeichnungen verwendet. Alternativ zu YKL-40 (47) wird es auch als Human Cartilage glycoprotein-39 (HC gp39) (51), "Breast regressing protein39 Kd"(brp-39) (52), "38 kDa heparin-binding glycoprotein"(gp38k)(53), "Chitinase 3-like1"(CHI3L1)(54), Chondrex (55) und 40 kDa mammary gland protein (MGP-40)(56) bezeichnet. In dieser Arbeit wird das Protein YKL-40, das zugehörige Gen CHI3L1 genannt.

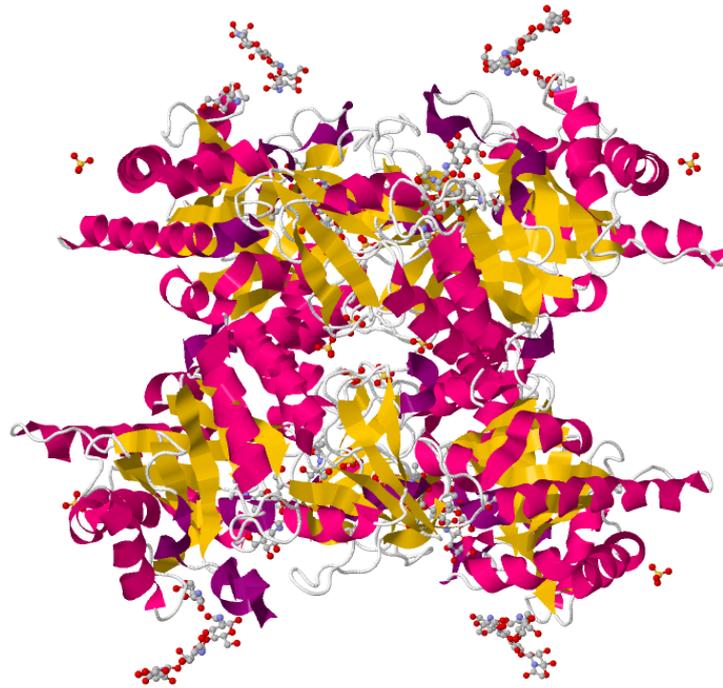


Abbildung 1.2: Struktur von YKL-40 mit 4 gebundenen Chitinresten (Abbildung modifiziert nach Houston *et al.*, PDB-Code: 1hjv). Rot: α -Helices; Gelb: β -Faltblätter.

YKL-40 gehört zwar zur Familie der Chitinasen, durch Mutationen der katalytisch aktiven Glutaminsäure zu Leucin (Position 140) und der Asparaginsäure zu Alanin (Position 138) besitzt es jedoch keine Hydrolaseaktivität. Allerdings bindet YKL-40 Chitin verschiedener Länge (Abbildung 1.2), und 9 Zuckerbindungsstellen finden sich in der Bindungstasche (57, 58). YKL-40 wird N-glycosiliert an Asparagin (Asp 60), und Elektronendichtemessungen zeigen zwei $\beta(1,4)$ -verbundene GlcNAc-Reste. Diese Glycosilierung stellt für YKL-40 ein Alleinstellungsmerkmal unter den Chitinasen dar. Des Weiteren bindet YKL-40 Heparin (53) und besitzt zwei potentielle Bindestellen für Hyaluronsäure, wobei die Interaktion noch nicht kristallografisch nachgewiesen werden konnte (59). In Monozyten ist eine YKL-40-Expression *in vitro* nicht nachweisbar, wird aber während der Differenzierung stark induziert (60, 54, 61, 62). In neutrophilen Granulozyten wird YKL-40 in den spezifischen Granula eingelagert,

und nach der vollständigen Aktivierung der Neutrophilen ausgeschüttet (63, 64). Glatte Muskelzellen exprimieren *in vitro* ebenfalls YKL-40 (48, 65). Expression von YKL-40 findet in end-stage Osteoblasten und osteophytischem Gewebe an Stellen der Knochenbildung statt (66). Das Hippocampusgewebe von Schizophreniepatienten zeigt im Vergleich mit Kontrollen erhöhte Expression von YKL-40 (67), weshalb es auch als Marker für Selbst-Transzendenz diskutiert wird.

Immunhistochemische Färbungen zeigen eine Expression von YKL-40 in fibrotischem Lebergewebe, allerdings nicht direkt aus den Hepatocyten (68, 69).

YKL-40 wird bei inflammatorischen Vorgängen vor allem von Makrophagen (61, 62, 70), Neutrophilen (63, 64) und Epithelzellen (71, 72, 73) gebildet.

1.2.2.1 Biologische Funktion

Die genaue biologische Funktion von YKL-40 ist noch unklar, allerdings gibt es einige Hinweise. YKL-40 könnte einen Zelldifferenzierungsmarker darstellen; die YKL-40-Expression ist beispielsweise erhöht bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (60, 54, 61, 62), der Entwicklung von Mesothelzellen zu Fibroblasten-ähnlicher Morphologie (74), bei der Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen (48, 53, 59) oder bei der Differenzierung von Chondrozyten zu Fibroblasten oder deren Rückentwicklung (75, 76). YKL-40 könnte durch seine Chitinbindungseigenschaften als Chitinsensor wirken, um Makrophagen an den Entzündungsherd zu bringen und die inflammatorische Antwort zu regulieren (58). Durch seine Bindungsstellen für Hyaluronsäure könnte YKL-40 in dessen Synthese eingreifen und damit lokale Hyaluronsäurekonzentrationen beeinflussen (77). Bekannte Interaktionspartner sind Syndecan-1 und IL-13R α 2 auf der Zelloberfläche. Diese Interaktionen können die MAPK/ERK und PI3K/AKT-Signalwege aktivieren, die Rollen bei erhöhter Zellproliferation und Zellüberleben spielen (78, 71). Das Ausschalten von YKL-40 durch spezifische Antikörper führt außerdem bei Tumoren zu verminderter Angiogenese (79).

Das STRING-Tool (80) erlaubt, für bekannte Proteine in einer Interaktionsdatenbank nach wahrscheinlichen Interaktionspartnern zu suchen. Das Tool integriert dabei Informationen aus automatisiertem Textmining, kuratierten Datenbanken sowie experimentelle und genomische Daten. Damit lässt sich ein Interaktionsnetzwerk für YKL-40 erstellen (Abbildung 1.3), um so eventuell weitere interessante Marker zu identifizieren. Interessant bei diesem Netzwerk ist einerseits, dass zwar STAT-3 als Akutphase-Transkriptionsfaktor, sowie die Interleukine 8 und 18 gefunden werden, nicht aber IL-6, Syndecan-1 oder IL-13R α 2. Andererseits werden EGFR und MMP-9 häufig zusammen mit YKL-40 in wissenschaftlichen Texten erwähnt, was eine noch nicht experimentell bestimmte Interaktion nahe legt. Da beide am Um-

bau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, wäre eine synergistische Interaktion denkbar.

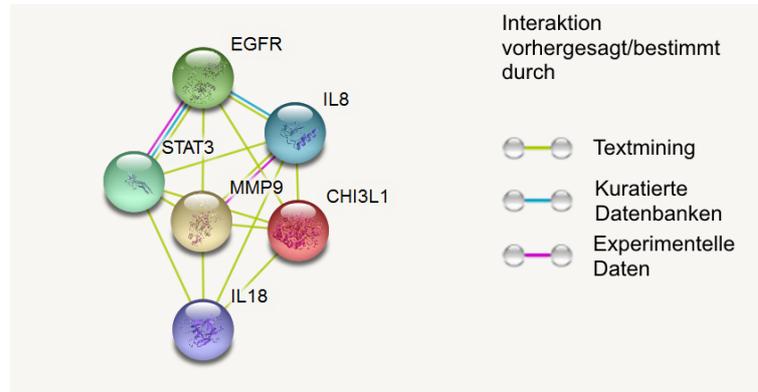


Abbildung 1.3: Mit dem STRING-Tool (80) erstellte Interaktionsanalyse (Minimaler Interaktionsscore 0,4, angezeigte Interaktionspartner 5). Die Farbe und Anzahl der Linien zwischen den Knoten gibt die Art der in der Datenbank gespeicherten Interaktionsdaten an. Der relative Abstand der Knoten ist ein Anhaltspunkt für die Wahrscheinlichkeit der Interaktion. CHI3L1: YKL-40; MMP-9: matrix-metalloprotease-9; EGFR: endothelial growth factor receptor; IL-8: interleukin-8; IL-18: interleukin-18; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3.

1.2.2.2 YKL-40 in der Pneumoniediagnostik

Durch seine generelle Eignung als Inflammationsmarker ist YKL-40 für viele Krankheitsbilder interessant; hier soll vor allem seine Bedeutung für inflammatorische Lungenerkrankungen untersucht werden.

Mutationen im CHI3L1-Gen korrelieren mit reduzierter Lungenfunktion, bronchialer Hyperreaktivität und sind ein Risikomarker für Asthma, was eine Rolle des Genprodukts bei Lungenerkrankungen nahelegt. Erhöhte YKL-40-Serumpegel sind ein Marker für Asthma und eine Abnahme der Lungenfunktion (81).

Menschliche bronchiale Epithelzellen exprimieren *in vitro* YKL-40 im Ruhezustand, und regulieren diese Produktion nach mechanischem Stress um das 4-fache herauf. Daher können in einer entzündeten Lunge die Epithelzellen direkt zu erhöhten YKL-40-Serumwerten beitragen (72). Die YKL-40-Serumkonzentration korreliert im Gegensatz zu anderen Inflammationsmarkern mit der Schwere der Pneumonie nach PSI (Pneumonia severity index) und CURB65 (82), aber nicht alle Studien finden diese Korrelation (83).

Auch bei idiopathischen interstitiellen Pneumonien ist YKL-40 erhöht, wobei die höchsten Werte bei Patienten mit der höchsten Rate an Fibrose gemessen werden (84). Auch für die COPD konnte gezeigt werden, dass das aus Sputum oder Serum gemessene YKL-40 mit der Schwere der Erkrankung korreliert (85).

YKL-40 ist bei bakteriellen Pneumonien stark erhöht, und erreicht nach erfolgreicher Antibiotikabehandlung bereits nach einer Woche wieder normale Werte, während CRP in Folge der Behandlung langsamer zurückgeht. Dabei verläuft Serum-YKL-40 parallel zu Markern wie Lactoferrin und NGAL (86). Lactoferrin ist ein Protein aus der Familie der Transferrine, das am höchsten konzentrierte Protein in spezifischen Granula und wirkt durch seine Protease- und Eisenbindungseigenschaften antibakteriell (87); NGAL (Neutrophil-gelatinase-associated lipocalin) ist ebenfalls in den spezifischen Granula von Neutrophilen eingelagert, und durch Eisenbindung an der Immunabwehr beteiligt (88). Der parallele Verlauf dieser Marker mit YKL-40 ist ein weiterer Hinweis darauf, dass YKL-40 aus aktivierten Neutrophilen stammt und damit nicht in der Leber, sondern direkt am Herd der Inflammation ausgeschüttet wird.

Das Serum-YKL-40 ist höher bei Patienten mit Pneumonien, verglichen mit Asthmapatienten und solchen mit Lungenkarzinomen. Außerdem fallen die YKL-40-Werte deutlich mit der Besserung der Symptome ab; damit hat es Potential als Marker für das Monitoring von Pneumonien. Ein direkter Vergleich von Pneumonien mit anderen Erkrankungen, die YKL-40 erhöhen können, steht allerdings noch aus (89).

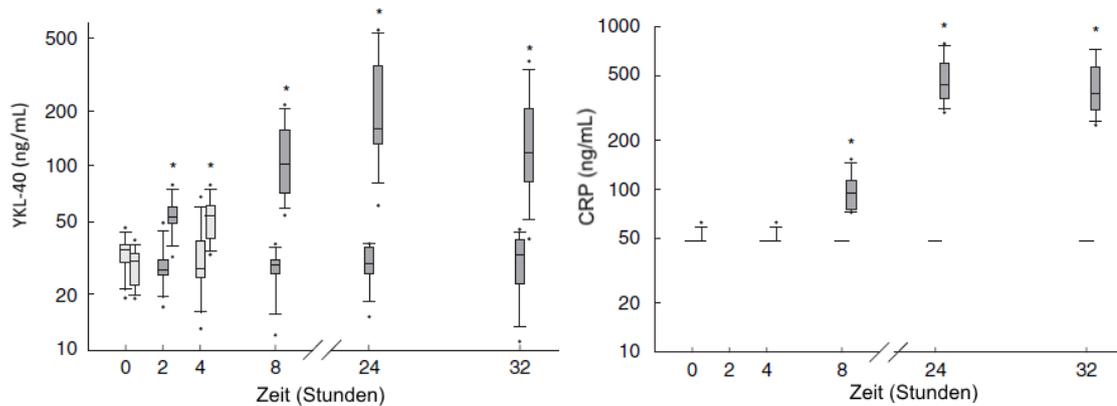


Abbildung 1.4: Änderungen der YKL-40- und CRP-Plasmakonzentrationen nach intravenöser Verabreichung von *E. Coli* Endotoxin (jeweils zweiter Boxplot n=8) oder Ringerlösung (jeweils erster Boxplot, n=8) an insgesamt 16 gesunde Probanden. Die YKL-40-Plasmakonzentrationen steigen deutlich früher als die von CRP. Abbildung nach Johansen *et al.* (77).

1.2.2.3 Eignung als Biomarker

Neben den biologischen Voraussetzungen spielen für einen Biomarker auch Eigenschaften wie Stabilität in der Probe und natürliche Varianz innerhalb gesunder Populationen eine Rolle.

Wiederholte Auftauzyklen haben keine Auswirkungen auf die Messung von YKL-40 im Serum. Die Proben sollten allerdings von dem Clot getrennt werden, da sich die YKL-40-Konzentration mit der Zeit erhöht, wenn die Probe noch Kontakt mit den Blutzellen hat. Daher sollte das Serum spätestens nach 8 Stunden durch Zentrifugation von den Blutzellen getrennt werden (90). Bei -80 °C ist YKL-40 mindestens 15 Jahre haltbar (91). Bei Gesunden zeigt es nur geringe Schwankungen nach Tageszeit, und bleibt bei gesunden Individuen über Monate bis Jahre hinweg in einem konstanten Bereich (92), andererseits steigt der YKL-40-Plasmaspiegel mit dem Alter über lange Zeiträume an. Das Geschlecht hat keinen Einfluss auf den YKL-40-Wert (91). Nach der Injektion von Endotoxin steigt der YKL-40-Pegel bereits nach 2 Stunden deutlich an, und erreicht nach 24 h ca. das 5-Fache des Ausgangswertes (93),(Abbildung 1.4).

YKL-40 ist demnach für die Pneumoniediagnostik interessant, ist aber noch bei vielen anderen Erkrankungen in erhöhter Konzentration messbar. Diese Studie soll zeigen, ob YKL-40 in einem Patientenkollektiv mit generellen inflammatorischen Symptomen einen diagnostischen Wert für Pneumonien besitzt.

Dafür werden die YKL-40-Konzentrationen mit Hilfe von verschiedenen, neuen Immunoassays bestimmt.

1.3 Immunoassays

Immunoassays sind auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhende Nachweisverfahren, die sich zur sensitiven und spezifischen Detektion von Analyten in komplexen Matrices wie humanem Serum oder Plasma eignen (94, 95). Seit ihrer Entwicklung wurden zahlreiche Modifikationen des ursprünglichen Assaymodells entwickelt, wobei das Grundprinzip beibehalten wurde. Auch wenn alternative Erkennungsstrukturen existieren, basiert der überwiegende Großteil der heute verwendeten Immunoassays auf der spezifischen Interaktion von Antikörpern mit ihrem Antigen. Dieses spezifische Bindungsereignis wird durch eine geeignete Verstärkung einer Messung zugänglich gemacht. Um eine quantitative Auswertung der erhaltenen Signale zu ermöglichen, wird der Analyt als Verdünnungsreihe mit der Methode gemessen, und die Ergebnisse mit denen der Probe verglichen (siehe 1.3.1.4). Die Form dieser Kalibrierfunktion hängt dabei vom Assaydesign ab (Abbildung 1.5).

Am häufigsten eingesetzt werden dabei heterogene Immunoassays, bei denen ein Bestandteil der Immunreaktion auf einer festen Phase gebunden ist. Diese kann beispielsweise durch eine Mikrotiterplatte gebildet werden, aber auch in Suspension befindliche Beads oder Transducer von Biosensoren können als feste Phase dienen. Seltener sind homogene Immunoassays, bei denen alle Reagenzien frei in Lösung vorliegen. Unterschieden werden kompetitive und nichtkompetitive Immunoassays.

Bei direkten Immunoassays wird das Antigen an die Oberfläche fixiert, und die Menge interagierender Antikörpers bestimmt. Die Kalibrationskurve ist hier monoton steigend (Abbildung 1.5 A). Beim Sandwich-Immunoassay wird ein Antikörper an die Festphase gebunden, in der Probe befindliches Antigen interagiert mit diesem und wird im nächsten Schritt durch einen Detektionsantikörper nachgewiesen. Ein höheres Signal zeigt eine höhere Konzentration (Abbildung 1.5 B). Bei kompetitiven Assays konkurriert in der Lösung befindliches Antigen mit dem an der Festphase gebundenen um eine feste Konzentration zugegebenen Antikörper. Je mehr Antigen in der Lösung vorhanden ist, desto niedriger ist hier die Anbindung an die Festphase (Abbildung 1.5 C). Es ist möglich, den Detektionsantikörper mit dem Antigen zusammen zu geben, um Zeit und Verarbeitungskomplexität zu sparen. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass ein starkes Überangebot von Antigen beide Antikörper absättigen kann, und so falsch niedrige Signale entstehen können. Dieser sog. High-Dose-Hook-Effekt kann bei diesem Modell nicht vermieden werden, sondern nur durch die Verwendung von mindestens zwei verschiedenen Verdünnungen der Probe erkannt werden. Ist das aus Gründen der verfügbaren gleichzeitigen Messungen auf der Plattform nicht möglich, muss der Assay in einem Bereich kalibriert werden, der diesen Effekt bei realen Proben so weit wie möglich ausschließt.

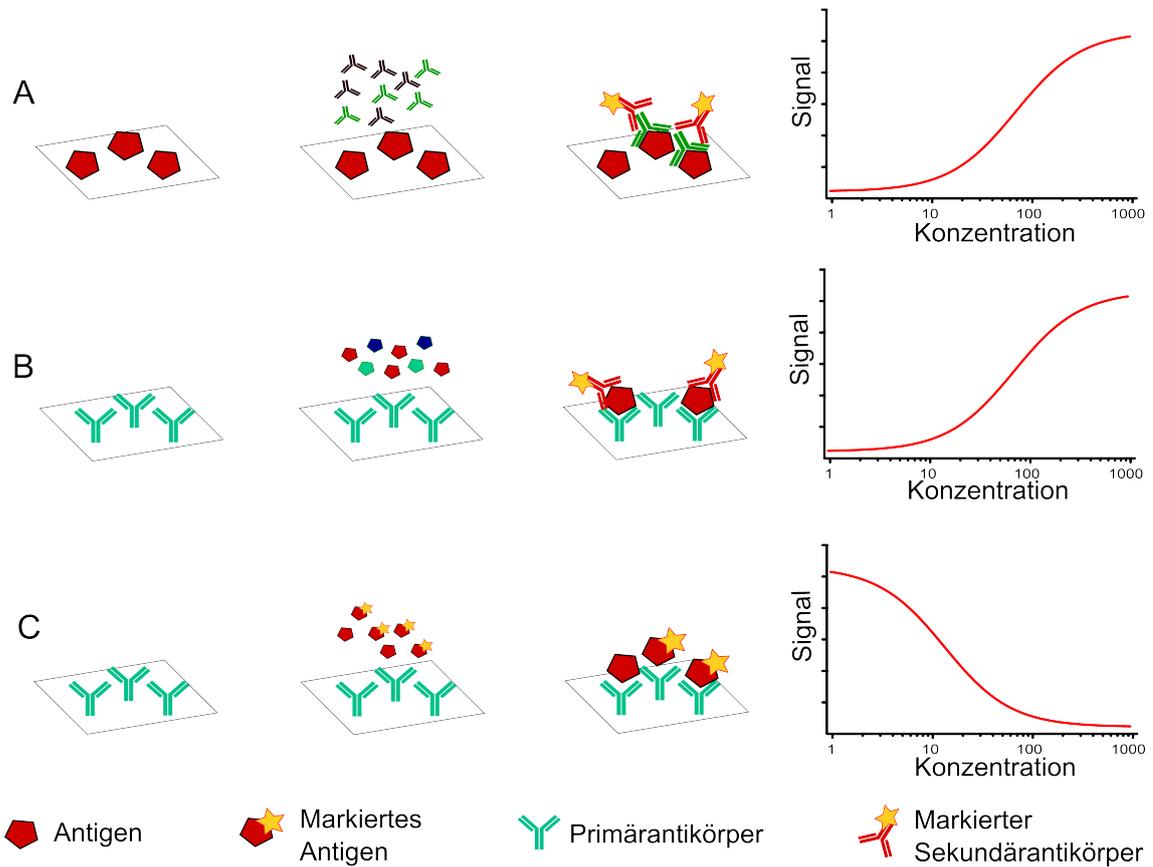


Abbildung 1.5: Ablauf und exemplarische Kalibrierung verschiedener Immunoassay-Formate. A) Ein Antigen ist auf der Festphase gebunden, der dafür spezifische Antikörper wird nachgewiesen. Die Kalibrierungsfunktion ist monoton steigend. B) Beim Sandwich-Immunoassay ist ein Capture-Antikörper an der Festphase gebunden, und interagiert mit dem in der Probe enthaltenen Antigen. Der Nachweis erfolgt über einen Sekundärantikörper. Die Kalibrierfunktion steigt mit höherer Antigenkonzentration. C) Antikörper ist an der Festphase gebunden. Eine variable Konzentration von Antigenen in der Probe konkurriert mit einer festen Konzentration markierten Antikörper um die limitierten Bindestellen. Die Kalibrationsfunktion fällt mit steigender Konzentration von unmarkiertem Antigen in der Probe.

Die in Immunoassays verwendeten Antikörper können mono- oder polyklonal sein. Monoklonale Antikörper gehen auf einen einzelnen Zellklon zurück, und sind häufig spezifischer als polyklonale Antikörper, die mehrere verschiedene Epitope binden können. Polyklonale Antikörper sind einfacher und günstiger in der Herstellung, da die für monoklonale Antikörper notwendige Herstellung und Selektion von Hybridomazellen entfällt. Durch ihre Heterogenität sind sie auch stabiler gegenüber Änderungen der Ionenkonzentration und des pH-Wertes (96). Polyklonale Antikörper können von Vorteil sein, wenn hohe Affinität benötigt wird, und die nachzuweisenden Antigene heterogen sind. Andererseits können sich ihre Eigenschaften von Charge zu Charge verändern, wodurch die Reproduzierbarkeit eingeschränkt werden kann. Mit der Verwendung von monoklonalen Antikörpern kann hingegen die Spezifität des Assays verbessert werden, und die Ergebnisse über Antikörperpräparationen hinweg reproduzierbarer. Da von monoklonalen Antikörpern nur ein Epitop erkannt wird, ist die Auswahl des richtigen Klons ausschlaggebend, wobei dieser Nachteil durch Verwendung von Gemischen verschiedener monoklonaler Antikörper teilweise umgangen werden kann (96).

Die Nachweisgrenzen von Immunoassays sind stark abhängig von der Affinität der verwendeten Antikörper, und bewegen sich im nano- bis pikomolaren Bereich. Die Kinetik der Antigen-Antikörperreaktion ist temperaturabhängig; da diese Reaktionen bei Säugetieren üblicherweise bei 37 °C ablaufen, ist zu erwarten, dass die Eigenschaften der Antikörper für diese Temperatur optimiert sind. Unter optimalen Bedingungen könnte durch einen Sandwichassay theoretisch bereits ein einzelnes Molekül in der Probe nachgewiesen werden. Unter realen Bedingungen würde das Signal allerdings deutlich unter die Nachweisgrenze fallen (siehe 1.3.1.3).

Bei enzymgestützten Immunoassays werden die Antikörper mit Enzymen gekoppelt, um das Signal zu erzeugen. Der daraus resultierende Substratumsatz ist dann proportional zu dem ursprünglich enthaltenen Antigen. Der Vorteil gegenüber Radioimmunoassays ist eine vergleichsweise längere Haltbarkeit und der Verzicht auf radioaktive Stoffe (95). Für die Enzymreaktion verwendet werden z.B. alkalische Phosphatase, beta-Galactosidase oder Meerrettich-Peroxidase.

Alternativ können in Immunoassays auch Nachweismethoden wie Bindungsabhängiger FRET-Effekt (siehe Abbildung 1.8), Immunturbidimetrie oder Nephelometrie eingesetzt werden, bei denen keine Enzyme verwendet werden.

Immunoassays unterscheiden sich neben dem Aufbau hinsichtlich ihrer analytischen Leistungsfähigkeit. Diese wird durch statistisch definierte Kennzahlen beschrieben.

1.3.1 Kenngrößen zur Charakterisierung von Immunoassays

Die wichtigsten Kenngrößen zur Bewertung der Leistungsfähigkeit eines Immunoassays sind Meßbereich, Nachweisgrenze, Linearität bzw. Signal-Konzentrations-Funktion, Selektivität, Stabilität gegen Interferenzen, Präzision und Richtigkeit. Die genauen Definitionen dieser Kennzahlen können sich je nach Quelle unterscheiden. Die hier angeführten stammen aus dem Lehrbuch "Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis"(97), soweit nicht anders angegeben. Neben diesen Kennzahlen ist für die Bewertung auch der zum Einsatz des Verfahrens notwendige monetäre und zeitliche Aufwand wichtig, was vor allem bei der Umstellung auf POC-Verfahren eine wichtige Rolle spielt.

1.3.1.1 Präzision und Richtigkeit

Präzision (Precision) und Richtigkeit (Accuracy) sind wichtige Kennzahlen eines analytischen Verfahrens. Nach allgemeiner Definition schränkt das Ausmaß der zufälligen Fehler die Präzision ein, während die systematischen Fehler die Richtigkeit bestimmen. Diese Kennzahlen werden festgestellt, indem ein bestimmter Analyt aus einer Probe mehrere Male mit einer Methode gemessen wird, wobei der wahre Wert zur Abschätzung der Richtigkeit bekannt sein muss. Die Präzision wird durch die Abweichung wiederholter Messungen des gleichen Materials um einen Mittelwert ausgedrückt. Entspricht dieser Mittelwert dem wahren Wert, ist die Forderung nach Richtigkeit erfüllt. Das Ausmaß der Abweichung davon beschreibt die Unrichtigkeit.

1.3.1.2 Experimentelle Bestimmung der Unpräzision

Zur Ermittlung der Unpräzision werden eine oder mehrere Proben des gleichen Materials mehrere Male untersucht, und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Dabei wird die Unpräzision innerhalb einer Serie (Intraassay) von der Unpräzision zwischen Serien (Interassay) unterschieden. Streuen die Messwerte x_i nach Art einer Gauß'schen Normalverteilung um einen Mittelwert \bar{x} , berechnet sich die Unpräzision wie folgt:

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1.1)$$

$$\text{Standardabweichung: } s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1.2)$$

Die relative Standardabweichung bzw. der prozentuale Variationskoeffizient (VK (eng. coefficient of variation CV) wird errechnet, indem man die Standardabwei-

chung zum zugehörigen Mittelwert ins Verhältnis setzt:

$$\text{Variationskoeffizient} = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) * 100\% \quad (1.3)$$

Die Unpräzision hängt von der Konzentration des Analyten ab. Trägt man die relative Standardabweichung gegen die Konzentration auf, erhält man ein Präzisionsprofil. Die Grenzen des Messintervalls kann man als die Punkte festlegen, an denen das Präzisionsprofil einen bestimmten Wert, häufig 20 %, unterschreitet. Bei sehr geringen Konzentrationen ist die relative Standardabweichung definitionsgemäß sehr hoch. Mit steigenden Konzentrationen sinkt die Kurve, und erreicht bei einer bestimmten Konzentration ein Minimum, um dann typischerweise wieder anzusteigen. Den niedrigsten Messwert, bei dem eine bestimmte Grenze des Interassay-Variationskoeffizienten, häufig 20 %, unterschritten wird, bezeichnet man auch als funktionelle Assaysensitivität (98). Diese unterscheidet sich häufig von der analytisch bestimmten Nachweisgrenze (siehe 1.3.1.3). Die meistens verwendeten Doppelbestimmungen dienen nicht nur der Verbesserung von Präzision oder Richtigkeit, sondern auch dem Aufspüren von Ausreißern. In die Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes geht nur die Quadratwurzel der Anzahl der Messungen ein. Damit reduziert sich bei Doppelbestimmung der Standardfehler nur um den Faktor 0,71, allerdings bei verdoppelten Kosten.

1.3.1.3 Nachweisgrenzen

Als analytische Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD oder L_D) wird die kleinste Konzentration bezeichnet, die bei Verwendung einer Methode mit einer definierten statistischen Wahrscheinlichkeit vom Leersignal unterschieden werden kann. Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ oder L_Q) ist die kleinste Konzentration, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Für die Berechnung der Nachweisgrenzen wird das Signal einer Probe ohne enthaltenen Analyt mehrere Male bestimmt, wobei die Messmethode vollständig ausgeführt wird. Der numerische Wert der Nachweisgrenzen errechnet sich dann wie folgt (99):

$$L_D = \bar{x}(c_0) + 3 * s \quad (1.4)$$

$$L_Q = \bar{x}(c_0) + 10 * s \quad (1.5)$$

1.3.1.4 Kalibrierfunktion

Eine Kalibrierfunktion stellt "eine funktionale Beziehung zwischen dem Erwartungswert der Messgröße und dem Wert der Zustandsgrößendifferenz" (100) her. Zustands-

größe kann dabei in dieser Norm eine Konzentrationsdifferenz, Intensitätsänderung oder geometrische Verformung bedeuten. Diese Funktion ist dabei eine gedankliche Modellvorstellung, die nicht durch einen Versuch ermittelt werden kann, sondern durch Kalibrierung geschätzt werden muss. Idealerweise entspricht die Kalibrierfunktion genau dem Verlauf der Messwert-Konzentrationsbeziehung. Da diese aus praktischen Gründen nicht beliebig genau bestimmt werden kann, muss der Verlauf der Kalibrierfunktion so nah wie möglich an die vorhandenen Messwerte und damit den wahren Verlauf approximiert werden (101). Der einfachste Fall ist dabei eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Konzentration und erhaltenem Signal. Die typischen Kalibrierfunktionen von Immunoassays weisen jedoch einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen diesen Größen auf. Eine alleinige Betrachtung der linearen Abschnitte der Kalibrierfunktionen würde hier zu einer unnötigen Einschränkung des Messbereichs führen (102). Verschiedene Anpassungen der logistischen Funktion werden häufig zur Beschreibung dieses Zusammenhangs verwendet, wobei mehr Freiheitsgrade eine verbesserten Anpassung an nicht ideale Kurvenverläufe erlauben. Dabei muss allerdings darauf geachtet werden, dass keine Überanpassung erfolgt, also das verwendete Modell den tatsächlichen Kurvenverlauf beschreibt und nicht auf zufällige Messungenauigkeiten reagiert (103). Die am häufigsten verwendete Parametrisierung ist die 4-Parameter-Logistikfunktion (4PL):

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} \quad (1.6)$$

Einer der Vorteile dieser Funktion ist, dass die Parameter direkt nützliche Informationen liefern wie das minimale und maximale Signal (D und A), sowie die Konzentration und die Steigung im Testmittelpunkt (C und B) (Abbildung 1.6). Eine Erweiterung zur 5-Parameter-Logistikfunktion (Gleichung 1.7) erlaubt auch die Berücksichtigung der Asymmetrie (104).

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)^E} \quad (1.7)$$

Durch den einfachen Zugriff auf diese Kennzahlen ist Gleichung 1.6 im analytischen Bereich weit verbreitet. Um aus einer Kalibrierfunktion die einem Signal zugehörige Konzentration berechnen zu können, muss diese umgestellt werden. Für die 4PL ergibt sich:

$$X = C * \sqrt[B]{\frac{(A - D)}{(Y - D)} - 1} \quad (1.8)$$

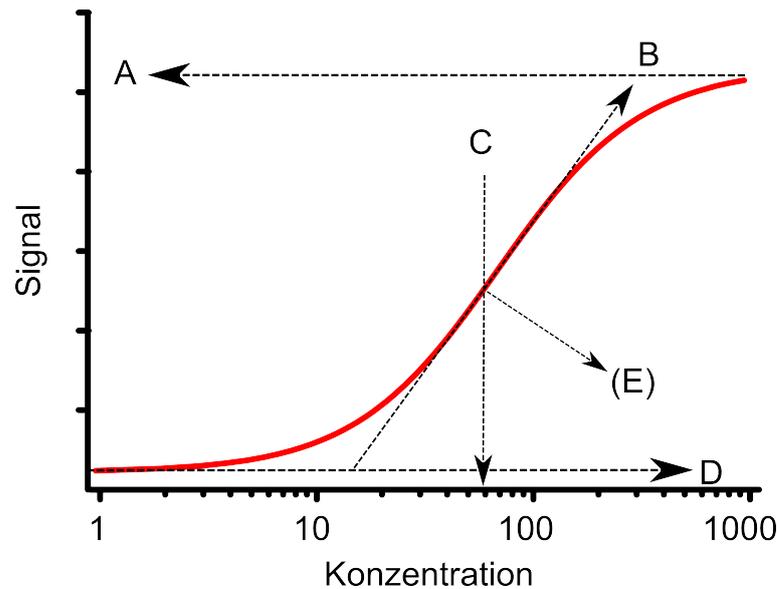


Abbildung 1.6: Bedeutung der Parameter des 4PL-Modells: D: Minimales Signal; A: Maximales Signal; C: Lage des Testmittelpunktes; B: Steigung am Testmittelpunkt; E: Asymmetrie (Nur 5PL)

1.3.1.5 Fehlerquellen und Einschränkungen

Einschränkungen der Richtigkeit oder Präzision können gerade bei komplexen Verfahren und Proben zahlreiche Ursachen haben. Prozessorbedingte Ursachen sind auf die Verfahrenstechnik, Meßtechnik oder die eingesetzten Reagenzien zurückzuführen, und lassen sich in zufällige und systematische Fehler einordnen. Die zufälligen prozessorbedingten Störungen können unter dem Begriff „Rauschen“ (Noise) zusammengefasst werden. Jedes während der Analyse eingesetzte Gerät zeigt gewisse unvermeidliche Schwankungen in der Dosierung, Messung oder Einstellung, und diese übertragen sich unweigerlich auf das Messergebnis. Systematische Abweichungen der Prozessoren werden als statische oder dynamische Diskalibratoren bezeichnet. Ist zum Beispiel bei einem Messgerät die Temperatur dauerhaft falsch eingestellt, wäre dies ein statischer Diskalibrator. Zeigt die Temperatur Schwankungen, ist dies ein dynamischer Diskalibrator. Eine wichtige Fehlerquelle ist die Matrix, in der der Analyt gelöst ist. Bei biologischen Proben ist eine sehr hohe Varianz der physikalischen und chemischen Eigenschaften zu beobachten. Außerdem enthalten diese Proben neben dem gesuchten Analyten noch zahlreiche andere Komponenten, die den Ablauf der Messung stören können. Beispielsweise könnten eingesetzte Antikörper weitere Komponenten erkennen, was zu systematischen oder zufälligen Abweichungen führen kann. Außerdem unterscheiden sich Serumproben hinsichtlich ihrer Oberflächenspannungen, Viskositäten, Inhomogenitäten sowie Trübungen und Verfärbungen.

Viele Störfaktoren können durch weitestgehende Automatisierung und interne Re-

ferenzierung umgangen werden. Der Einfluss der Variabilität von Serumproben kann durch Vorverdünnung der Probe zumindest reduziert werden.

1.3.2 Magnetische Partikel in Immunoassays

Magnetische Partikel (Beads) bestehen aus magnetischem Material mit einem durchschnittlichen Durchmesser von wenigen Nanometern bis Mikrometern. Durch eine Vielzahl von Oberflächenmodifikationen können an sie Biomoleküle gekoppelt werden, wie sie in Immunoassays eingesetzt werden. Der große Vorteil beim Einsatz von magnetischen Beads ist, dass sie in der flüssigen Phase der Immunoassay-Reaktion suspendiert vorliegen. Dadurch werden die notwendigen Diffusionswege drastisch verkürzt (105). Dabei erlauben ihre magnetischen Eigenschaften auch eine einfache Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch durch das Anlegen eines externen Magnetfeldes. Grundsubstanz sind häufig Eisenoxide (Magnetit Fe_3O_4 oder Maghemit $\gamma-Fe_2O_3$), die zur Stabilisierung, Aggregationsvermeidung und Oberflächenmodifikation beschichtet werden (106, 107). Die möglichen Beschichtungen sind vielfältig, häufig werden Silizium- oder Goldbeschichtungen eingesetzt. Auch Polymerbeschichtungen, beispielsweise mit Dextranen, Polyethylenglycolen (PEG) und Kombinationen aus Detergenzien, werden dafür verwendet. Durch so eingebrachte Amin- oder Carboxylgruppen lassen sich Biomoleküle an die Beads koppeln (siehe 3.1).

Das Verhalten von derartigen Beads in einem magnetischen Feld ist dabei neben dem Material auch abhängig von ihrer Korngröße. Ferromagnetische Materialien erhalten sich ein großes magnetisches Moment auch ohne das Vorhandensein eines äußeren Magnetfeldes, neigen allerdings deshalb zur Aggregation. Paramagnetische Materialien zeigen ohne äußeres magnetisches Feld keine makroskopische Magnetisierung, richten sich jedoch nach einem äußeren Feld aus, allerdings deutlich schwächer als Ferromagnete.

Superparamagnetismus entsteht bei kleinen Teilchengrößen ferromagnetischer Materialien, wo sie im Gegensatz zu größeren Partikeln ihre Magnetisierung durch thermische Prozesse verlieren. Dabei bleibt allerdings die starke Ausrichtung an einem äußeren Magnetfeld erhalten. Superparamagnetische Materialien verbinden dabei die hohe Magnetisierbarkeit von ferromagnetischen Stoffen, während eine permanente Magnetisierung und damit Aggregation vermieden wird.

1.3.3 Fluoreszenz und Förster-Resonanzenergietransfer

Der Ausleseschritt von Immunoassays basiert häufig auf der Wechselwirkung von Molekülen mit elektromagnetischer Strahlung. Die dabei möglichen Energieübergänge lassen sich in einem Jablonski-Diagramm (Abbildung 1.7) schematisch darstellen.

Absorbiert ein Molekül ein Photon, können die dort angegebenen Relaxationsprozesse ablaufen. Diese Prozesse können strahlungslos (k_S) oder mit der Emission eines Photons verbunden sein. Dabei sind Fluoreszenz (k_F) und Phosphoreszenz zu unterscheiden. Bei der Fluoreszenz (k_F) geht der angeregte Zustand E_1 direkt auf den Grundzustand E_0 über, eine Spinumkehr findet nicht statt. Phosphoreszenz bezeichnet einen Vorgang, bei dem der angeregte Zustand zunächst unter Spinumkehr in einen Triplettzustand übergeht. Das Photon wird bei der Relaxation aus diesem Zustand in den Grundzustand E_0 emittiert.

Die Emission des Photons findet in beiden Fällen innerhalb von 10^{-15} s statt. Die vor der Emission statt findenden Energieübergänge führen jedoch zu unterschiedlichen Verzögerungen und damit Lebensdauern der angeregten Zustände; insbesondere der spinverbotene Übergang in den Triplettzustand der Phosphoreszenz ist äußerst unwahrscheinlich und stabilisiert dadurch den angeregten Zustand. Die Halbwertszeiten liegen bei der Fluoreszenz bei etwa $10^{-10} - 10^{-7}$ s verglichen mit 10^{-3} s im Fall der Phosphoreszenz.

Die emittierten Photonen besitzen üblicherweise eine größere Wellenlänge und damit eine geringere Energie als die Absorbierten. Dieser als Stokes'sche Regel bezeichnete Effekt ist auf strahlungslose Übergänge zurückzuführen, die der Emission des Photons vorangehen (Abbildung 1.7). In Ausnahmefällen können Photonen höherer Energie emittiert werden (Anti-Stokes). Die zusätzliche Energie kann aus der vorangegangenen Absorption eines weiteren Photons oder aus einem thermischen Energievorrat stammen. Der Energieerhaltungssatz wird dabei nicht verletzt.

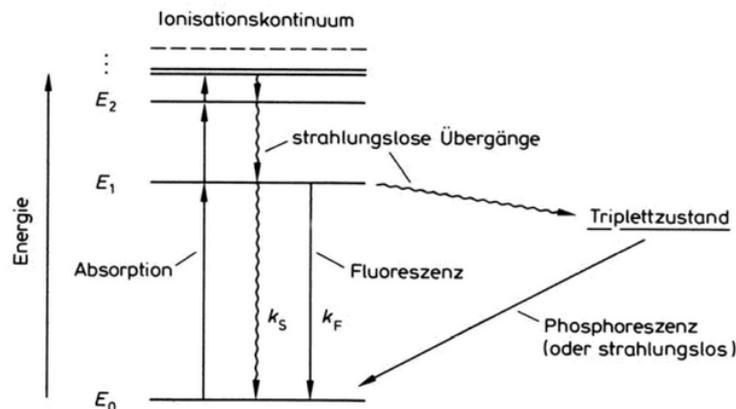


Abbildung 1.7: Moleküle können elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlängen absorbieren. Bei sehr hohen Energien kann das Molekül ionisiert werden, bei geringeren Energien befinden sich die Elektronen in einem angeregten Zustand (E_1). Dieser kann strahlungsfrei (k_S), über die direkte Emission eines Photons (k_F) oder indirekt über einen relativ stabilen Triplettzustand zurück in den Grundzustand gelangen. Vereinfachtes Jablonski-Diagramm aus "Physikalische Chemie und Biophysik"(108).

Die Eigenschaften eines Fluoreszenzfarbstoffes liegen in seiner Struktur und der damit möglichen stabilen angeregten Energiezustände begründet. Üblicherweise handelt es sich um planare, polyaromatische Moleküle. Diese haben aufgrund ihrer Struktur nur eingeschränkte Möglichkeiten zur thermischen Relaxation, wodurch angeregte Zustände stabilisiert werden können.

Es existieren zahlreiche Enzymsubstrate, die aufgrund der enzymatischen Abspaltung beispielsweise eines Phosphatrestes ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, was sie als Substrat für enzymgestützte Immunoassay-(ELISA)-Detektionsreaktionen interessant macht.

Ein anderer Weg, Fluoreszenz für den Nachweis von Immunreaktionen zu verwenden, ist die Ausnutzung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Dabei wird die Energie eines angeregten Farbstoffs nicht über die Emission eines Photons, sondern über den direkten strahlungslosen Transfer auf einen Akzeptor übertragen. Dabei spielen die Absorptions- und Emissionswellenlängen des Donors und Akzeptors, die Orientierung der beteiligten Elektronensysteme sowie die Halbwertszeit des angeregten Zustands eine Rolle. Herausragende Bedeutung für die Verwendung des Effekts in Immunreaktionen hat jedoch seine sehr starke intermolekulare Abstandsabhängigkeit. Die Energieübertragung findet abhängig von den Farbstoffeigenschaften nur in Abständen von 0,5 - 10 nm in nennenswerter Effizienz statt, und liegt damit in der Größenordnung von Proteininteraktionen (109). Damit können beispielsweise kompetitive Immunoassays wie in Abbildung 1.8 realisiert werden. Die Nachweisgrenzen eines solchen Assays sind in hohem Maße von den verwendeten Farbstoffen und deren FRET-Radien, aber auch der Sensitivität des verwendeten Sensors abhängig.

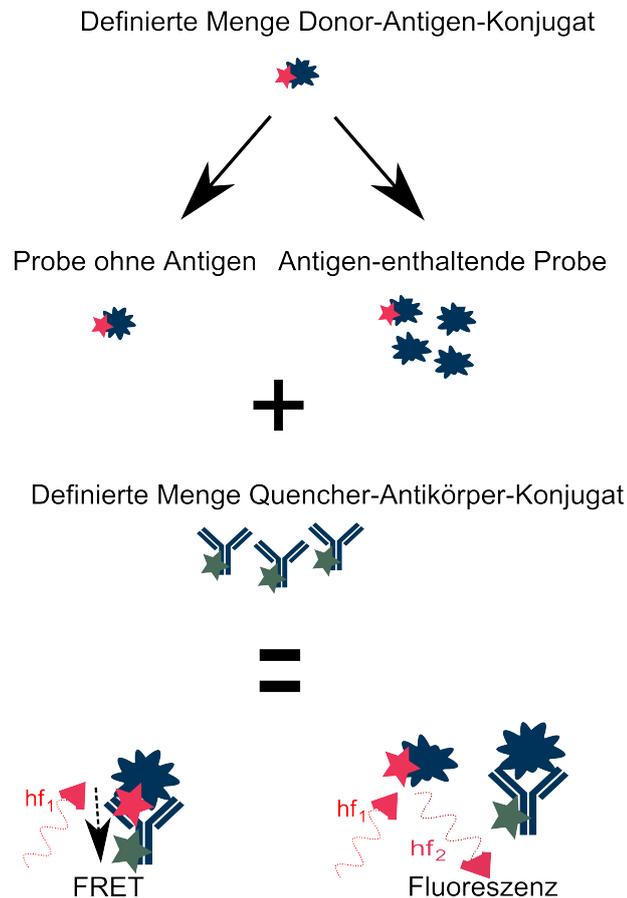


Abbildung 1.8: Möglicher Aufbau eines homogenen, FRET-basierten Immunoassays. Eine definierte Menge Antigen, konjugiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Tracer), wird vorgelegt, und mit der Probe vermischt. Anschließend wird ein Antikörper zugegeben, der mit einem passenden nichtfluoreszierenden Akzeptor-Farbstoff (Quencher) markiert ist. Werden Tracer an die Antikörper gebunden und damit der Abstand auf ca. 10 nm verringert, wird das Fluoreszenzsignal durch den Förster-Resonanzenergietransfer abgeschwächt. Ist in der Probe nicht-markiertes Antigen enthalten, liegt tendenziell mehr frei fluoreszierendes Tracer vor, und das Signal steigt proportional zum enthaltenen Antigen an.

2 Material

2.1 Reagenzien

Tabelle 2.1: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	GE Healthcare, München, Deutschland
DDAO SunRed TM Phosphate	AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA
di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland
DY634-NHS	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DYQ3-NHS	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
Humanes Serumalbumin (HSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
N-hydroxysulfosuccinimid	GE Healthcare, München, Deutschland
Pierce® Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Quick Start TM Bovines Gamma Globulin Standard Set	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Quick Start TM Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Superparamagnetische Silicapartikel mit carboxyl-modifizierter Oberfläche, MagSi-S COOH 600 nm	MagnaMedics Diagnostics BV, Geleen, Niederlande
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	2,6 mM KCl, 138 mM NaCl, 10 mM HNa_2PO_4 , 1,8 mM H_2KPO_4 , pH 7,4 bzw. 8,0
Puffer A	10 mM Tris, pH 8,0
Puffer B	10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,0
Substratlösung	1 μM DDAO Phosphat, 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , pH 9,5
Tris Basispuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4
Verdünnungspuffer	Basispuffer + 1 % HSA
Waschpuffer	Basispuffer + 0,05 % Tween [®] 20

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper und ELISA-Kits

Bezeichnung	Best. Nr.	Hersteller
Human Chitinase 3-like 1 DuoSet ELISA, 15 Plate	DY2599	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Monoklonaler Mouse-anti-human Transferrin	MAK6049	Linaris GmbH, Dossenheim, Deutschland
Monoklonaler Rat-anti-human Chitinase 3-like 1 (Capture)	MAB25991	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Polyklonaler Goat-anti human Chitinase 3-like 1, Biotinyliert (Detektion)	BAF2599	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Recombinant Human Chitinase 3-like 1 Protein, CF	2599-CH	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 2.4: Verwendete Software

Name	Hersteller
Gen5 Data Analysis	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
Office Professional Plus 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
OriginPro 8.5.1	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
SPSS Statistics 21	IBM, Armonk, NY, USA
Tube Scanner Studio Version 2.07.06	ESE GmbH, Stockach, Deutschland

2.2 Geräte

2.2.1 Fluoreszenzdetektion

Die Detektion der Fluoreszenzreaktionen erfolgte mit einem miniaturisierten Fluoreszenzmessgerät (ESE GmbH, Stockach). Das Kernstück der Technologie ist die konfokale Fokussierung des Excitations- und Emissionslichts im selben Strahlengang. Dies wird über eine spezielle Anordnung von Spiegeln, Linsen und Strahlteilern erreicht (Abbildung 2.1 A). Durch Miniaturisierung kann die Detektion in einem kleinen Modul realisiert werden (Abbildung 2.1 B). Dieses ist in den zur Entwicklung des Immunoassays verwendeten Tubescannern und LabDisk-Lesegeräten verbaut. Die Anregungs- und Detektionswellenlängen wurden werksseitig auf 625 nm bzw. 680 nm eingestellt. Da dieser Detektor ohne bewegliche Teile auskommt, eignet er sich besonders für den Einsatz außerhalb der Laborumgebung, also für den Einsatz am POC.

2.2.1.1 Tubescanner

Der Tubescanner dient zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung in handelsüblichen 8 x 250- μ L-PCR-Strips (Abbildung 2.2 A). Dafür wird der zuvor beschriebene Detektor in festen Zeitabständen unter die Tubes gefahren, um eine Messung durchzuführen. Die Inkubationstemperatur kann über ein Peltier-Element geregelt werden, durch die große Kontaktfläche wird die Temperatur sehr schnell angeglichen. Die Daten werden an einen Computer übertragen, wo sie von einer zugehörigen Software verarbeitet werden. Diese ermöglicht die Einstellung der Temperatur und des Messintervalls, und kann die Daten in tabellarischer oder grafischer Form darstellen und exportieren. Dabei entspricht eine Datenreihe einem Tube (Abbildung 2.2 B). Das Gerät ist für die Messung von isothermalen RT-PCR-Reaktionen konzipiert (110), daher ist es möglich, die erste Ableitung der Daten darzustellen. Dies kann im Fall eines Immunoassays genutzt werden, um fertigungsbedingte Unterschiede der Dicke des Bodens der PCR-Gefäße und damit der Anfangsfluoreszenz zu eliminieren (Abbildung 2.2 C). Standardmäßig wurde 1 mal pro Minute eine Messung durchgeführt.

2.2.1.2 LabDisk Player

Der LabDisk Player ist ein vom Hahn-Schickard Institut für Mikroanalyzesysteme in Freiburg entwickeltes Gerät, das eine automatische Probenaufbereitung mit der oben beschriebenen Fluoreszenzdetektion kombiniert (111). Dafür werden sämtliche Reagenzien und Proben auf einer LabDisk (Abbildung 2.3 B) vorgelegt, in der durch

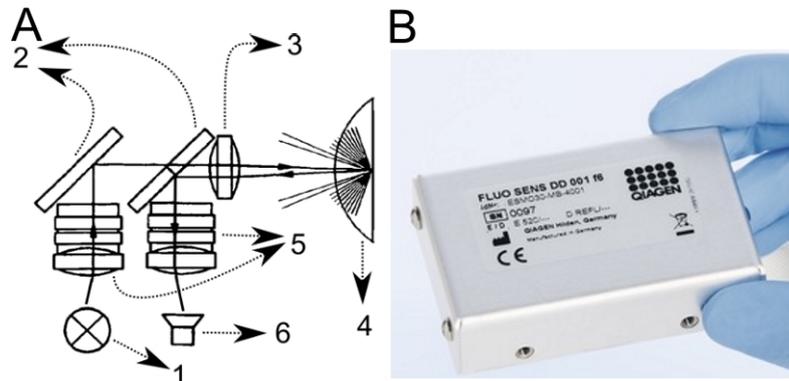


Abbildung 2.1: A) Schematischer Aufbau des verwendeten Detektionsprinzips. 1:Lichtquelle (LED); 2:Strahlteiler; 3:Linse zur Fokussierung; 4:Probenmaterial; 5:Filter/Linsenkombination; 6:Photodiode. B) Alle optischen und elektronischen Elemente lassen sich kompakt verbauen.

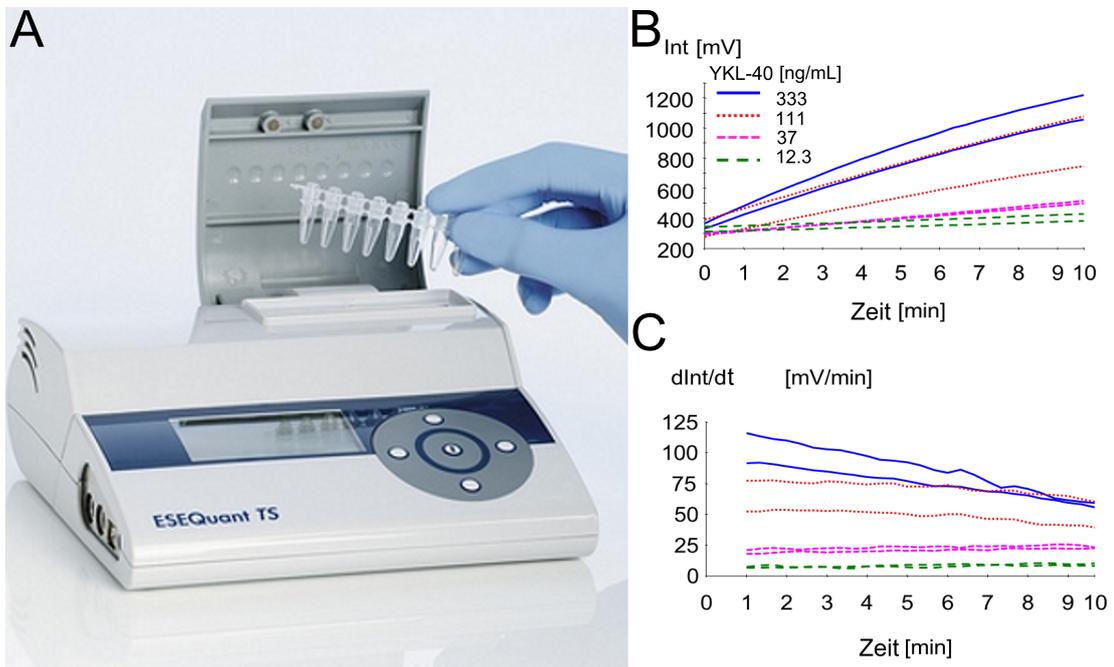


Abbildung 2.2: A) Probengefäße für den Tubescanner sind 8-Tube PCR-Strips B) Die Software liest in festen Intervallen Fluoreszenzsignale. Jede Linie entspricht dabei einem Tube C) Die Darstellung der ersten Ableitung bietet im Vergleich zur Auswertung der absoluten Fluoreszenz Vorteile bei der Auslesegeschwindigkeit

Rotation Zentrifugalkräfte erzeugt werden. Durch die Kombination von mikrofluidischen Bauteilen können so Transport-, Wasch- und Aliquotierungsvorgänge gesteuert werden. Durch eine Kombination von Permanentmagneten mit präziser Rotationssteuerung ist auch die Manipulation von magnetischen Beads möglich (111). Der LabDisk Player fasst Disks von 130 mm Durchmesser und kann Rotations- und Temperaturprotokolle ausführen, um so den gesamten analytischen Prozess zu automatisieren (Abbildung 2.3 A). Die Maximalgeschwindigkeit des Rotors beträgt 7800 rpm. Er ermöglicht außerdem eine auf $0,025^\circ$ genaue azimuthale Positionierung der Disk. Die Temperatur kann über ein Gebläse auf bis zu 60°C erhöht und gehalten werden. Zur Detektion wird dasselbe Fluoreszenzmesssystem eingesetzt, das auch im Tubescanner (vgl. Abb. 2.1) verbaut ist. Zur Prozessierung von magnetischen Beads enthält der für dieses Projekt verwendete Reader Neodym-Permanentmagnete an zwei verschiedenen Positionen (Abbildung 2.3 B). Der Sammelmagnet ($R = 50,5$ mm) dient zur Konzentration der magnetischen Beads, der Transportmagnet ($R = 48$ mm) wird eingesetzt, um das so entstandene Pellet aus der Flüssigphase herauszuziehen. Die Disk wird weiter gedreht, sodass das Pellet in die nächste Kavität transportiert werden kann. Die LabDisks werden anhand einer digitalen Skizze aus Cyclo-Olefin-Polymeren (COP) gefertigt, was allerdings nur in begrenzter Stückzahl möglich ist. Daher wurde die Entwicklung des Assays auf der Tubescanner-Plattform durchgeführt, und der entwickelte Immunoassay in Zusammenarbeit mit dem Hahn-Schickard Institut auf die LabDisk-Plattform portiert. Die magnetische Feldstärke kann im LabDisk-System nicht variiert werden, und der Abstand der Magnete zur rotierenden Disk ist bereits so eng wie möglich gewählt; um einen Transport zu ermöglichen, müssen also die magnetischen Eigenschaften der eingesetzten Beads angepasst werden.

2.2.2 Sonstige Geräte

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Anionentauschersäule	Äkta MonoQ HR 5/5	GE, Boston, MA, USA
Chromatographiesystem	Äkta FPLC	GE, Boston, MA, USA
ELISA-Lesegerät	ELx808	BioTek Instruments, Inc., Winoski, VT, USA
Fluoreszenz-Spektralphotometer	LS50B	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Laborwaage	Analytic AC120s	Sartorius, Göttingen, NI, Deutschland
Lyophilisator	COC 1m Alpha 1-4	Christ, Osterode am Harz, NI, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, BW, Deutschland
Magnetseparator	MagnetoPure-micro	Chemicell, Berlin, Deutschland
Modulares Analysensystem	Cobas 8000	Roche
pH-Meter	pB 11	Sartorius, Göttingen, NI, Deutschland
Pipetten 10-1000 μ L	Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage	MilliQ-Plus	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Rotator	S-3	Technischer Dienst rechts der Isar, München, BY, Deutschland
Zentrifugalfilter	Amicon Ultra-0,5	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Thermoschüttler	Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific industries, Bohemia,, NY, USA
Zentrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

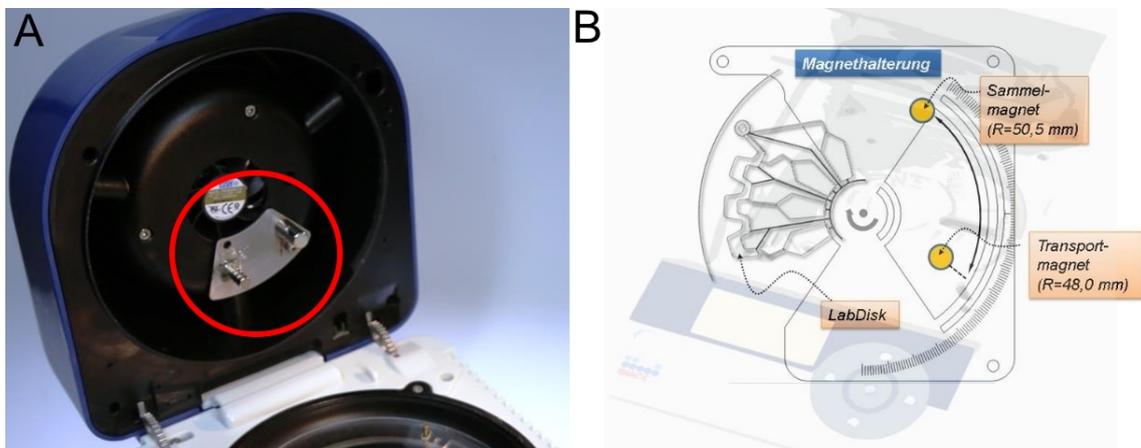


Abbildung 2.3: A) Deckel des LabDisk Readers. Die Temperatur kann über ein Gebläse reguliert werden, die Magnete (rote Markierung) dienen dem Transport von magnetischen Beads innerhalb der LabDisk. B) Der Reader fasst Disks mit 130 mm Durchmesser. Zwei Neodym-Magnete ermöglichen den Transport der magnetischen Beads durch die Kammern (Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Hahn-Schickard-Instituts für Mikroanalysesysteme).

3 Methoden

3.1 Kopplungschemie

Als Startpunkt für die Immobilisierung wurden superparamagnetische Silikapartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 600 nm und Carboxylatfunktionen als Oberflächenmodifikation gewählt. Diese erlauben die Kopplung von Antikörpern über die Verwendung eines N-Hydroxy-succinimid (NHS)-Esters (Abbildung 3.1). EDC (1-Ethyl-3(dimethylaminopropyl)carbodiimid) reagiert dabei mit Carboxylgruppen zu einem O-Acylisoharnstoff-Intermediat. Der O-Acylisoharnstoff ist hydrolyseanfällig. Findet keine Reaktion mit einem primären Amin statt, wird die Carboxylgruppe durch Hydrolyse wieder hergestellt, und N-unsubstituierter Harnstoff freigesetzt. NHS oder das wasserlösliche Sulfo-NHS werden eingesetzt, um die Effizienz der Kopplung zu steigern, und um trockenstabile, aminreaktive Zwischenstufen zu erstellen. Dabei bildet sich ein NHS-Ester, der deutlich stabiler als das O-Acylisoharnstoff-Intermediat ist, und eine Kopplung von Proteinen über deren primäre Amine bei neutralem pH erlaubt.

Anschließend werden überschüssige NHS-Ester in einem Tris-Puffer mit 1 % humanem Serumalbumin abgesättigt. Die Effizienz der Kopplung kann abgeschätzt werden, wenn der Überstand nach der Kopplungsreaktion auf restliche Proteine untersucht wird. Können keine Proteine mehr nachgewiesen werden, wird von einer erfolgreichen Kopplung ausgegangen. Für die Kopplung magnetischer Beads wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. 500 μL Carboxyl-modifizierte magnetische Beads ($c = 10 \text{ mg/mL}$) in ein Eppendorf-Cup überführen.
2. Zweimal mit 500 μL H_2O waschen.
3. Reaktion mit 750 μL 240 mM EDC, 5 mM NHS für 15 min bei 29 °C und Mischung.
4. Zweimal mit 500 μL H_2O waschen.
5. Inkubation mit 200 μL Antikörpern in PBS für 1 h bei 29 °C und Mischung; nach der Inkubationszeit wird eine Probe des Überstandes zur Kontrolle der Kopplung mit der Bradford-Methode auf die verbliebene Proteinkonzentration untersucht.
6. Einmal mit 500 μL Tris-Puffer + 1 % HSA waschen.
7. Lagerung in 500 μL Tris-Puffer + 1 % HSA.

Die an den Beads gebundene Menge an Antikörper kann geschätzt werden, wenn man eine vollständige Bindung der Antikörper während der Kopplungsreaktion vor-

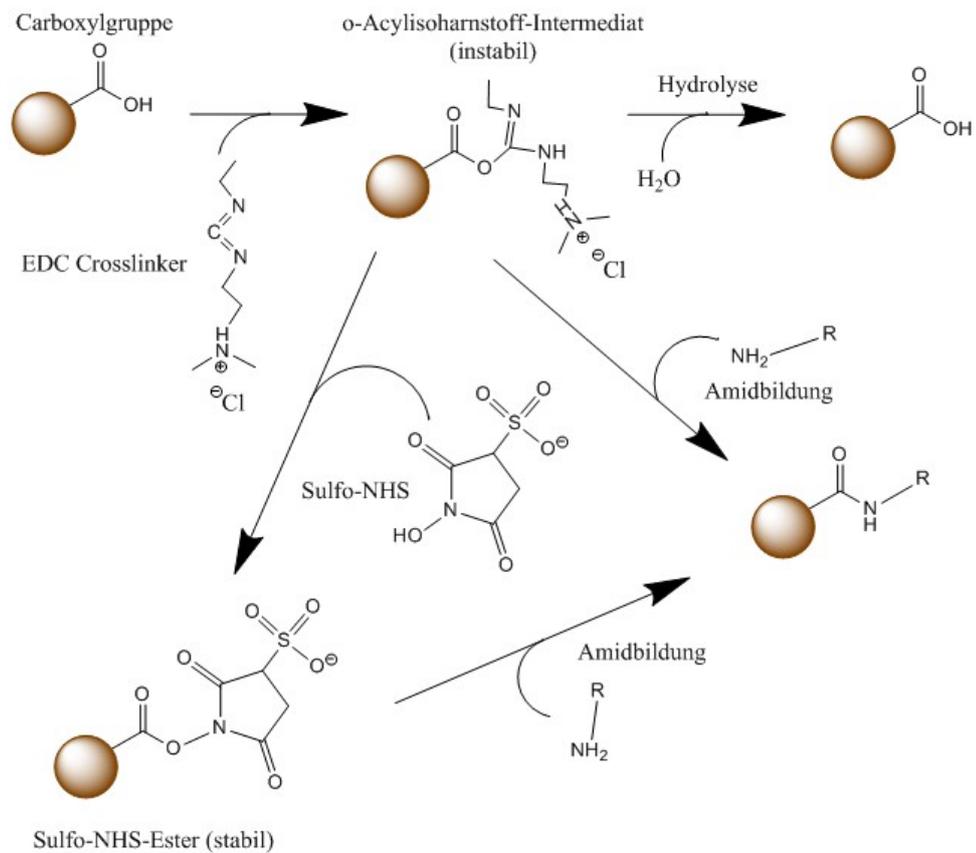


Abbildung 3.1: Durch die Reaktion einer Mischung aus EDC und NHS mit Carboxylgruppen wird ein stabiler NHS-Ester gebildet. Dieser reagiert mit in Proteinen enthaltenen primären Aminen unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung.

aussetzt. Diese wurde durch die Messung der Proteinkonzentration des Überstandes nach der Reaktion kontrolliert. Bei vollständiger Bindung sind pro 10 µg (1 µL) Beads 0,2 µg Antikörper gebunden, was bei einem Molekulargewicht von 150 kDa für IgG eine Molarität von etwa 1,4 µM ergibt.

Die selbe Strategie wird verwendet, um die für den FRET-Assay benötigten Fluoreszenzfarbstoffe an Proteine zu koppeln. Dabei wird der Farbstoff bereits durch den Hersteller an geeigneter Stelle mit einem NHS-Ester versehen, der dann nach Zugabe von Proteinen mit deren primären Aminen reagieren kann. Dabei ist zu beachten, dass theoretisch mehr als ein Farbstoffmolekül pro Proteinmolekül binden kann. Einen Anhaltspunkt über die Anzahl und Lage der gebundenen Farbstoffe kann bei bekannter Kristallstruktur die Ansicht der Strukturdaten liefern, bei dem sich alle an der Oberfläche befindlichen primären Amine anzeigen lassen. Die Stellen, die sterisch am meisten exponiert sind, haben die höchste Wahrscheinlichkeit, mit dem Farbstoffmolekül zu interagieren, wobei allerdings lokale Ladungsverteilung und Hydrophobizität auch eine Rolle bei der Interaktion spielen.

3.2 Anionenaustauschchromatographie

Grundlage der Anionenaustauschchromatographie ist die Eigenladung des Proteins, die es ihm ermöglicht, an ein entgegengesetzt geladenes Säulenmaterial, in diesem Fall Trimethylaminopropylenglycol, zu binden. Hier konkurriert das Protein mit einer durch graduellen Pufferaustausch steigenden Ionenkonzentration, und wird schließlich von der Säule gelöst. Die Bindung ist abhängig vom isoelektrischen Punkt des Proteins, der von seiner Aminosäurezusammensetzung bestimmt ist, und durch die Bindung von ebenfalls geladenen Farbstoffen verändert werden kann.

Damit wird beispielsweise eine Trennung von freiem Farbstoff und verschieden-gradig markierten Proteinen möglich. Diese können in Fraktionen aufgefangen, und weiterverwendet werden.

3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Proteine und Farbstoffe absorbieren Licht bestimmter Wellenlänge. Durch die Messung der Extinktion einer wässrigen Lösung bei diesen Wellenlängen kann daher unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten (E_λ) und der Schichtdicke (d) mit Hilfe der Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 3.1) auf die Konzentration (c) der enthaltenen Stoffe geschlossen werden.

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda * c * d; \quad (3.1)$$

Das Absorptionsmaximum bei 280 nm bei Proteinen ist vor allem auf die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zurückzuführen, wodurch sich der molare Extinktionskoeffizient ε_λ verschiedener Proteine unterscheidet. Die molaren Extinktionskoeffizienten ε_λ der verwendeten Farbstoffe werden üblicherweise von Herstellerseite bestimmt und angegeben.

Über diese Konzentrationsbestimmung ist es möglich, einerseits die Menge enthaltenen Proteins und Farbstoffs gleichzeitig zu bestimmen. Wurde nicht kovalent gebundener Farbstoff vorher z.B. durch Anionenaustauschchromatographie entfernt, ergibt sich daraus direkt der Markierungsgrad.

Eine andere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung ist der Bradford-Assay. Bei dieser Methoden werden die in der Probe enthaltenen Proteine mit dem Triphenylmethylnfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 versetzt, die mit den basischen Seitenketten der Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin sowie mit der hydrophoben Seitenkette des Tyrosins interagieren können. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm, was zur Konzentrationsbestimmung der enthaltenen Proteine verwendet werden kann (112). Allerdings können gebundene Farbstoffmoleküle diese Messung empfindlich stören, außerdem erlaubt diese Methode keine gleichzeitige Bestimmung des Labelinggrades.

3.4 Statistische Methoden

3.4.1 ROC-Analyse

Die Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) ist eine statistische Methode, die zum Vergleich und zur Bewertung von Testsystemen verwendet werden kann, ohne vorher einen Cutoff festlegen zu müssen. Dafür müssen die gemessenen Werte bereits mit einer anderen Methode klassifiziert sein (113). Bei diagnostischen Fragestellungen ist diese Klassifikation häufig „Krank“ und „Gesund“. Diese Einteilung wird, wenn verfügbar, mit gesicherten Diagnosen durch verifizierte Referenzmethoden vorgenommen. Für jeden erhaltenen Messwert wird ein Cutoff gesetzt, und die Richtig-Positiv-Rate (True positive Fraction TPF) und Falsch-Positiv-Rate (False Positive Fraction FPF) berechnet. Diese hängen eng mit der diagnostischen Sensitivität und Spezifität zusammen.

$$\text{TPF (Sensitivität)} = \frac{\text{Bei Cutoff Krank eingestuft}}{\text{Wirklich Kranke}} \quad (3.2)$$

$$\text{FPF (1-Spezifität)} = \frac{\text{Bei Cutoff Krank eingestuft}}{\text{Wirklich Gesunde}} \quad (3.3)$$

Damit ergibt sich für jeden Cutoff ein Wertepaar aus TPF und FPF. Die so berechneten Werte werden für jeden möglichen Cutoff gegeneinander aufgetragen, wodurch sich die ROC-Kurve ergibt. Die Qualität der Unterscheidung lässt sich mit der Fläche unter dieser Kurve (Area Under the Curve, AUC) abschätzen. Lässt ein Testverfahren keine Unterscheidung zwischen den Klassifikationen zu, beträgt sie 0,5; ein Wert von 1 würde eine ideale Unterscheidung anzeigen. Werte kleiner als 0,5 deuten darauf hin, dass die Klassifikation falsch gewählt wurde. Der mathematisch optimale Cutoff ist der Punkt, an dem die Summe aus Sensitivität (TPF) und Spezifität (1-FPF) maximal wird (114). Dieser muss jedoch nicht zwingend mit dem klinisch optimalen Cutoff übereinstimmen.

3.4.2 Methodenvergleiche

3.4.2.1 Bland-Altman-Plot

Der Bland-Altman-Plot wird eingesetzt, um die Übereinstimmung zweier verschiedener analytischer Methoden grafisch abzuschätzen. Dafür wird für jede Probe die Differenz der Methoden gegen deren Mittelwert aufgetragen. Ist der Mittelwert der Differenzen ungleich 0, spricht das für systematische Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden. Um das Ausmaß der zufälligen Fehler abzuschätzen, wird das $\pm 2s$ Intervall der Abweichungen angegeben. Dieses Intervall kann auf seine klini-

sche Relevanz interpretiert werden; sind die zufälligen Abweichungen der Methoden klein genug, um keine klinischen Auswirkungen zu haben, können die Methoden als gleichwertig betrachtet werden (115).

3.4.2.2 Passing-Bablok-Regression

Das Passing-Bablok-Regressionsverfahren ist ein statistischer Vergleich zweier Methoden. Im Gegensatz zur linearen Regression wird keine Normalverteilung der verwendeten Daten angenommen. Außerdem ist die Passing-Bablok-Regression robuster gegenüber Ausreißern. Für die Berechnung wird der Durchschnitt aller möglichen Steigungen von Geraden durch Punktpaare aus dem Datensatz ermittelt. Aus deren Mittel ergibt sich eine Regressionsgerade mit Konfidenzintervallen für den Achsenabschnitt und die Steigung. Ist 0 im Konfidenzintervall des Achsenabschnitts enthalten, wird bei ausreichender Probenanzahl angenommen, dass zwischen den Methoden keine konstante systematische Abweichung besteht. Enthält der Konfidenzintervall der Steigung den Wert 1, zeigen die Methoden keine proportionalen systematischen Abweichungen (116).

3.4.2.3 Signifikanz

Aufgrund fehlender Normalverteilung der erhobenen Daten wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben als nichtparametrischem Verfahren berechnet. Dabei wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt und in Abbildungen markiert: $p > 0,05$ nicht signifikant, $p \leq 0,05$ signifikant (*), $p \leq 0,01$ hochsignifikant (**) und $p \leq 0,001$ höchstsignifikant (***)

3.5 Klinische Studie

Um die diagnostische Wertigkeit von YKL-40 zu evaluieren, wurde zunächst eine hypothesengenerierende, explorative Studie durchgeführt. Die so generierten The- sen wurden anschließend in einer prospektiven Studie verifiziert. Die Ergebnisse der explorativen und prospektiven Studie sowie das Studiendesign sind in der medizini- schen Dissertationsschrift von Herrn Ludwig Bulst ausführlich diskutiert (117). In dieser Promotionsschrift werden nur die Ergebnisse der abschließenden prospektiven Studie als Grundlage für die anschließende Assayentwicklung dargestellt. Die Studie sollte die Hypothese **"YKL-40 hat im Bezug auf Pneumonien einen höhe- ren diagnostischen Wert als CRP"** untersuchen. Dafür wurden die CRP- und YKL-40-Serumkonzentrationen in einem inflammatorischen Kollektiv ohne Lunge- nerkrankung (Tabelle 4.1) mit einem Kollektiv mit akuten Lungenentzündungen verglichen. Die Studie zur Untersuchung der diagnostischen Wertigkeit von YKL-40 wurde von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Uni- versität München befürwortet (Projektnummer 395/13, Votum vom 10.12.2013). Alle Studienteilnehmer wurden fachgerecht über die Studie aufgeklärt und haben schriftlich der Verwendung ihrer Serumproben für die Studie zugestimmt. Entspre- chend der Datenschutzvorgaben wurden sämtliche Patientendaten pseudonymisiert. Zur Auswahl der akuten entzündlichen Lungenerkrankungen dienten folgende ICD- 10 Schlüssel:

- Grippe [Influenza], mit Pneumonie, mit Virusnachweis (J10.0)
- Grippe [Influenza], mit Pneumonie (J11.0)
- Viruspneumonie, anderenorts nicht klassifiziert (J12.)
- Pneumonie durch *Streptococcus pneumoniae* (J13.)
- Pneumonie durch *Haemophilus influenzae* (J14.)
- Pneumonie durch Bakterien, anderenorts nicht klassifiziert (J15.)
- Pneumonie durch sonstige Infektionserreger, anderenorts nicht klassifiziert (J16.)
- Pneumonie bei anderenorts klassifizierten Krankheiten (J17.)
- Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet (J18.)
- Aspirationspneumonie durch feste und flüssige Substanzen (J69.0)
- Interstitielle Pneumonie (J84.9)
- Abszess der Lunge mit Pneumonie (J85.1)

Nur Pneumoniepatienten mit radiologisch nachgewiesenen Lungeninfiltraten wur- den in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien für beide Gruppen waren das

Vorliegen einer orthopädischen Erkrankung, sowie das Vorliegen einer Sepsis oder SIRS (systemisches Inflammationsresponses-Syndrom). Diese Kriterien wurden aufgrund von Daten aus einer explorativen Vorstudie festgelegt, in der für diese Erkrankungen starke Erhöhungen des YKL-40-Serumspiegels beobachtet wurden, die die Studie verfälscht hätten. Die Ätiologie der Pneumonien blieb aus Gründen der verfügbaren Patientenzahl in dieser Studie unberücksichtigt. Es wird daher nicht zwischen bakteriell, viral und anderweitig verursachten Erkrankungen unterschieden. CURB65 und PSI-Scores waren nicht durchgängig verfügbar. Als gesundes Vergleichskollektiv wurden 100 Serumproben von Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) verwendet. Alle Proben wurden bei -80 °C aliquotiert gelagert. Zur Messung von YKL-40 wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Kit von R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet. Intra- und Interassayvariationskoeffizienten der Konzentration lagen bei 3,59 % bzw. 7,95 %. Die Messung des Serum-CRP erfolgte mit Hilfe einer partikelverstärkten immunturbidimetrischen Methode auf einem Roche Cobas 8000-System (Roche Diagnostics, Mannheim).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des neuen Inflammationsmarkers YKL-40

28 Pneumoniepatienten und 30 Patienten mit sonstigen inflammatorischen Erkrankungen konnten für die Studie rekrutiert werden (Tabelle 4.1). Das durchschnittliche Alter betrug 66 bzw. 70 Jahre und unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,49$). CRP war in beiden Gruppen mit 11,6 bzw. 13,2 mg/dL stark erhöht, unterschied sich aber nicht signifikant zwischen den Gruppen ($p = 0,86$). YKL-40 war im Durchschnitt mit 405 ng/mL (Min 57,4; Max 1666 ng/mL) in der Pneumoniegruppe im Vergleich zu 213 ng/mL (Min 17,6; Max 1439 ng/mL) in der Inflammationsgruppe fast um 100 % erhöht ($p < 0,005$), allerdings mit einer in beiden Gruppen sehr hohen Spannweite (Abbildung 4.2). In den Proben der gesunden Blutspender wurde eine YKL-40-Konzentration von 27,8 ng/mL (min 6,4; max 76,9 ng/mL), und eine CRP-Konzentration von 0,2 mg/dL (Min 0,0; Max 2,4 mg/dL) gemessen. Ein Vergleich der Eignung von CRP und YKL-40 zur Detektion von Pneumonien in einem Kollektiv mit inflammatorischen Erkrankungen mit ROC-Analyse ergab für CRP eine AUC von 0,51, für YKL-40 von 0,73 (Abbildung 4.1).

Die YKL-40-Konzentration bei Serumproben von gesunden Probanden wird in der Literatur zwischen 23 ng/mL und 42 ng/mL angegeben (118, 89, 91, 55). Dabei hat der verwendete ELISA einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse. Der hier erhaltene Wert von 27,8 ng/mL stimmt gut mit vergleichbaren Studien überein (vgl. 5.1).

Die YKL-40-Serumkonzentration steigt bei akuten inflammatorischen Erkrankungen auf etwa das 10-Fache dieses Wertes an. Damit konnte die Einordnung von YKL-40 schneller Entzündungsmarker bestätigt werden. CRP ist in dieser Studie nicht mit YKL-40 korreliert (Pearson-Korrelationskoeffizient 0,081).

Mit dem Cutoff von 57,3 ng/mL lassen sich mit YKL-40 beim Vergleich Pneumo-

Tabelle 4.1: Charakteristika der Studienteilnehmer. Angegeben sind Mittelwerte (Minimal-Maximalwert); *Signifikanz: Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben.

	Inflammation	Pneumonie	Signifikanz*
Anzahl	30	28	
Geschlecht (m/w)	19/11	16/12	
Alter	66 (31-85)	70 (44-93)	0,49
CRP (mg/dL)	11,6 (1,7-36,7)	13,2 (0,2-43,2)	0,86
YKL-40 (ng/mL)	213 (17,6-1439)	405 (57,4-1666)	<0,005

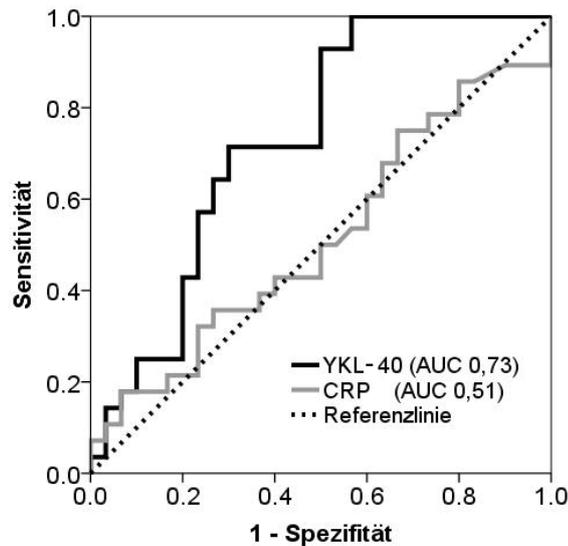


Abbildung 4.1: Eignung von YKL-40 zur Unterscheidung von Pneumonien von anderen inflammatorischen Erkrankungen. Im Gegensatz zu CRP kann YKL-40 aus einem allgemeinen inflammatorischen Kollektiv Patienten mit Pneumonie anzeigen.

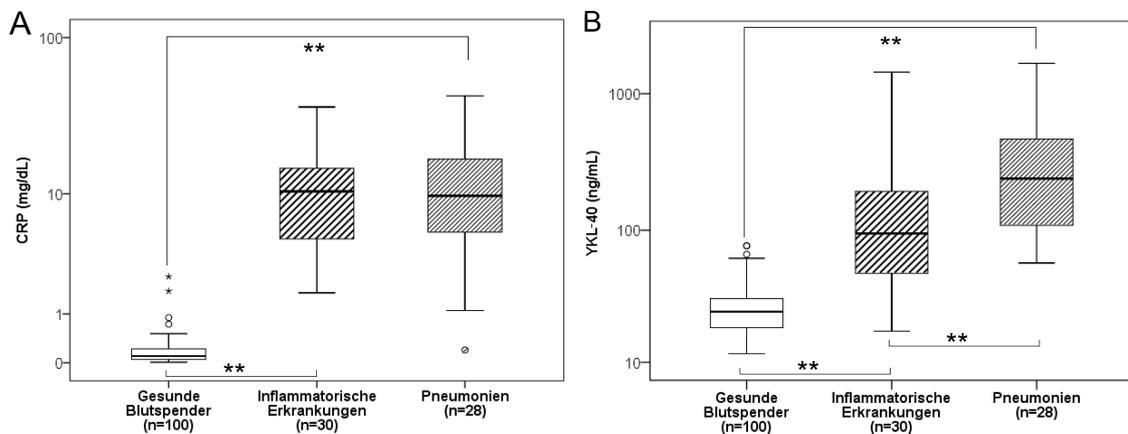


Abbildung 4.2: A) Vergleich der CRP-Serumkonzentrationen zwischen nicht-pulmologischen inflammatorischen Erkrankungen, Pneumonien und Kontrollen. CRP ist bei inflammatorischen Erkrankungen erhöht, erlaubt aber keine Unterscheidung zwischen Pneumonien und anderen Erkrankungen. B) YKL-40-Serumkonzentrationen unterscheiden zwischen anderen nicht-pulmologischen inflammatorischen Erkrankungen (Mittelwert 213 ng/mL, Min-Max 17,6-1439 ng/mL) und Pneumonien (Mittelwert 405 ng/mL, Min-Max 57,4-1666 ng/mL). Populationen unterscheiden sich hoch signifikant ($p < 0,005$).

Tabelle 4.2: Vierfeldertafel für CRP (Cutoff 0,5 mg/dL) und YKL-40 (Cutoff 57,3 ng/mL) für die Erkennung von inflammatorischen Erkrankungen in einem gesunden Kollektiv. PPV: Positiv-Prädiktiver Wert; NPV: Negativ-Prädiktiver Wert.

CRP	Inflammation	Gesund	•
Test positiv	30	5	PPV 86 %
Test negativ	0	95	NPV 100 %
•	Sensitivität 100 %	Spezifität 95 %	•

YKL-40	Inflammation	Gesund	•
Test positiv	17	6	PPV 75 %
Test negativ	13	94	NPV 89 %
•	Sensitivität 57 %	Spezifität 94 %	•

nie vs. Gesund die Pneumonien mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 94 % bestimmen (Tabelle 4.3). Für die Unterscheidung von Pneumonien von anderen inflammatorischen Erkrankungen wird bei diesem Cutoff noch eine Sensitivität von 57 % und Spezifität von 94 % erreicht (Tabelle 4.2).

Ein CRP-Wert über 0,5 mg/dL gilt allgemein als Kriterium für inflammatorische Erkrankungen. Für die Detektion inflammatorischer Erkrankungen erreicht CRP damit 100 % Sensitivität bei 95 % Spezifität (Tabelle 4.2), und ist daher für diese Fragestellung dem YKL-40 überlegen. Für die Bestimmung von Pneumonien vs. Gesund erreicht CRP 96 % Sensitivität und 95 % Spezifität, und ist für diese Fragestellung mit YKL-40 vergleichbar (Tabelle 4.3).

Bei einem Cutoff von 57,3 ng/mL beträgt in dieser Studie der negativ-prädiktive Wert von YKL-40 für das Vorhandensein einer Pneumonie in einem inflammatorischen Kollektiv 100 % (Tabelle 4.4). Damit könnten Pneumonien sicher ausgeschlossen werden. Für CRP konnte kein Cutoff festgelegt werden, da es eine Unterscheidung von inflammatorischen Erkrankungen und Pneumonien überhaupt nicht zulässt (Abbildung 4.1).

Daher wäre eine Bestimmung von YKL-40 bei Vorliegen einer CRP-positiven inflammatorischen Erkrankung zum Ausschluß einer Pneumonie sinnvoll. Bei einem Cutoff von 57,3 ng/mL könnten laut den hier erhobenen Daten Pneumonien zu 100 % ausgeschlossen werden.

Daher konzentriert sich die anschließende Entwicklung fluoreszenzbasierter Assays darauf, den neuen Inflammationsmarker in diesem Konzentrationsbereich mit hoher analytischer Sensitivität nachzuweisen, um eine Ausschlussdiagnose zu ermöglichen. Die Verwendung des Tubescanners ermöglicht dabei unterschiedliche Assayformate.

Tabelle 4.3: Vierfeldertafel für CRP (Cutoff 0,5 mg/dL) und YKL-40 (Cutoff 57,3 ng/mL) Pneumonien vs. Gesund. PPV: Positiv-Prädiktiver Wert; NPV: Negativ-Prädiktiver Wert.

CRP	Pneumonie	Gesund	•
Test positiv	27	5	PPV 84 %
Test negativ	1	95	NPV 99 %
•	Sensitivität 96 %	Spezifität 95 %	•

YKL-40	Pneumonie	Gesund	•
Test positiv	28	6	PPV 83 %
Test negativ	0	94	NPV 100 %
•	Sensitivität 100 %	Spezifität 94%	•

Tabelle 4.4: Vierfeldertafel für YKL-40 (Cutoff 57,3 ng/mL) zur Unterscheidung von Pneumonien und anderen inflammatorischen Erkrankungen. Für CRP kann hier kein sinnvoller Cutoff festgelegt werden (Vgl. Abbildung 4.1) PPV: Positiv-Prädiktiver Wert; NPV: Negativ-Prädiktiver Wert.

YKL-40	Pneumonie	Inflammation	•
Test positiv	28	17	PPV 62 %
Test negativ	0	13	NPV 100 %
•	Sensitivität 100 %	Spezifität 43 %	•

4.2 Förster-Resonanzenergietransfer basierter Immunoassay

4.2.1 Assayprinzip

Das für eine spätere Automatisierung am besten geeignete Assayformat ist ein kompetitiver, FRET-basierter Immunoassay in homogener Phase. Dabei wird zunächst das gewünschte Antigen mit dem Donor-, der zugehörige Antikörper mit dem Akzeptorfarbstoff konjugiert (Vgl. Abb. 3.1).

Der erhaltene Tracer wird mit der Probe vermischt, und anschließend der markierte Antikörper zugegeben. Ist kein unmarkiertes Antigen in der Probe vorhanden, wird das Signal durch die Bindung des Antikörpers an das fluoreszierende Antigen erniedrigt. In dem Maße, in dem unmarkiertes Antigen in der Probe vorhanden ist, liegt frei fluoreszierender Tracer vor, und das Signal steigt abhängig vom Antigengehalt der Probe (Abbildung 1.8).

Bei diesem Assayformat können theoretisch alle erforderlichen Reagenzien zusammen in einer Reaktionskammer vorgelegt werden, die Reaktion wird durch einfache Zugabe der Probe gestartet. Anschließend kann direkt das Ergebnis ausgelesen werden. Der Assayablauf würde keine weiteren Schritte erfordern.

Da das YKL-40-Antigen nur in relativ kleinen Mengen verfügbar ist, wurde die Machbarkeit des Assayformats im Tubescanner mit dem Anti-Akutphaseprotein Transferrin getestet. Transferrin kommt in deutlich höheren Serumkonzentrationen vor (Referenzwerte im Serum 2 - 3,6 mg/mL), und stellt damit auch geringere Anforderungen an die analytische Leistungsfähigkeit des Systems. Als Anti-Akutphaseprotein wird seine Syntheserate bei einer inflammatorischen Reaktion herunterreguliert, wodurch die Serumkonzentration sinkt. Damit ist es indirekt auch als Inflammationsmarker geeignet.

4.2.2 Konjugation der Reagenzien

Um dieses Assayaufformat zu realisieren, müssen zunächst Konjugate der Reagenzien mit Fluoreszenzfarbstoffen hergestellt werden. Als Farbstoffe wurden Dy634 und DyQ3 ausgewählt aufgrund ihrer miteinander kompatiblen Emissions- und Anregungsspektren in einem Wellenlängenbereich, in dem die Autofluoreszenz des Serums keine Rolle spielt. Diese können als vorbereitete NHS-Ester bezogen werden, die ohne weitere Modifikation verwendet werden können.

Da die Kopplungsreaktion mit der Hydrolyse des NHS-Esters konkurriert, wird ein ca. vierfacher molarer Überschuss des Farbstoffs im Vergleich zum Protein eingesetzt, um einen möglichst hohen Markierungsgrad zu erzielen. Die Reaktion wird

bei basischem pH durchgeführt, was zwar die Reaktionsrate herabsetzt, dafür aber den NHS-Ester stabilisiert.

Des Weiteren sollte die Proteinkonzentration möglichst hoch gewählt werden, um die Konzentration primärer Amine im Vergleich zum umgebenden Wasser groß zu halten. Nach der Reaktion wird freier Farbstoff über eine MonoQ-Anionentauschersäule abgetrennt, was gleichzeitig eine Selektion der erfolgreich markierten Proteine ermöglicht (Abbildung 4.3). Für die Kopplung von Transferrin an Dy634 wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 1) 120 μL Transferrin ($c = 4 \text{ mg/mL}$ entsprechend $52 \mu\text{M}$) in PBS pH 8,0 werden mit 28 μL Dy634-NHS ($c = 189 \mu\text{M}$) versetzt.
- 2) 4 Stunden unter Mischen bei Raumtemperatur inkubieren.
- 3) Auffüllen mit 452 μL 10 mM Tris, pH 8,0 auf 600 μL .
- 4) Auftrag auf eine MonoQ-Anionentauschersäule.
- 5) Elution mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl in einem 10 mM Tris-Puffer bei pH 8,0.
- 6) Anreicherung der Fraktionen durch 10 min Zentrifugation bei 14000 g in Zentrifugalfiltern mit 30 kDa Ausschlußgröße.
- 7) Photometrische Charakterisierung der aufgefangenen Elutionen.

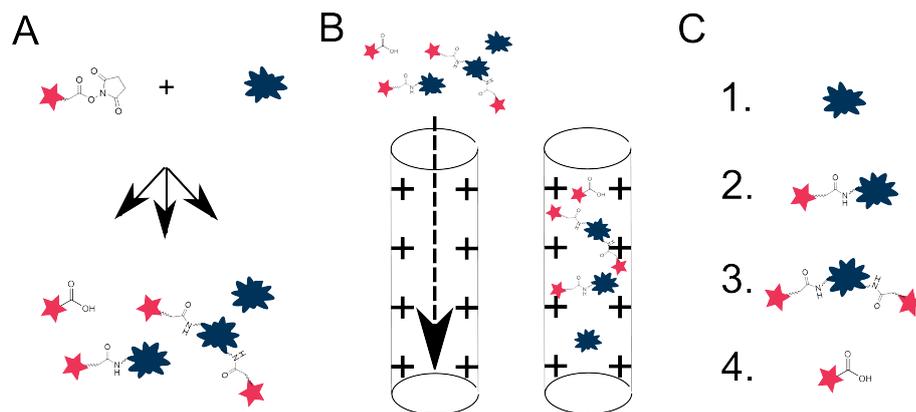


Abbildung 4.3: A) Die Reaktion des Proteins mit dem Farbstoff-NHS-Ester können ungelabelte und mehrfach gelabelte Produkte sowie freier Farbstoff entstehen. B) Diese werden auf eine positiv geladene Anionentauschersäule aufgetragen, und lassen sich so auftrennen. C) Die einzelnen Spezies lassen sich in Fraktionen auffangen, die weiter bearbeitet werden können.

Für den polyklonalen anti-Transferrin-Antikörper wurden als Reagenzien 5,5 mg/mL (entsprechend $39 \mu\text{M}$) Antikörper und 21 μL DyQ3 ($c = 156 \mu\text{M}$) eingesetzt, und

ansonsten das oben genannte Protokoll verwendet. Ab 7 mL nach Injektion wurde das Eluat auf 200 μ L Fraktionen aufgeteilt. Durch die Verwendung von Zentrifugalfiltern mit 30 kDa Ausschlußgröße nach Herstellerangaben wurde für beide Konjugationsansätze das Probenvolumen auf 20 μ L reduziert, und so die Konzentration der enthaltenen Proteine erhöht. Anschließend wurden die Fraktionen photometrisch charakterisiert. Dafür wurden die in Tabelle 4.5 beschriebenen Parameter verwendet.

Tabelle 4.5: Eigenschaften der zur Kopplung verwendeten Reagenzien. Die Daten für die Farbstoffe stammen aus Herstellerangaben, die Proteineigenschaften wurden mit dem Expasy Protparam-Tool ermittelt (119).

Bezeichnung	Molekulargewicht (Da)	A_{max} (nm)	ϵ (1/Mol*cm)
Transferrin	77000	280	85240
IgG	150000	280	210000
Dy634	1066	635	200000
DyQ3	900	692	800000

Die Ergebnisse der Markierung sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst. 4.4 A zeigt die Resultate der Anionenaustauschchromatographie, die an die Kopplung von Dy634 an Transferrin angeschlossen ist. Um den Effekt der Kopplung überprüfen zu können, wurde ungekoppelter Farbstoff (Grün), unkonjugiertes Protein (Schwarz) und die Konjugatsreaktion (Rot) aufgetragen. Das unkonjugierte Protein zeigt einen Peak bei ca. 8 mL, der stark abfällt, nach 10 mL wird kein Protein mehr detektiert. Nach der Reaktion hingegen ist der Hauptpeak deutlich reduziert, und der Hauptteil des Proteins eluiert nach 10 mL. Daher hat wahrscheinlich der negativ geladene Farbstoff an das Protein gebunden, und das Konjugat hält damit fester an der Säule als das ungelabelte Protein. Eine zufällige Koelution von Farbstoff und Protein ohne kovalente Bindung ist unwahrscheinlich, da der Farbstoff selbst (Grün) erst bei ca. 16 mL eluiert wird. Fraktionen wurden ab 7 mL in 200- μ L-Schritten aufgefangen.

4.4 B zeigt analog die Resultate der Anionenaustauschchromatographie nach der Kopplung von DyQ3 an den polyklonalen Antikörper. Ungekoppelter Farbstoff (Grün), unkonjugierte Antikörper (Schwarz) und Konjugationsreaktion (Rot) werden verglichen. Auch hier verschiebt sich die Elution des Proteins mit der Bindung des Farbstoffes, wenn auch weniger eindeutig.

In 4.4 C und D wird die photometrische Charakterisierung der Elutionsfraktionen dargestellt. Aus der Konzentration des Farbstoffs relativ zu Protein kann in jeder Fraktion ein Markierungsgrad zugeordnet werden (Balkendiagramm). In beiden Markierungsreaktionen nimmt wie erwartet der Markierungsgrad mit der Fraktionszahl zu; mit der Anionenaustauschchromatographie lassen sich demnach Markierungsgrade effektiv auftrennen.

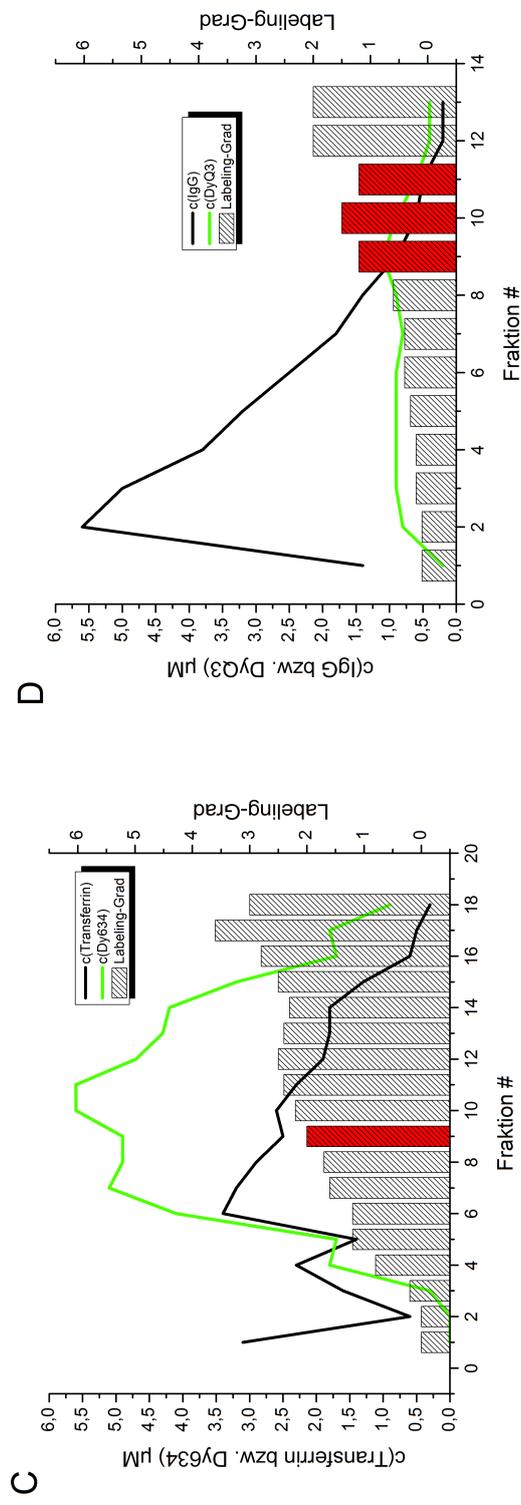
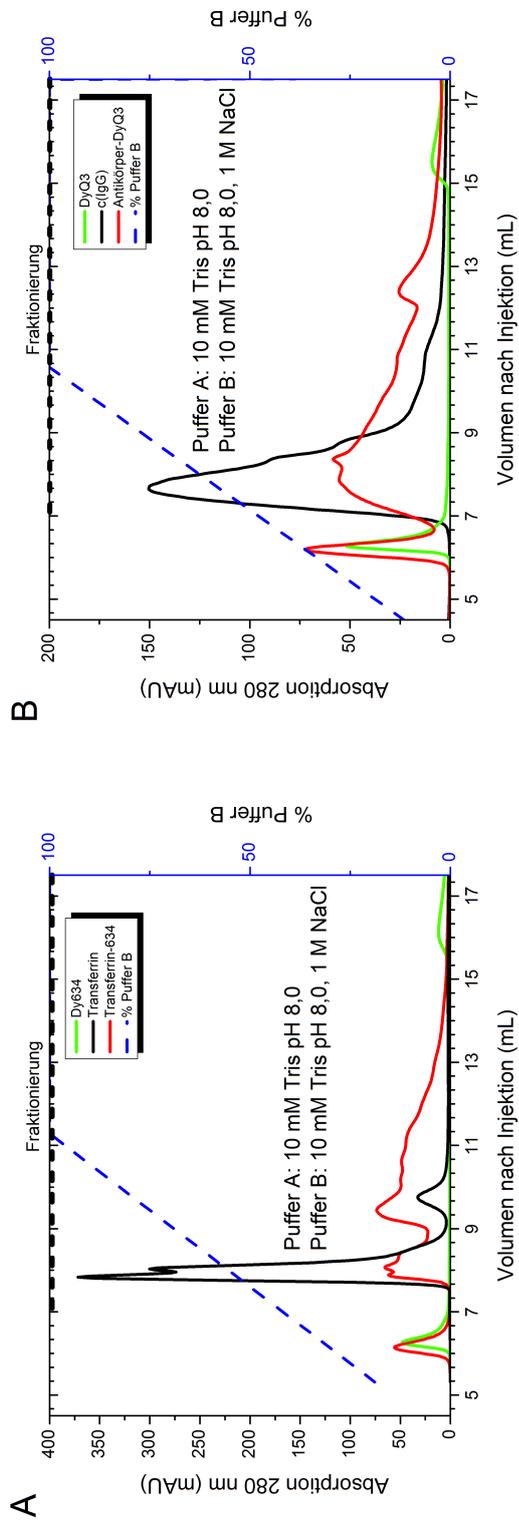


Abbildung 4.4: Ergebnisse der Kopplungsreaktion. A und B zeigen Daten der Anionenaustauschchromatographie, wobei jeweils ungebundener Farbstoff (Grün) mit unmarkiertem Protein (Schwarz) und Kopplungsreaktion (Rot) verglichen werden. Die Kopplung führt in beiden Fällen zu einer deutlichen Verschiebung des Chromatogramms. C und D zeigen die photometrische Charakterisierung der aufgefängenen Fraktionen. Der Markierungsgrad nimmt wie erwartet mit steigender Fraktionszahl zu. Die für weitere Experimente verwendeten Fraktionen sind rot markiert.

Allerdings enthalten die Fraktionen mit dem höchsten Markierungsgrad gleichzeitig nur sehr wenig Protein, weshalb sie für die Assayentwicklung nur eingeschränkt zu verwenden sind. Um die Machbarkeit eines FRET-Assays zu demonstrieren, wurden daher die Antikörperfraktionen 9,10 und 11 (Rot markiert) mit einem durchschnittlichen Markierungsgrad von 1,3 als Kompromiss zwischen Markierungsgrad und verwendbarer Proteinkonzentration verwendet. Transferrin liegt in einer höheren Konzentration vor, hier ist die Fraktion 9 (Rot markiert) allein ausreichend für einen Assayversuch. Da hier theoretisch 2 Farbstoffmoleküle pro Transferrin-Molekül gebunden sind, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass einer der Farbstoffe bei der späteren Antigen-Antikörperreaktion in ausreichender Nähe und paralleler Lage zum Quencher vorliegt.

4.2.3 Aufbau und Charakterisierung des Assays

Mit den markierten Fraktionen konnte ein Demonstrationsassay erstellt werden. Damit sollte bestimmt werden, ob mit einem FRET-Assayaufbau im Tubescanner eine ausreichende analytische Leistungsfähigkeit für die Detektion von YKL-40 erreicht werden kann. Der Assayablauf ist in Abbildung 4.5 gezeigt, und umfasst die folgenden Schritte:

- 1) Je 50 μL markiertes Transferrin-Dy634 (c ca. 25 nM) werden in die Tubes eines 8-Tube PCR Strips pipettiert.
- 2) 2 μL Probe mit unmarkiertem Transferrin (in 10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4) in unterschiedlicher Konzentration werden zugegeben und gemischt.
- 3) Zu jedem Tube wird 8 μL Antikörper-DyQ3 (c ca. 93 nM) pipettiert, wobei möglichst schnell gearbeitet wird.

Der Strip wird anschließend schnellstmöglich in den Tubescanner gestellt, und der Verlauf des Fluoreszenzsignals bei einer Anregungswellenlänge von 625 nm und Emissionswellenlänge von 680 nm bei einer Temperatur von 23 °C gemessen (Abbildung 4.6 A).

Der Assay wurde mit einer Verdünnungsreihe von nichtmarkiertem Transferrin als Probe durchgeführt, um seine Leistungsfähigkeit zu untersuchen. An die Daten wurde eine 4PL-Funktion angepasst. Da die Standardabweichungen über die Konzentrationen nicht gleich sind, wurden sie in der Berechnung mit gewichtet. Um eine optimale Anpassung der Funktion zu ermöglichen, wurde A (Maximales Signal) auf 160 mV festgesetzt. Damit lässt sich die 4PL-Funktion gut an die Daten anpassen und kommt daher dem wahren Verlauf der Kalibrationskurve nahe ($R^2 = 0,99$). Die

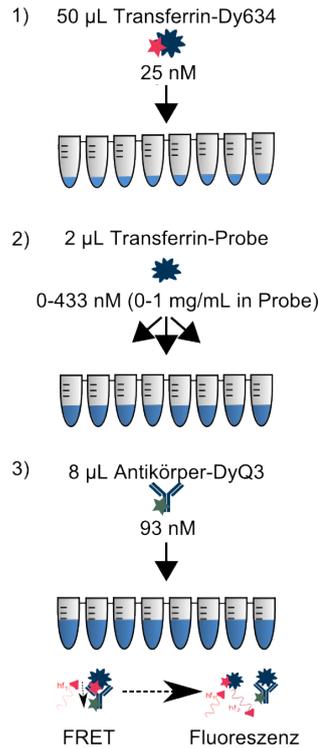


Abbildung 4.5: Aufbau des Transferrin-FRET-Assays

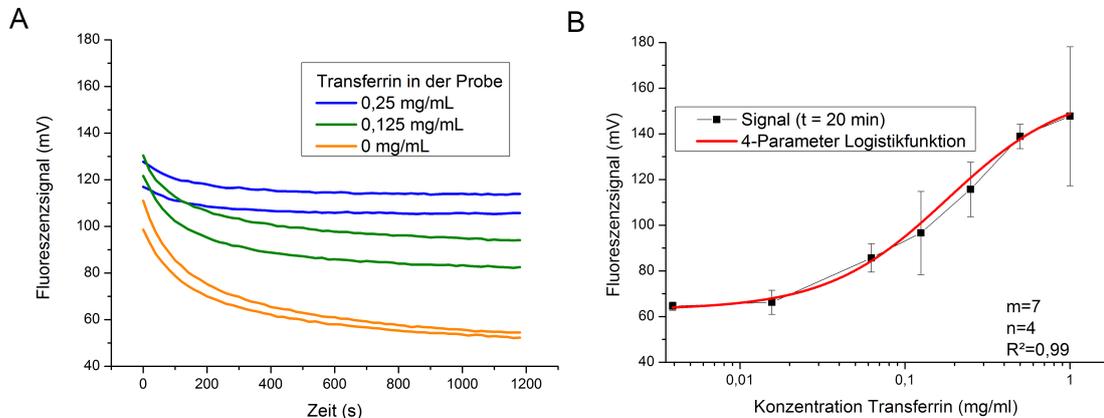


Abbildung 4.6: A) Fluoreszenzmessung im Tubescanner. Jede Linie repräsentiert ein Tube; die Bestimmungen wurden jeweils doppelt ausgeführt. Der PCR-Strip wird direkt nach Mischung der Reagenzien (vgl. Abb. 4.5) in den Tubescanner gestellt, wo das Fluoreszenzsignal bei einer Excitation bei 625 nm und einer Emissionswellenlänge von 680 nm gemessen wird. Die Kurvenverläufe zeigen einen Konzentrationsabhängigen FRET-Effekt, der durch die Bindung der Akzeptor-markierten Antikörper an das Donor-Antigen entsteht. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration des Zugewetzten nicht-markierten Transferrins. B) Kalibrationskurve des Assays. Der Assay wurde mit einer Verdünnungsreihe von nicht-markiertem Transferrin ausgeführt. Die Parameter des angepassten 4PL-Modells sind in Tabelle 4.6 angegeben.

Tabelle 4.6: Parameter der 4PL-Funktion für das FRET-Assay. (*: um eine optimale Anpassung der 4PL-Funktion zu ermöglichen, wurde A auf 160 mV festgelegt; daher beträgt der Standardfehler 0)

Parameter	Wert	Standardfehler	Einheit
Minimales Signal	63	1,42	mV
Maximales Signal	160	0*	mV
Testmittelpunkt	0,18	0,023	mg/mL
Steigung im Mittelpunkt	1,19	0,15	mV/(mg/mL)

Parameter des Logistikmodells sind in Tabelle 4.6 gegeben. Zur Bestimmung der LOD wurde der Assay viermal ohne zugesetztes Transferrin ausgeführt; das erhaltene Signal beträgt 49,9 mV mit einer Standardabweichung von 10,2 mV. Mit diesen Daten und den Parametern der angepassten 4PL-Funktion lassen sich theoretisch LOD und LOQ bestimmen.

Die LOD beträgt demnach 0,05 mg/mL. Für eine Definition für die LOQ von Leersignal + 10 s wird der Wert allerdings größer als das gemessene Maximalsignal. Damit wäre der Assay zwar für eine qualitative Bestimmung von Transferrin geeignet, eine Quantifizierung ist hingegen nicht möglich.

Aus Parametern des 4PL-Modells (Tabelle 4.6) ist ersichtlich, dass die maximale Signaldifferenz nur etwa 100 mV beträgt; die Standardabweichung liegt durchschnittlich bei 11,1 mV. Diese Abweichung kann nur bedingt reduziert werden, da sie teilweise durch fertigungsbedingte Unterschiede am Boden der Reaktionsgefäße verursacht wird.

Die erreichte FRET-Effizienz lässt sich über das Verhältnis von maximalem und minimalen Signal abschätzen; in diesem System beträgt sie etwa 60 %.

4.2.4 Zusammenfassung

Obwohl es sich bei dem untersuchten Transferrin FRET-Assay um ein Modellsystem handelt, zeigen die Daten, dass die Nachweisgrenze dieses Assayaufbaus für die Detektion von YKL-40 wahrscheinlich nicht ausreichen würde. Das größte Problem dabei ist die maximal erreichbare Signaldifferenz im Vergleich zur Standardabweichung, die in diesem System nur eingeschränkt angepasst werden kann. Der Einsatz anderer Fluoreszenzfarbstoffe wie Quantendots oder Kryptatkomplexen (Vgl. 5.2) könnte die Signaldifferenz und damit die Nachweisgrenze zwar erhöhen, mit enzymgekoppelten Immunoassayverfahren gibt es auf dieser Plattform aber auch andere Möglichkeiten, die benötigte analytische Leistungsfähigkeit zu erreichen.

4.3 Magnetpartikel-basierter Fluoreszenzimmunoassay

4.3.1 Assayprinzip

Magnetische Partikel als Festphase mit Waschschritten und einem anschließenden enzymgestützten Substratumsatz können eingesetzt werden, um die für YKL-40 erforderlichen Nachweisgrenzen zu erreichen. Eine möglichst einfache Bedienung soll anschließend durch die Portierung des entwickelten Assays auf eine automatisierte LabDisk erreicht werden (Abbildung 2.3).

Als Entwicklungsplattform diente der Tubescanner, daher wurde der Assay zunächst so entwickelt, dass er in handelsüblichen 8-Tube Strips ausgeführt werden kann. Das Ziel war dabei, YKL-40 in einem diagnostisch relevanten Bereich aus humanem Serum nachzuweisen. Capture- und Detektionsantikörper waren mit dem für die klinische Studie eingesetzten ELISA identisch, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Methoden herzustellen.

Ein Schema des auf magnetischen Beads basierenden Fluoreszenzimmunoassays (MB-FIA) ist in Abbildung 4.7 A dargestellt.

Die Reagenzienmischung wird in die Reaktionsgefäße von 8-Tube Strips aliquotiert. Die so vorbereiteten Assaystrips können entweder gleich verwendet, oder bei 4 °C gelagert werden. Enthalten sind mit Captureantikörpern konjugierte magnetische Beads und ein Komplex aus Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Der eigentliche Assayablauf besteht aus drei Schritten:

- 1) Die Immunreaktion wird durch Zugabe der Probe gestartet, und unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.
- 2) Nach der Inkubation wird der Strip in einen Magnetseparator zur Sammlung der magnetischen Beads gestellt. Der Überstand wird verworfen. Anschließend werden die Beads in Waschpuffer resuspendiert, und der Separationsvorgang wiederholt.
- 3) Danach wird Substratlösung (siehe 4.3.2) zugegeben. War in der Probe YKL-40 enthalten, haben sich Komplexe gebildet, die das Fluoreszenz-Substrat abhängig von der YKL-40-Konzentration umsetzen. Die Fluoreszenz wird im Tubescanner gemessen (Abbildung 4.7 B).

Die Messung im Tubescanner ermöglicht hierbei nicht nur eine Endpunktmessung, sondern auch eine Verfolgung der Reaktionskinetik. Damit können Fehler im absoluten Signal korrigiert werden, wie sie etwa durch die Fertigungstoleranzen der Tubes

entstehen können (Abbildung 2.2 B + C). Außerdem können Ergebnisse bereits nach einer Minute ausgelesen werden. Dieses Vorgehen wird häufig bei Reaktionen eingesetzt, bei denen keine Endpunktmessung durchgeführt werden soll oder kann.

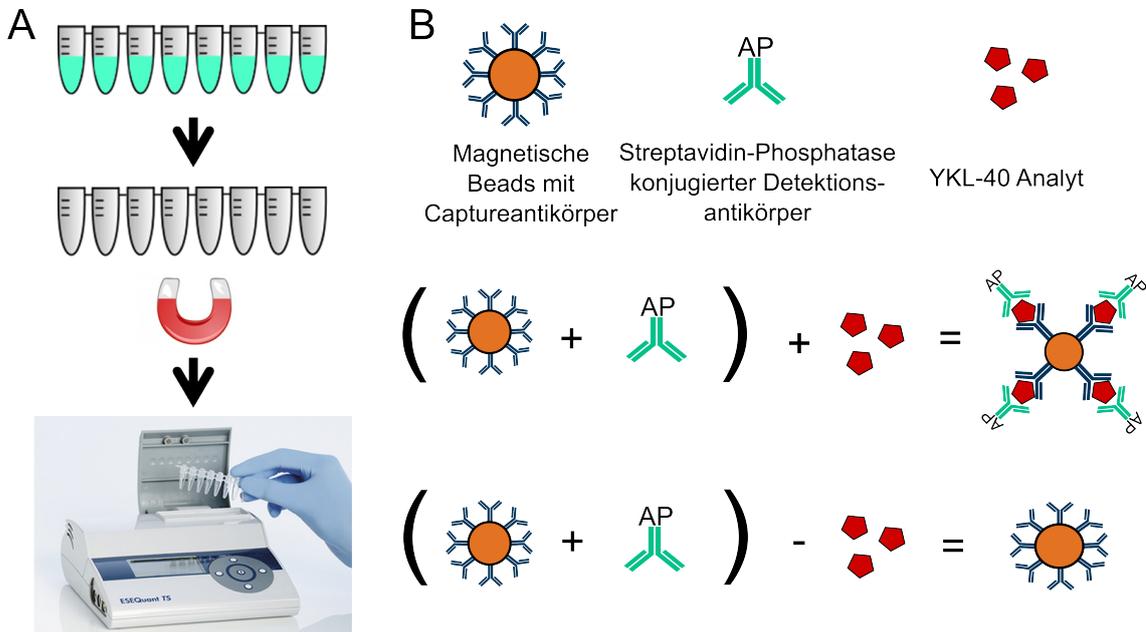


Abbildung 4.7: A) Der Assayablauf besteht aus drei Schritten mit einer magnetischen Separation. Die Detektion wird im Tubescanner ausgeführt. B) Ist Antigen vorhanden, bildet sich ein Immunkomplex. Dieser verbindet die Phosphatase mit den magnetischen Beads.

4.3.2 Charakterisierung von DDAO-Phosphat als Substrat

Der Fluoreszenzfarbstoff DDAO-Phosphat [9H-(1,3 dichloro-9,9 dimethylacridin-2-on-7-yl) phosphat] verändert seine Fluoreszenzeigenschaften durch Phosphatase-katalysierte Hydrolyse. Dadurch verschieben sich Anregungs- und Emissionsspektrum in den Messbereich des Tubescanners (Abbildung 4.8 A). Bei den werksseitig voreingestellten Anregungs- und Emissionswellenlängen 625/680 nm zeigt DDAO-Phosphat nur eine geringe Fluoreszenz, während DDAO gut detektierbar ist (Abbildung 4.8 B). Dadurch ist es als Substrat für die geplante Detektionsreaktion geeignet.

4.3.3 Optimierung

4.3.3.1 Annahmen zur Bestimmung der Anfangszusammensetzung des Assays

Nachgewiesen werden soll YKL-40 in einem Konzentrationsbereich von ca. 10 - 100 ng/mL (0,25 - 2,5 nM bei einem Molekulargewicht von 40 kDa), wobei vor allem der Bereich um 57,3 ng/mL (ca. 1,4 nM) besonders interessant ist. Bei der Auswahl

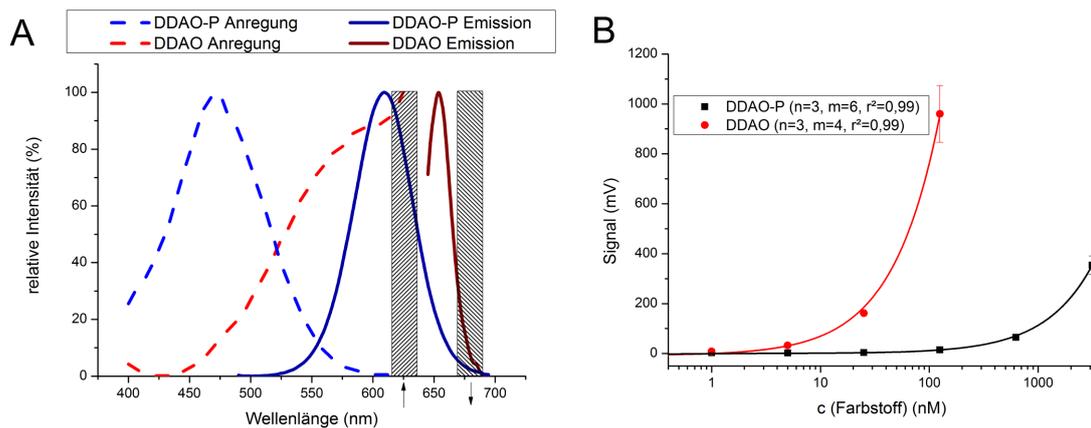


Abbildung 4.8: A) Anregungs- und Emissionsspektren vor und nach Dephosphorylierung des DDAO-Phosphats. Blau: Vor Dephosphorylierung (Anregungsmaximum 454 nm, Emissionsmaximum 610 nm); Rot: Nach Hydrolyse (Anregungsmaximum ca. 625 nm, Emissionsmaximum 654 nm). Normalisiert auf maximale Peakhöhe. B) Messung von Verdünnungsreihen der Farbstoffe im Tubescanner, Anregung 625 nm, Emission 680 nm.

der Anfangskonzentrationen der Assayreagenzien muss einerseits darauf geachtet werden, ausreichend Antikörper bereit zu stellen, andererseits besteht bei dem polyclonalen Sekundärantikörper die Gefahr, dass dieser bei zu großem Überschuss das Antigen durch die Bindung mehrerer Epitope von den Capture-Antikörpern abschirmen könnte. Da die Antikörper nicht gerichtet auf der Beadoberfläche immobilisiert sind, wird ein bestimmter Anteil nicht in einer funktionellen Konformation vorliegen. Dieser Anteil ist unter anderem abhängig von der Lage primärer Amine in den Antigenbindungsstellen. Dieser kann je nach Antikörper stark variieren und muss daher experimentell bestimmt werden. Auch der biotinylierte Sekundärantikörper kann durch Modifikationen an der Antigenbindungsstelle weniger affin sein als theoretisch möglich. Andererseits kann eine hohe Konzentration von Antikörpern die Assaygeschwindigkeit erhöhen.

Als Kompromiss wurden die Konzentrationen beider Antikörper anfänglich auf 7 nM festgelegt, um von diesem Punkt aus Optimierungsexperimente durchführen zu können. Diese Optimierungsexperimente zielten darauf ab, YKL-40 in einem klinisch relevanten Bereich mit einer Assaylaufzeit von weniger als 30 min im Tubescanner detektierbar zu machen. Die Experimente fanden mit Verdünnungspuffer als Matrix statt.

4.3.3.2 Konzentration der alkalischen Phosphatase

Die Signale in dem magnetischen Beadassay werden durch den Umsatz von DDAO-Phosphat zu DDAO durch den Streptavidin-Phosphatase-Komplex generiert, der via

Biotin an den Detektionsantikörper gebunden ist. Einerseits können an einen Detektionsantikörper potentiell mehrere Phosphatase-Moleküle binden; andererseits kann ein Überschuss von ungebundener Phosphatase das unspezifische Signal erhöhen. Da der Biotinylierungsgrad des Antikörpers nicht bekannt ist, wurde das optimale Verhältnis experimentell bestimmt. Die Konzentration des Detektionsantikörpers ist 7 nM; die Phosphatasekonzentration wurde zwischen 2,5 und 50 nM variiert. Die spezifischen Signale erreichten bei einer Phosphatasekonzentration von 15 nM ein Plateau bei 35 mV/min bei einer eingesetzten YKL-40-Konzentration von 333 ng/mL und 10 mV/min bei 37,5 ng/mL (Abbildung 4.9). Daher binden an einen Antikörper theoretisch etwa 2 Phosphatasemoleküle. Das Verhältnis Detektionsantikörper:Phosphatase wurde für spätere Experimente beibehalten. Die hohe Standardabweichung des Maximalsignals bei höheren Konzentrationen kann auf Schwankungen der nach dem Waschen erhalten gebliebenen magnetischen Beads zurückgeführt werden.

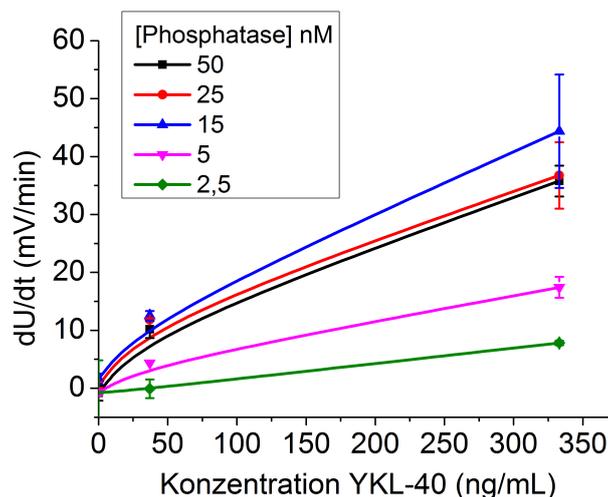


Abbildung 4.9: Variation der Streptavidin-Phosphatasekonzentration. Die Signale erreichen bei 15 nM ein Plateau, eine weitere Erhöhung der Konzentration führt zu keiner Verbesserung. Eine Phosphatasekonzentration von 15 nM und damit ein Verhältnis von biotinyliertem Detektionsantikörper/Phosphatase von 1/2 sind somit optimal ($n = 3$, $m = 3$). Signale sind als Ableitung (dU/dt) zum Zeitpunkt 1 min angegeben.

4.3.3.3 Waschschritte

Die Entfernung von überschüssigen Reagenzien und unspezifisch gebundenen Molekülen ist ein kritischer Schritt bei der Durchführung von Immunoassays. Daher wurde untersucht, wie viele Waschschritte notwendig sind, um das unspezifische Signal weitgehend zu minimieren. Ein Waschschritt mit 200 μ l Waschpuffer resultierte in einem gemessenen Signal-Rausch-Verhältnis von 6,5 bei $c(\text{YKL-40}) = 333$

ng/mL. Das Anfügen eines zweiten Waschschrilles reduzierte das unspezifische Signal beträchtlich, was das Signal-Rausch-Verhältnis auf 91 erhöhte (Abbildung 4.10 A).

4.3.3.4 Konzentrationverhältnis der Antikörper

Auch das Konzentrationsverhältnis der Capture- und Sekundärantikörper zueinander spielt eine wichtige Rolle in diesem Assayformat. Die Ausgangskonzentrationen wurden auf 7 nM/7 nM eingestellt. Von dort aus wurde die Konzentration des Capture-Antikörpers variiert; gemessen wurden die Verhältnisse 0,5:1, 1:1, 2:1 und 4:1. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration hatte direkt eine Erhöhung des spezifischen Signals zur Folge (Abbildung 4.10 B). Die Steigung steigt allerdings mit der eingesetzten Menge an Capture-Antikörpern und magnetischen Beads; der Grund dafür ist die geringere Stabilität des Beadpellets bei steigender Größe. Das Signal steigt selbst bei einem Verhältnis von 4:1 weiter an. Daher ist rechnerisch deutlich mehr Captureantikörper als Detektionsantikörper nötig. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass nur ein kleiner Teil der Captureantikörper in der richtigen Konformation an den Beads gebunden ist, und damit an der Immunreaktion beteiligt ist. Der Anteil der richtig an den Beads gebundenen Antikörper könnte beispielsweise durch eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper durch Protein A erhöht werden. Dabei wäre allerdings die Interaktion des Sekundärantikörpers mit den so modifizierten Beads schwierig zu vermeiden. Als Kompromiss zwischen Sensitivität und Reproduzierbarkeit wurde ein Verhältnis von 2:1 für weitere Experimente gewählt.

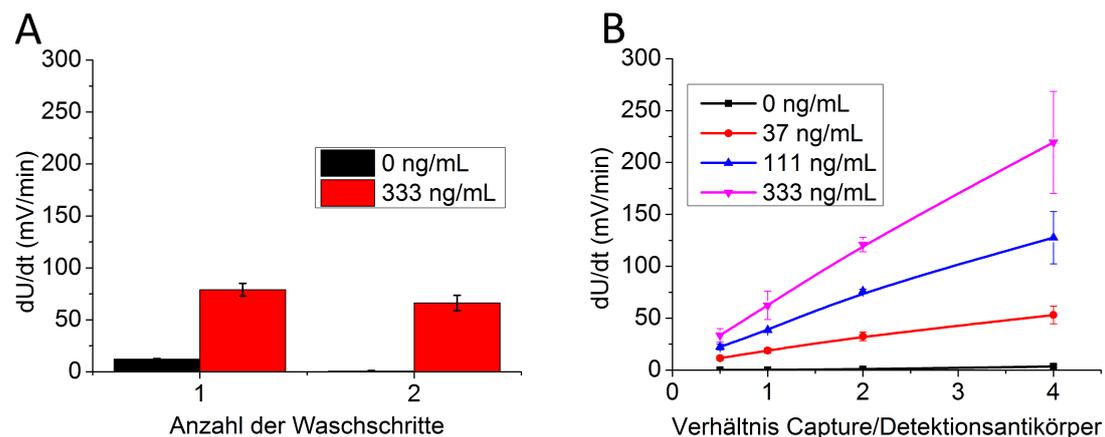


Abbildung 4.10: A) Effekt der Anzahl der Waschschrille auf das unspezifische Signal. Signale von 0 ng/mL und 333 ng/mL wurden gemessen, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu bestimmen ($n = 4$, $m = 2$). B) Variation der Konzentration des Sekundärantikörpers. Ein Antikörperüberschuss führt zu höheren spezifischen Signalen, aber auch höheren Standardabweichungen ($n = 4$, $m = 4$). Signale sind als Ableitung (dU/dt) zum Zeitpunkt 1 min angegeben.

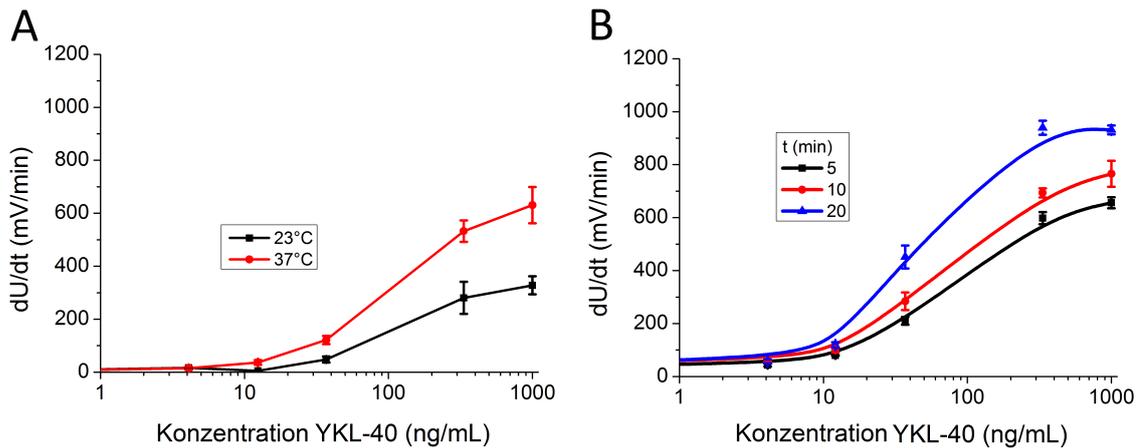


Abbildung 4.11: A) Erhöhung der Detektionstemperatur erhöht die spezifischen Signale, ohne zu unspezifischer Dephosphorylierung des Farbstoffs zu führen ($n = 4$, $m = 6$). B) Längere Inkubationszeiten führen zu höheren Signalen. 10 Minuten sind jedoch ausreichend für die benötigte Sensitivität ($n = 4$, $m = 6$). Signale sind als Ableitung (dU/dt) zum Zeitpunkt 1 min angegeben.

4.3.3.5 Substratumsatz und Inkubationszeit

Die Temperatur hat einen wichtigen Einfluss auf die Reaktionsrate des Detektionsschrittes. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 23 auf 37 °C resultierte in stark erhöhten Signalen. Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 20 Minuten variiert; eine Inkubationszeit von 10 Minuten wurde als der beste Kompromiss zwischen Schnelligkeit und Sensitivität betrachtet (Abbildung 4.11). Bei kürzeren Inkubationszeiten wird die Pipettiergeschwindigkeit zu einem limitierenden Faktor.

4.3.4 Charakterisierung des Assays

Um eine bessere Anpassung an reale Serumproben zu erreichen, wurde die Charakterisierung des Assays in 1/5 verdünntem, humanen Serum ausgeführt. Da bereits enthaltenes YKL-40 die Messungen stören würde, wurde es zunächst durch magnetische Beads aus dem Serum entfernt (depletiert). Zur Depletion wurde 1 mL gepooltes Serum mit 350 µg Capture-Antikörpern konjugierten magnetischen Beads (entsprechend ca. 10 nM Antikörper) 30 Minuten inkubiert, und anschließend die YKL-40-Konzentration des Überstandes mit dem Assay bestimmt. Die so erhaltenen Signale waren mit Puffermessungen vergleichbar (Tabelle 4.7).

4.3.4.1 Kalibrationskurve und Assayparameter

Mit den Werten aus den Optimierungsexperimenten (Tabelle 4.8) wurde ein LOD von 2,9 ng/mL erreicht, der LOQ lag bei 5,1 ng/mL. Gesunde Kontrollpatienten haben YKL-40-Serumkonzentrationen von etwa 29 ng/mL; daher sind diese Grenzen

Tabelle 4.7: Vergleich der Fluoreszenzableitungssignale von Verdünnungspuffer und depletiertem Serum. Die Signale unterscheiden sich nicht; daher kann davon ausgegangen werden, dass YKL-40 vollständig aus dem Serum eliminiert wurde.

(n = 2)	dU/dt (mV/min)	s
Verdünnungspuffer	14,7	1,6
Depletiertes Serum	13,4	2,2

Tabelle 4.8: Assayparameter

Parameter	Wert
Anzahl der Waschschritte	2
Verhältnis Phosphatase/Detektionsantikörper	15:7 (30 nM / 14 nM)
Verhältnis Capture-/Detektionsantikörper	2:1 (28 nM / 14 nM)
Inkubationstemperatur (°C)	23
Detektionstemperatur (°C)	37
Inkubationszeit (min)	10
Nachweisgrenze (ng/mL)(LOD)	2,9
Bestimmungsgrenze (ng/mL)(LOQ)	5,1
Assaydauer (min)	17

selbst dann ausreichend, wenn die Probe bis zu 1/5 verdünnt wird. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 0,85 und 12,3 %. Abbildung 4.12 zeigt die zugehörige Kalibrationsmessungen in verdünntem, depletierten Serum, an die eine 4PL-Funktion angepasst wurde. Da die Variation über die Konzentrationen nicht gleich ist, wurden die Fehler in der Berechnung mit gewichtet. Die 4PL-Funktion ließ sich gut an die Daten anpassen und kommt daher dem wahren Verlauf der Kalibrationskurve sehr nahe ($R^2 = 0,99$, $n = 2$, $m = 8$). Die Parameter des Logistikmodells sind in Tabelle 4.9 gegeben. Der Testmittelpunkt lag bei 71,6 ng/mL. Zwischen 0 und 111 ng/mL ist die Beziehung zwischen Konzentration und Signal linear, was auch den kritischen Wert von 57,3 ng/mL mit einschließt.

Tabelle 4.9: Parameter der 4PL-Funktion

Parameter	Wert	Standardfehler	Einheit
Minimales Signal	16,4	0,4	mV/min
Maximales Signal	524,8	1,5	mV/min
Testmittelpunkt	71,6	1,3	ng/mL
Steigung im Mittelpunkt	1,3	0,019	(mV/min)/(ng/mL)

Tabelle 4.10: Verdünnungslinearität, absolute Konzentrationen

Verdünnungsfaktor	0	2	4
Serum 1 (ng/mL)	39,7	44,3	41,7
Serum 2 (ng/mL)	36	39,5	40,3
Serum 3 (ng/mL)	73,5	91,2	90,9

Tabelle 4.11: Relative Verdünnungslinearität

Verdünnungs- faktor	Durchschnittliche Wiederfindung (%) (n = 3)	CV (%)
2	115,1	7,7
4	113,5	9,4

4.3.4.2 Linearität und Wiederfindung nach Standardaddition

Wiederfindungs- und Verdünnungsexperimente werden durchgeführt, um eventuelle Störungen des Assays durch den Unterschied zwischen der biologischen Probe und dem für die Standardkurve verwendeten Puffer zu erkennen. In Aufstock-Experimenten wird eine bekannte Menge Analyt zu einer natürlichen Probenmatrix wie z.B. Serum hinzugegeben. Anschließend wird die Konzentration mit der zu untersuchenden Methode bestimmt. Idealerweise weicht die so gefundene Konzentration nicht von der aufgestockten Menge ab. Bei Linearitätsexperimenten wird der Analyt aus mindestens zwei Verdünnungen der ursprünglichen Probe mit dem zu validierenden Assay bestimmt. Dafür wird eine Probe zunächst normal 1/5 verdünnt bestimmt. Dieselbe Probe wird 1/1 (Verdünnungsfaktor 2) und 1/4 (Verdünnungsfaktor 4) gemessen. Auch hier sollten die gefundenen Konzentrationen idealerweise kaum von den Erwarteten abweichen. Abweichungen können auftreten, wenn in der Probenmatrix Moleküle enthalten sind, die mit der Immunreaktion interferieren. In diesen Fällen kann die Matrix der Kalibrationsmessungen an die reale Probenmatrix angepasst werden, beispielsweise durch Verwendung von Realproben, aus denen der Analyt, nicht aber die interferierenden Substanzen eliminiert wurden. Dadurch sind Standard und Probe denselben Interferenzen unterworfen, und können valide miteinander verglichen werden.

Der Assay hat nahe des klinisch relevanten Cutoffs von 57,3 ng/mL eine ausreichende Verdünnungslinearität und Spike-Recovery (Tabellen 4.10 - 4.13), wenn auch mit einer gewissen Varianz (CV der Wiederfindung und Verdünnungslinearität 8,6 bzw. 27 %).

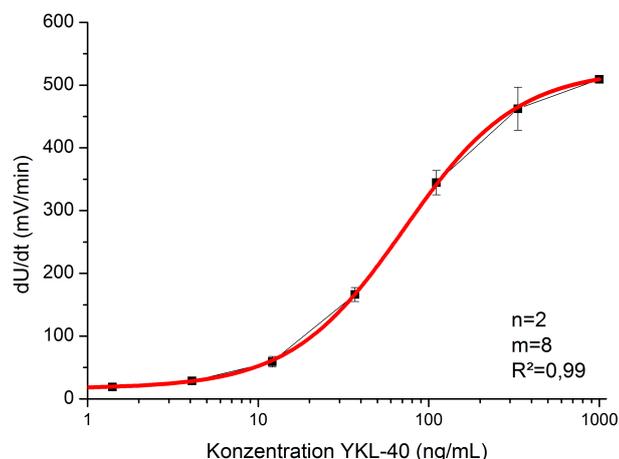


Abbildung 4.12: Kalibrationskurve des neu entwickelten Immunoassays. YKL-40-Konzentrationen von 0; 1,4; 4,1; 12,1; 37; 111; 333 und 1000 ng/mL (Anzahl der Kalibrationspunkte $m = 8$) wurden für die Kalibrierung in verdünntem, depletierten Serum gemessen. Ein 4-Parameter-Logistikmodell wurde an die Daten angepasst (Parameter siehe Tabelle 4.9). Signale sind als Ableitung (dU/dt) zum Zeitpunkt 1 min angegeben.

Tabelle 4.12: Absolute Wiederfindung

Spike (ng/mL)	Serum 4 (ng/mL)	Serum 5 (ng/mL)	Serum 6 (ng/mL)
0	11,6	9,0	14,2
10	24	16,7	24,4
25	42,7	28,6	44,1
50	79,1	47,1	75,9

Tabelle 4.13: Prozentuale Wiederfindung

Spike (ng/mL)	Durchschnittliche Wiederfindung (%) ($n = 3$)	CV (%)
10	101,0	23,7
25	107,6	25,5
50	111,5	31,1

4.3.4.3 Messung von Serumproben

Um die Anwendbarkeit des Assays zu überprüfen, wurden 14 Seren von gesunden Blutspendern und 14 Seren von Pneumoniepatienten aus dem Klinikum untersucht (Abbildung 4.13). Dabei zeigen Serumproben von Pneumoniepatienten deutlich höhere Signale als die von gesunden Blutspendern ($p < 0,01$). Die mittlere gemessene Serumkonzentration bei Pneumoniepatienten ist 333,6 ng/mL ($s \pm 225$ ng/mL), bei gesunden Blutspendern 50 ng/mL ($s \pm 49$ ng/mL).

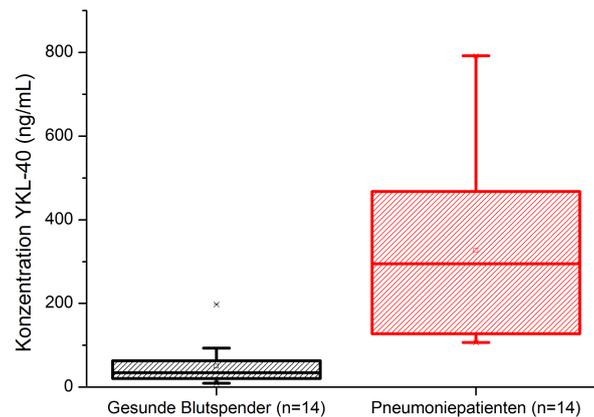


Abbildung 4.13: Der MB-FIA wurde benutzt, um die YKL-40 Serumkonzentration in 14 Blutspenderseren und 14 Seren von Pneumoniepatienten zu messen. Es zeigt sich eine klare Unterscheidung der beiden Gruppen ($p < 0,01$)

4.3.4.4 Methodenvergleich

Für die Messung von YKL-40 ist derzeit beim National Institute of Standards & Technologies (NIST) kein YKL-40 Standard Reference Material (SRM) verfügbar. Daher können nur die Abweichungen der Methoden voneinander dargestellt werden, was aber keine Rückschlüsse auf ihre Richtigkeit zulässt. Da das YKL-40-ELISA Kit der Firma R&D in zahlreichen Publikationen verwendet wurde, werden die Abweichungen des neu entwickelten Systems hiervon angegeben. Die Passing-Bablok-Regression (Abbildung 4.14) ergibt eine Steigung von 1,17 (95 % Konfidenzintervall 1,04 - 1,44), und einen Achsenabschnitt von -5,88 ng/mL (95 % Konfidenzintervall -19,1 - 7,23 ng/mL). Somit gibt es in gewissem Maße Abweichungen der beiden Methoden voneinander.

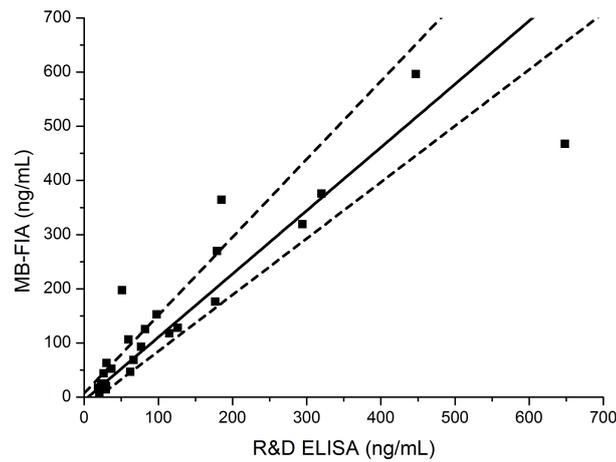


Abbildung 4.14: Passing-Bablok-Regression zum Vergleich des MB-FIA mit dem R&D Systems ELISA.

Aus dem Bland-Altman-Plot (Abbildung 4.15) kann man erkennen, dass die Abweichung der Methoden voneinander tendenziell von der Konzentration des Analyten abhängt. Die Abweichung ist aber im Bereich, der für den Ausschluss von Pneumonien dient (< 100 ng/mL) relativ gering. Der Mittelwert der Abweichung der Methoden voneinander beträgt $13,8$ ng/mL, was für eine geringe systematische Abweichung der Methoden voneinander spricht.

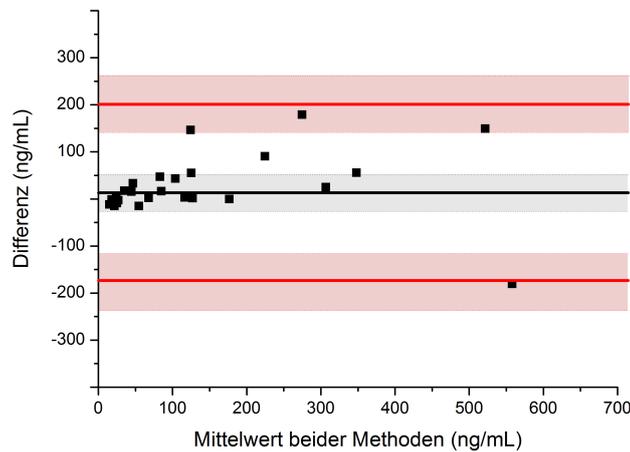


Abbildung 4.15: Bland-Altman-Plot zur Visualisierung der relativen Abweichungen des MB-FIA und des R&D ELISA voneinander. Eingezeichnet sind der Mittelwert der Abweichungen (Schwarze Linie), ± 2 Standardabweichungen des Mittelwertes (Rote Linien), sowie deren 95 % Konfidenzintervalle.

4.3.5 Zusammenfassung

Mit dem auf magnetischen Beads basierenden Assayformat konnte die notwendige analytische Leistungsfähigkeit für den Nachweis von YKL-40 zum Ausschluss von Pneumonien erreicht werden. Serumproben von Blutspendern und Pneumoniepatienten können mit diesem System zuverlässig unterschieden werden. Obwohl kleinere systematische und zufällige Abweichungen von dem R&D ELISA vorliegen, sind diese vor allem im Bereich unter 100 ng/mL nicht bedeutend. Dieser Assay wurde im nächsten Schritt auf eine automatisierte Plattform portiert.

4.4 Portierung auf LabDisk

4.4.1 Design der Disk

Zur Automatisierung des Assayablaufs wurde in Zusammenarbeit mit dem Hahn-Schickard-Institut für Mikroanalyssysteme eine zentrifugal-Reaktionskammer ("Lab-Disk"), basierend auf früheren Arbeiten entworfen (120), die einen Transport von magnetischen Beads durch Gasphasen-Transitions Magnetophorese (GTM)(Abbildung 4.16 C-F) ermöglichen soll. Dabei werden magnetische Beads zunächst durch einen Sammelmagneten fokussiert, um anschließend durch einen Transportmagneten aus der Flüssigkeit hinaus gezogen zu werden. Anschließend wird die Disk unter dem feststehenden Magneten so gedreht, dass das Beadpellet in die nächste Kammer abzentrifugiert werden kann (111). Da der für das Design verfügbare Platz auf der Disk begrenzt ist, konnte allerdings statt zwei nur ein Waschschrift implementiert werden. Abbildung 4.16 A zeigt die Positionierung der Disk im Diskreader. Der Sammelmagnet ist direkt über den Kammern angebracht, der Transportmagnet über den dazwischen liegenden Kanälen. Die Disk besteht aus drei Einlässen und drei Kammern, in denen der Assay ablaufen, gewaschen und detektiert werden kann (Abbildung 4.16 B). Das komplette Assaygemisch wird in der Probenkammer vorgelegt, in die Einlässe werden folgende Lösungen pipettiert:

- 1: 95 μL Probe,
- 2: 95 μL Waschpuffer,
- 3: 90 μL Substratlösung.

4.4.2 Frequenzprotokoll

Die Bedienung des LabDisk-Readers erfolgt über Protokolle, mit denen der Motor und damit die Rotationsgeschwindigkeit, das Gebläse und der Detektor angesteuert werden können. Aus den Assayspezifikationen und den Notwendigkeiten des GTM-basierten Transports der magnetischen Beads ergab sich das in Tabelle 4.14 dargestellte Frequenzprotokoll. Die Temperatur wurde für Inkubations- und Waschschrift auf 23 °C gehalten, für die Detektionsreaktion auf 37 °C erhöht. Der Zeitbedarf setzt sich zusammen aus:

- Immunoreaktion: 10 Minuten,
- Transfer in die Waschkammer: 5 Minuten,
- Waschen: 1 Minute,
- Transfer in die Detektionskammer: 5 Minuten,

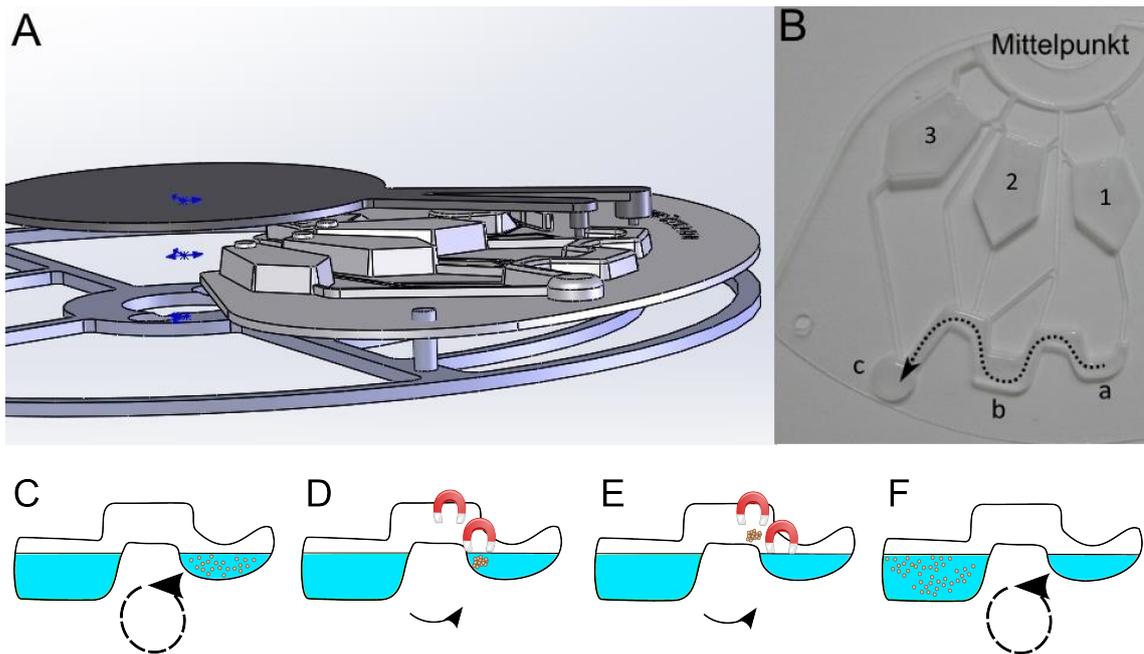


Abbildung 4.16: A) Die rotierende Disk ist in einem Halter eingespannt; die Magnete sind im Deckel verbaut. B) Aufbau der LabDisk. 1: Probeneinlass; 2: Waschpuffereinlass; 3: Substrat zur Detektion; a: Probenkammer; b: Waschkammer; c: Detektionskammer. Der Pfeil gibt die Richtung des Beadtransports an. Die zusätzlichen Kanäle dienen dem Druckausgleich. C-F) Schema des Transports der magnetischen Beads durch die Kammern. Die Beads werden zunächst unter dem Sammelmagneten fokussiert, um mit dem Transportmagneten aus der Flüssigkeit gezogen zu werden. Die Disk wird dabei langsam gedreht, sodass sich die Beads an der nächsten Kammer vom Magneten lösen. Abbildung mit freundlicher Erlaubnis des Hahn-Schickard-Instituts für Mikroanalyzesysteme.

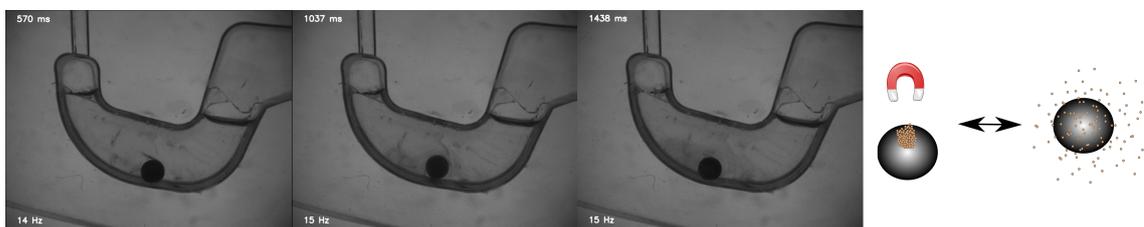


Abbildung 4.17: Die kleinen, superparamagnetischen Beads lassen sich mit Hilfe einer ferromagnetischen Kugel (Durchmesser 1 mm) durch die Kavitäten bewegen, und lösen sich anschließend vollständig von der Kugel, wodurch ihre Oberfläche optimal ausgenutzt werden kann (Aufnahmen in der rotierenden LabDisk mit Stroboskopkamera, zu erkennen sind die magnetischen Beads, die sich als diffuse Wolke innerhalb einer Sekunde von der Stahlkugel lösen).

- Inkubation der Substratreaktion mit Fluoreszenzdetektion: 9 Minuten.

Mit diesem Protokoll kann der Assay vollautomatisch in etwa 30 Minuten ablaufen.

4.4.3 Automatisierter magnetophoretischer Transport

Erste Versuche mit dem LabDisk-System zeigten, dass die in dem ursprünglichen Assay verwendeten superparamagnetischen Beads nicht ausreichend magnetisierbar waren, um die Oberflächenspannung der Lösungen zu überwinden. Die Beads verblieben in der ersten Kammer, eine Detektion war nicht möglich.

Die ursprüngliche Methode zur Gasphasen-Transitions-Magnetophorese wurde mit einer vergleichsweise großen Menge (690 μg) an ferromagnetischen Beads ausgeführt, die dazu eine deutlich höhere magnetische Suszeptibilität aufwiesen (111). Ferromagnetische Stoffe besitzen zwar ausreichend magnetische Suszeptibilität, um entgegen der Viskosität durch ein äußeres Magnetfeld schnell aggregiert zu werden. So gesammelt können Sie die Reibungskräfte an der Disk sowie Oberflächenspannung überwinden. Allerdings neigen diese Materialien als Beads durch gegenseitige Anziehung zu starker Aggregation, was eine genaue Dosierung sehr schwierig macht. Ein Abwiegen der Beads ist zwar theoretisch möglich, aber praktisch nicht umsetzbar. Das Einwiegen müsste nach dem Modifizieren geschehen. Sonst wäre für jede Reaktion eine separate Kopplung notwendig, was zu hohen Schwankungen geführt hätte. Außerdem ist das Abwiegen einer großen Zahl von Aliquots im mittleren μg -Bereich ebenfalls sehr aufwändig und potentiell eine Fehlerquelle, die durch die magnetischen Anziehungskräfte noch verstärkt wird.

In vielen Fällen wird bei der Verwendung von Beads in Immunoassays das gute Verhältnis von Oberfläche zu Volumen als Vorteil angeführt. Dadurch ist es möglich, die Inkubationszeit herabzusetzen, ohne an Sensitivität zu verlieren. Bei der GTM ist allerdings auch das Volumen bzw. die Masse entscheidend. Je höher die Masse, desto höher die durch einen äußeren Magneten ausgeübte Kraft.

Eine Erhöhung der Beadmenge auf ein Maß, das eine Überwindung der Oberflächenspannung erlaubt, würde einerseits die Kosten beträchtlich steigern. Andererseits sind unspezifische Bindungen abhängig von der verfügbaren Oberfläche. Wird diese durch den Einsatz einer großen Beadmenge stark erhöht, ist mit der Zunahme von unspezifischen Signalen zu rechnen. Der Abstand der Neodymmagnete und damit das einwirkende Magnetfeld ist festgelegt. Die magnetischen Eigenschaften der Beads können nicht beliebig verändert, und ihre Menge nicht beliebig erhöht werden.

Um dennoch einen Transport zu ermöglichen, wurden die superparamagnetischen Beads mit einer Stahlkugel mit 1 mm Durchmesser kombiniert. Laut Herstelleran-

Tabelle 4.14: Frequenzprotokoll zur Automatisierung des MB-FIA auf einer Labdisk.

Frequenz (Hz)	Dauer (s)	Anmerkung	Zweck
10	5		Pumpen der Flüssigkeiten in die Kammern
45	120		Plasma-Separation des Vollblutes in der Reaktionskammer
20	1.25	Entschleunigung mit 20 Hz/s	Primen des Syphons und Transfer des Plasmas in die Probenkammer
6-15	10-10	Alternieren zwischen 6 und 15 Hz für 10 min	Inkubation der Assay-Reaktion, konstantes Mischen
-	240	Positionieren unter Sammelmagnet, langsames durchfahren der Kammer	Sammeln der Beads
-	60	Positionieren unter Transportmagnet	Transportieren der Beads
10-15	10-10	Alternieren zwischen 10 und 15 Hz für 1 min	Waschen
-	240	Positionieren unter Sammelmagnet, langsames durchfahren der Kammer	Sammeln der Beads
-	60	Positionieren unter Transportmagnet	Transportieren der Beads
-	5	Positionieren über Detektor	Detektion des Signals zu Beginn der Reaktion
8-15	10-10	Alternieren zwischen 8 und 15 Hz für 3 min	Mischen der Detektionsreaktion
-	5	Positionieren über Detektor	Detektion
-		Dreimaliges Wiederholen der letzten beiden Schritte	Verlauf des Substratumsatzes

gaben haben die verwendeten 2,5 µg Magnetbeads etwa eine Oberfläche von 4 mm². Die Stahlkugel mit 1 mm Durchmesser hat bei einer Oberfläche von 3,1 mm² eine Masse von etwa 6 mg. Demnach kann durch die Kombination die Masse etwa um den Faktor 2000 erhöht werden, während sich die Oberfläche nur verdoppelt.

Der verwendete Chromstahl ist ferromagnetisch, d.h. in einem externen magnetischen Feld wird er selbst zum Magneten, und kann seinerseits die weniger suszeptiblen magnetischen Beads an sich ziehen. Durch die hohe magnetische Kraft, die auf die Kugel ausgeübt wird, kann diese problemlos die Oberflächenspannung überwinden, und nimmt die magnetischen Beads mit sich (Abbildung 4.17).

Mit dieser Anpassung wird ein Transport von kleinen Mengen superparamagnetischer Beads durch GTM in der LabDisk ermöglicht.

4.4.4 Lyophilisierung

Um Transportfähigkeit und Lagerungsbeständigkeit für den als POCT-System vorgesehenen LabDisk-Assay zu erreichen, wurde eine Strategie zur Lyophilisierung des Assaygemisches entwickelt. Hierfür wurden die vom Hahn-Schickard-Institut bereitgestellten Cyclo-Olefin-Polymer (COP)-Formen mit PVC-Folien überzogen (Abbildung 4.18). Anschließend wurden die Formen vakuumiert (0,001 bar), und schnell auf Umgebungsdruck gebracht (10 s). Dadurch entstanden kleine, halbrunde Formen, in die jeweils 10 µL Assaygemisch pipettiert werden konnte. Diese wurden bei -80 °C gefroren, und für 2 h in eine Lyophilisierungsanlage überführt ($p = 0,001$ bar, $T(\text{Kondensator}) = -50$ °C).

Um die enthaltenen Proteine zu stabilisieren, wurden verschiedene gängige Lyophilisierungszusätze geprüft und kombiniert. Die Fluoreszenzsignalstärke wurde gemessen, indem der Assay zur Bestimmung einer Probe mit 333 ng/mL YKL-40 durchgeführt wurde. Dazu wurden zunächst Asparagin, Asparaginsäure, Glycin, Histidin, Leucin, Phenylalanin, Serin, Ethylenglycol, Mannitol, Ribose, Sucrose, und Trehalose einzeln mit einer Konzentration von 5 mg/ml zugesetzt, die Lyophilisierung durchgeführt und die Signalstärke des Assays nach 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur bestimmt (Abbildung 4.19 A). Trehalose, Sucrose, Asparagin und Phenylalanin führten zu den besten Resultaten.

Eine Kombination von Trehalose und Phenylalanin sowie Trehalose mit Asparagin führte zu einer nochmals verbesserten Haltbarkeit (Abbildung 4.19 B).

Der Zusatz von Phenylalanin führte allerdings zusätzlich zu einer verbesserten, fast styroporartigen Konsistenz und Integrität des Pellets, ohne die Löslichkeit zu beeinträchtigen. Diese Kombination erlaubte so eine weitere Verarbeitung selbst mit einer Pinzette. Ohne Phenylalanin waren die Pellets instabil und zerfielen leicht bei der weiteren Verarbeitung.

Eine Kombination aus 10 mg/mL Trehalose mit 10 mg/mL Phenylalanin mit dem im Assaygemisch enthaltenen 10 mg/mL HSA führten so zu einer ausreichenden chemischen und mechanischen Stabilisierung. Nach einer Woche bei 40 °C wurden 80 % der ursprünglichen Aktivität erhalten. Die Kombination aus Zucker, Aminosäuren und Protein führt zu einer lockeren, aber stabilen Struktur der Pellets (Abbildung 4.18). Diese erlaubt einerseits ein Bearbeiten und Verschicken der einzelnen Pellets, andererseits werden die Reagenzien schnell und vollständig in einer zugegebenen Probe gelöst. Dadurch konnten die resultierenden Pellets anschließend in die Formen überführt, verschickt und einzeln entnommen werden.

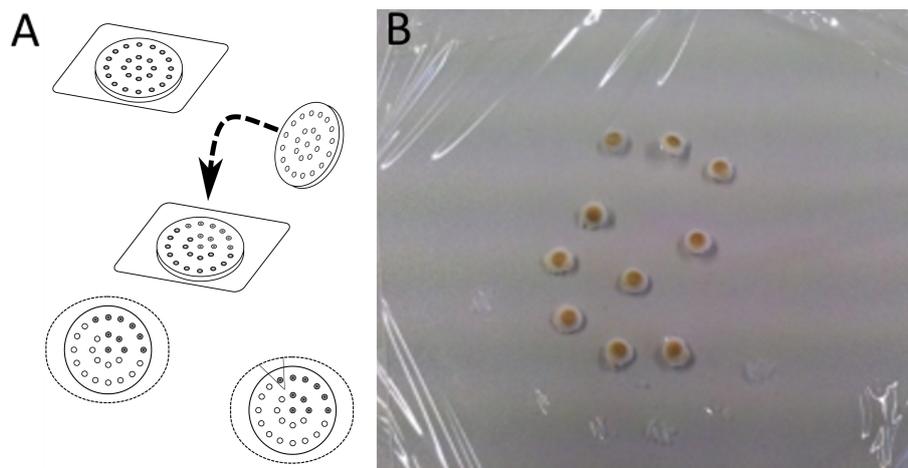


Abbildung 4.18: A) Schema des Lyophilisierungsprozesses; zunächst wird Folie durch Unterdruck an die Form gepresst. In die dadurch entstandenen Vertiefungen kann 7,5-10 μ L Assaygemisch pipettiert werden. Nach Schockfrieren und Lyophilisierung können die entstandenen Pellets selbst in die Formen übertragen, und anschließend mit Folie verschweisst werden. Dadurch wird ein Versand möglich. B) Lyophilisierte Pellets auf der Folie.

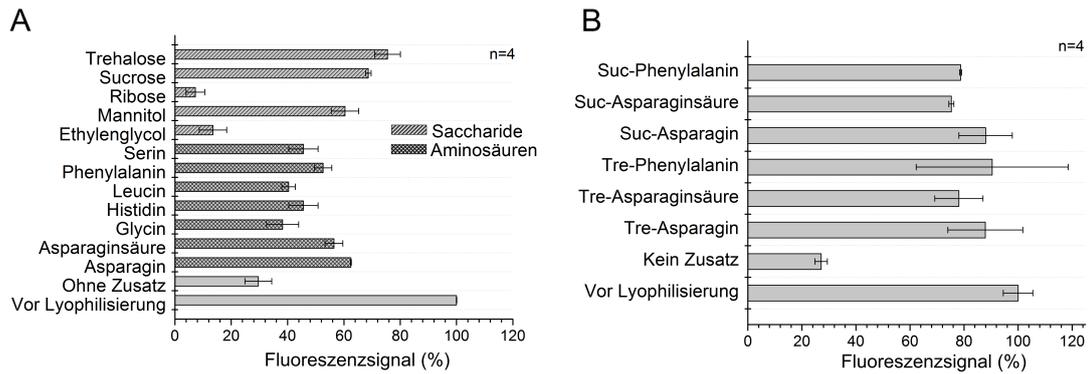


Abbildung 4.19: Auswirkung von verschiedenen Lyophilisierungszusätzen auf die Konservierung des Assaygemisches. Angegeben ist das Fluoreszenzsignal bei Ausführung des Assays nach 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur relativ zum Ausgangssignal des Assays vor Lyophilisierung. Alle Reagenzien wurden in einer Konzentration von 5 mg/mL eingesetzt. Suc: Sucrose; Tre: Trehalose. A) Einzelreagenzien B) Kombination von Zusatzstoffen. Die Tre-Phe und Tre-Asp-Kombinationen führen zu vergleichbarer Stabilisierung. Aufgrund der vorteilhaften mechanischen Eigenschaften wurde für weitere Versuche die Kombination aus Trehalose mit Phenylalanin gewählt (alle n=4).

4.4.5 Proof-Of-Concept

Durch die substanzielle Verbesserung des Beadtransports und der Entwicklung einer Lyophilisierungsstrategie konnten Demonstrationsmessungen mit dem automatisierten System durchgeführt werden. Dazu wurden zunächst verschiedene Konzentrationen von YKL-40 in fetalem Kälberserum (FCS) verdünnt, und der Assayablauf mit diesen Proben nach dem Protokoll in Tabelle 4.14 vollautomatisch durchgeführt. Es ergibt sich eine klare Konzentrationsabhängigkeit der erhaltenen Signale, was die Funktionsfähigkeit des automatisierten Assayablaufs demonstriert (Abbildung 4.20). Diese Messungen wurden mit dem selben Protokoll auch mit humanen Serumproben durchgeführt. Die so erhaltenen Signale sind zwar um das 10-50-fache im Vergleich zum MB-FIA reduziert, eine Unterscheidung verschiedener YKL-40-Konzentrationen ist aber auch aus diesem Material möglich (Tabelle 4.15).

4.4.6 Zusammenfassung

Um das im Tubescanner funktionsfähige Magnetbead-basierte Fluoreszenzimmunoassay auf die automatisierte LabDisk zu portieren, mussten zwei zentrale Probleme gelöst werden.

Zunächst musste der Beadtransport ermöglicht werden, ohne die unspezifischen Bindungen zu erhöhen. Um die ausgeübte magnetische Kraft bei möglichst kleiner Oberfläche zu maximieren, wurde das bestehende Beadassay mit einer Stahlkugel

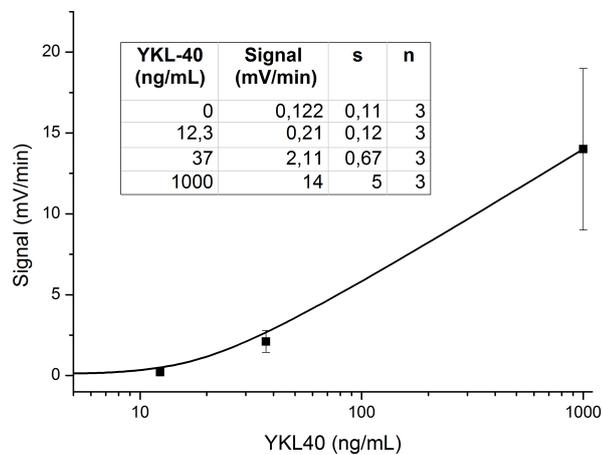


Abbildung 4.20: Demonstrationsmessungen im Diskreader-System, FCS aufgestockt mit YKL-40. 10 min Inkubationszeit, Detektion bei 37 °C.

Tabelle 4.15: Messung von Serumproben mit dem automatisierten System.

Typ	LabDisk (mV/min) n=1	Beadassay (mV/min)	s (mV/min) n=3	ELISA (ng/mL)	s (ng/mL) n=2
Kontrolle	0,51	6,8	2,9	6,4	0
Kontrolle	0,9	20,5	5,1	20,7	0,56
Kontrolle	2,9	23,7	4,5	29,2	0,7
Kontrolle	1,7	25,9	4,2	18,7	1,1
Pneumonie	4,1	279	58	320	0,98
Pneumonie	3,6	161	20	177	8,8
Pneumonie	3,7	224	15	179	7,5
Pneumonie	5,0	121	11	126	1,1

mit 1 mm Durchmesser kombiniert. Erst durch diese Modifikation konnte die kleine Menge von superparamagnetischen Beads in der Disk überhaupt durch GTM durch die Kavitäten transportiert werden.

Außerdem musste eine Möglichkeit gefunden werden, das Assaygemisch zu verschicken, und möglichst unversehrt in die LabDisks verschweißen zu können.

Dafür wurde ein Lyophilisierungsprotokoll entwickelt, das in stabilen, zur Weiterverarbeitung geeigneten, aber gut löslichen Pellets resultierte und dabei eine für den Transport ausreichende Stabilisierung der Assayreagenzien gewährleistete. Durch die Verwendung von PVC-Folie und die Bildung von Vertiefungen durch Unterdruck konnte das Assaygemisch in einer Form lyophilisiert werden, die anschließendes Verschicken und einfache Handhabung der einzelnen Pellets ermöglichte. Durch den Einsatz von Phenylalanin und Trehalose wurden nicht nur die Assayreagenzien stabilisiert, sondern auch die Festigkeit des Pellets bei gleichzeitig guter Löslichkeit erhöht.

Durch diese Entwicklungen war es möglich, mit einem vollautomatisierten Protokoll YKL-40 sowohl in FCS als auch in humanen Serumproben zu detektieren.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung des neuen Inflammationsmarkers

Die vorliegende Dissertationsarbeit zeigt, dass YKL-40 als Inflammationsmarker in der Diagnostik geeignet ist, da es bei inflammatorischen Erkrankungen im Serum erhöht vorliegt, was jedoch auch im selben Maße auf CRP zutrifft.

YKL-40 erlaubt allerdings darüber hinaus im Gegensatz zu CRP eine Unterscheidung von Pneumonien und anderen inflammatorischen Erkrankungen, und erreicht für diese Fragestellung einen negativ-prädiktiven Wert von 100 %. Das macht ihn für den diagnostischen Einsatz als Ausschlussmarker attraktiv.

Untersuchungen zur diagnostischen Wertigkeit von YKL-40 bei bronchopulmonalen Entzündungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen ausgeführt. So untersuchten Wang und Mitarbeiter den Nutzen von YKL-40 im Management von außerhalb des Krankenhauses erworbener Pneumonie (Community Acquired Pneumonia, CAP) (82). Dabei wurde der YKL-40-Plasmaspiegel bei 61 erwachsenen CAP-Patienten vor und nach der Behandlung, sowie bei 60 gesunden Kontrollpersonen bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollen für YKL-40 ist hier 23,1 ng/mL, und damit mit dem in der vorliegenden Studie vergleichbar. Bei CAP-Patienten wurde hier eine mittlere YKL-40-Konzentration von 62,1 ng/mL gemessen, welche nach der Behandlung auf 39,6 ng/mL abfiel. Dieser im Vergleich niedrige Wert könnte neben der Verwendung eines anderen ELISAs durch das etwas niedrigere Durchschnittsalter (59,5 Jahre im Vergleich zu 70 Jahren) der Probanden erklärt werden. Andererseits ist auch der CRP-Wert mit 8,6 mg/dL deutlich niedriger als im Patientenkollektiv dieser Studie. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Erhöhung der YKL-40-Serumkonzentration auch erregerabhängig ist (86, 121). Wang *et al.* konnten neben den reinen Diagnosen auch Daten zur Berechnung des PSI- und CURB65-Score verwenden und damit zeigen, dass der YKL-40-Plasmaspiegel im Gegensatz zu anderen Inflammationsmarkern mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Die Behandlung mit Antibiotika senkte den YKL-40-Spiegel, allerdings ist der genaue Zeitpunkt der zweiten Messung nicht angegeben. YKL-40 wurde im Vergleich mit CCL18, SP-D und KL-6 auf seine Eignung zur Risikostratifikation bei CAP untersucht. Hierfür wurden die Blutproben von 289 Patienten mit CAP bei Einlieferung auf die vier Biomarker untersucht. YKL-40, CCL-18 und SP-D waren bei schwerer Pneumonie (PSI 4-5 und CURB65 >1) deutlich erhöht. Darüber hinaus konnte YKL-40 die 30-Tage-Mortalität ähnlich gut vorhersagen wie der PSI (AUC für PSI 0,81; YKL-40 0,79; CCL18 0,69; SP-D 0,61). Damit eignet es sich gut als Risikostratifikationsmarker bei CAP (122).

Die Korrelation der YKL-40-Werte mit PSI oder CURB65 wird zwar in vielen Studien gezeigt, kann allerdings nicht in allen Studien bestätigt werden (83).

Die diagnostische Wertigkeit von YKL-40 bei verschiedenen Lungenerkrankungen wurde anhand von 460 Patienten mit malignen Erkrankungen, Pneumonien, Tuberkulose, Herzversagen, Asthma und COPD untersucht (89). Die dabei gemessenen Werte für YKL-40 im Serum entsprechen den in der vorliegenden Studie gefundenen, und wurden mit einem ELISA des selben Herstellers erhoben. So wurden bei gesunden Kontrollen ($n = 73$) Werte von 28 ng/mL (Median) gemessen; bei Pneumoniepatienten ($n = 80$) 427 ng/mL. Das Ziel war hier die Unterscheidung von malignen Erkrankungen und Tuberkulose; YKL-40 konnte dabei besser als andere Marker zwischen den Krankheitsbildern unterscheiden. Auch zur Behandlungsbegleitung bei Asthma ist YKL-40 besser geeignet als CRP. In dieser Studie wurden allerdings andere Krankheitsbilder, die mit erhöhten YKL-40-Serumkonzentrationen einhergehen, nicht beachtet.

Die hier durchgeführte Studie konnte hingegen zeigen, dass YKL-40 auch in einem Kollektiv aus *verschiedenen* inflammatorischen Erkrankungen selektiv als Pneumoniemarkers dienen kann. Dies ist bei CRP nicht der Fall.

In dem rekrutierten Kollektiv sind deutlich häufiger Pneumonien als andere inflammatorische Erkrankungen eingeschlossen. Daher lassen die Daten keine Rückschlüsse auf reale Krankenhauspopulationen zu.

Allerdings nähert sich die Studienpopulation damit eher einem Kollektiv aus Verdachtsdiagnosen an. Für den tatsächlichen Einsatzbereich des neuen Markers, nämlich eine Verdachtsdiagnose zu untermauern oder zu falsifizieren, ist das von Vorteil. Dennoch wäre eine Untersuchung von YKL-40 in einem rein aus Verdachtsdiagnosen zusammengesetzten Kollektiv hilfreich, um die diagnostische Wertigkeit realistisch einzuschätzen.

Die Daten zeigen, dass die Messung von YKL-40 helfen könnte, z.B. bei einem erhöhten CRP-Wert eine Pneumonie auszuschließen. Auch eine Ergänzung von bestehenden Einordnungssystemen wie CURB65 oder PSI mit einer YKL-40-Bestimmung ist denkbar. Eine Messung von YKL-40 könnte so die Pneumoniediagnostik unterstützen.

Die Lunge weist bereits im gesunden Zustand eine im Vergleich zu anderen Organen deutlich erhöhte Konzentration an lokalen Neutrophilen auf (123). Diese sind neben Makrophagen und Epithelzellen die Hauptquellen von YKL-40. Es wäre daher interessant, auch andere von Neutrophilen ausgeschüttete Proteine wie Lactoferrin und NGAL auf ihre Eignung für eine genauere Einschätzung der inflammatorischen Reaktion zu untersuchen. MMP-9, das bei der STRING-Interaktionsanalyse zusammen mit YKL-40 als STAT-3-Aktivator identifiziert werden konnte (siehe Abbil-

dung 1.3), wird ebenfalls unter anderem von Neutrophilen und Epithelzellen gebildet (124), und weist damit ein ähnliches Expressionsmuster wie YKL-40 auf.

Die im Vergleich zu anderen inflammatorischen Erkrankungen stärkere Erhöhung von YKL-40 bei Pneumonien ist wahrscheinlich auf das Zusammenspiel aus der Größe des Epithels, der hohen Anzahl an alveolären Makrophagen, das Vorhandensein von zahlreichen Neutrophilen und die gute Perfusion der Lunge zurückzuführen.

Damit hat sich YKL-40 in dieser Studie als für Lungenerkrankungen nützlich herausgestellt, dürfte sich aber auch als Marker akuter Inflammation anderer Gewebe eignen. Dies ist insbesondere interessant, wenn Marker wie CRP aufgrund Schädigungen der Hepatocyten nicht mehr ausreichend gebildet werden können, oder die Untersuchung lokalisierter Inflammation im Vordergrund steht.

5.2 Förster-Resonanzenergietransfer basierter Immunoassay

Förster-Resonanzenergietransfer basierte, homogene Immunoassays sind aufgrund des Assayprotokolls ohne Abtrennung der Immunkomplexe im Rahmen der analytischen Bestimmung attraktiv (109). Werden die markierten Reagenzien lyophilisiert vorgelegt, kann die Reaktion durch Zugabe der Probe gestartet, und das Ergebnis ohne weitere Verarbeitungsschritte ausgelesen werden. Weitere Wasch- und Transportschritte entfallen, was für eine Automatisierung vorteilhaft ist.

Durch fehlende Waschschrirte und direkte Detektion ohne Substratumsatz entstehen allerdings auch analytische Nachteile. Da die Detektion in einer nahezu unverdünnten Serummatrix stattfindet, muss einerseits auf die Eigenfluoreszenz des Serums, andererseits auf eventuelle Trübungen und Hämolyse geachtet werden (125, 126). Diese könnten vergleichsweise einfach mit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung umgangen werden, bei der ein relativ großer Zeitabstand zwischen der Anregung und der Messung der Emission liegt. Damit kann der Einfluss des Streulichts und der relativ kurzlebigen Eigenfluoreszenz ausgeschaltet werden.

Eine andere Möglichkeit zur Umgehung ist die Verwendung von Farbstoffen mit einem außergewöhnlich großem Stokes-Shift.

Diese Prinzipien sind im TRACE-Verfahren (time resolved amplification of cryptate emission) realisiert, das durch die Verwendung von Kryptat-Komplexen mit langer Halbwertszeit des angeregten Zustands zusammen mit einem sensitiven Detektionsgerät auch niedrig konzentrierte Analyte in komplexen Proben nachweisen kann (125).

Im Gegensatz zu enzymbasierten Assays wird bei FRET-basierten Assayformaten

kein Substrat umgesetzt, daher ist einerseits die Effizienz des FRET-Effekts, andererseits die Sensitivität des verwendeten Messgeräts für die Nachweisgrenze von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein FRET-basierter Assay im Tubescanner realisiert, ohne die Wellenlängen auf Kryptatkomplexe mit großem Stokes-Shift anpassen zu müssen. Um Störungen durch die Autofluoreszenz weitestgehend zu vermeiden, muss hier im roten Spektralbereich (> 600 nm) gearbeitet werden (126). Die mit diesem System erreichte FRET-Effizienz von 60 % ist sehr gut; die typischen FRET-Effizienzen in homogenen Assays bewegen sich zwischen 30 - 50 % (109).

Um Nachweisgrenzen in einem für YKL-40 relevanten Bereich zu erreichen, müssten allerdings das Verhältnis der Standardabweichungen zum maximalen Signalunterschied reduziert werden. Das könnte einerseits durch die Reduktion der Abweichungen erreicht werden. Bei der Ausführung wurde allerdings bereits soweit möglich mit automatisierten Pipetten gearbeitet, um manuelle Fehler weitestgehend auszuschließen. Eine mögliche Fehlerquelle, die nicht ausgeschlossen werden kann, sind die verwendeten Tubestrips. Durch den konfokalen Aufbau, in dem das Licht von unten durch den Boden der PCR-Tubes gestrahlt wird, spielt die Dicke des Bodens der Tubes eine Rolle, die eine gewisse Fertigungstoleranz aufweist. Daher kann die Streuung nicht weiter verbessert werden, sofern nicht teure Spezialanfertigungen als Verbrauchsmaterial verwendet werden sollen.

Eine Erhöhung des maximalen Signalunterschiedes würde entweder einen sensitiveren Detektor, Farbstoffe mit besserer Quantenausbeute oder höhere FRET-Effizienz erfordern. Die Quantenausbeute könnte theoretisch durch die Verwendung von Quantenpunkten erhöht werden (127), wobei die erreichbaren Nachweisgrenzen aber auch hier von Detektor abhängen würden. Anpassungen des Detektors für große Stokes-Shifts und zeitaufgelöste Messung könnten FRET-Immunoassays mit ausreichender Sensitivität im Tubescanner ermöglichen. Eine Anpassung für größere Stokes-Shifts dürfte über die Änderung der verwendeten Filter technisch einfach zu lösen sein. Die Integration einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung ist in dem verwendeten POC-System allerdings nicht realisierbar.

Daher können FRET-basierte Assays im Tubescanner zwar eingesetzt werden, um Analyten mit hohen Konzentrationsunterschieden qualitativ nachzuweisen. Für niedriger konzentrierte Marker eignet sich diese Nachweismethode hier jedoch nicht.

Zu diesem Zweck können auch enzymgestützte Immunoassays mit diesem System ausgeführt werden, was keine Anpassung des Detektors notwendig macht.

5.3 Magnetbead-basierter Fluoreszenzimmunoassay

Magnetische Beads ermöglichen durch die Immersion der festen Phase in die Lösung hohe Sensitivitäten bei kurzen Inkubationszeiten, und finden daher bereits breite Anwendung (128). Die Komplexität der Prozessierung und Auslesetechnik machen sie allerdings häufig ungeeignet für den Einsatz am POC (129).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein auf magnetischen Beads basierendes Fluoreszenzimmunoassay (MB-FIA) zur Detektion von YKL-40 in einem tragbaren Fluoreszenzreader entwickelt. Das Assayprotokoll besteht aus drei Schritten:

- 1) Die Bildung eines Immunkomplexes aus an magnetischen Beads gebundenen monoklonalen Capture-Antikörpern und über Streptavidin mit alkalischer-Phosphatase konjugierten polyklonalen Detektionsantikörpern.
- 2) Waschen.
- 3) Detektion des Umsatzes von DDAO-Phosphat durch die Phosphatase in dem tragbaren Fluoreszenzlesegerät.

Diese Prozeß-Schritte wurden so angepasst, dass YKL-40 in humanen Serumproben gemessen werden konnte. Bei der Messung extrem hoher Konzentrationen von YKL-40 in der Probe könnte die Sättigung der Assayreagenzien mit Analyt zu falsch niedrigen Werten führen. Dieser High-Dose-Hook-Effekt spielt allerdings selbst bei den in der klinischen Studie gefundenen Maximalwerten noch keine Rolle. Allerdings ist es nicht völlig ausgeschlossen, dass trotzdem durch extrem hohe Konzentrationen falsch niedrige Signale erhalten werden. Die Quantifizierungsgrenze erlaubt die Verdünnung der Serumproben auf beispielsweise 1/5. Die höchste in der vorangegangenen Studie gemessene YKL-40-Konzentration beträgt 1666 ng/mL. Mit dieser Verdünnung kann daher eine Vermeidung dieses Effekts erreicht werden.

Die Analyse der Serumproben zeigt, dass sich mit dem Immunoassay-System Proben gesunder Blutspender von Patientenproben unterscheiden lassen. Ein Vergleich mit dem in der klinischen Studie verwendeten kommerziellen ELISA ergibt systematische und zufällige Abweichungen der Systeme voneinander. Diese sind konzentrationsabhängig und spielen bei Konzentrationen um 57 ng/mL nur eine geringe Rolle. Daher kann der neu entwickelte Assay theoretisch zum Ausschluss von Pneumonien eingesetzt werden.

Die Assayzeit konnte dabei auf ca. 17 Minuten verkürzt werden, und die Detektion findet in einem transportablen, robusten Gerät statt, das potentiell mit Batterien betrieben werden kann.

Die Bedienung des Prototypen erfordert allerdings noch einige manuelle Schritte, und wäre damit für eine Benutzung durch nicht-ausgebildetes Personal nicht geeignet. Um eine Teil-Automatisierung zu erreichen, wurde der Assay auf die LabDisk-Plattform portiert.

5.4 Portierung

Um eine Übertragung des Assays auf die mikrofluidische Plattform (LabDisk) zu erreichen, musste zunächst der Transport der superparamagnetischen Beads durch GTM ermöglicht werden. Dafür müssen die Beads durch ein durch ein Magnetfeld definierter Stärke zuerst gesammelt werden, und das so entstandene Pellet aus der Flüssigkeit heraus in die Gasphase gezogen werden. Dabei spielen die Viskosität, die Reibung des Pellets an der Diskoberfläche und die Oberflächenspannung eine Rolle. Die Viskosität wirkt der Bildung des Pellets entgegen. Eine höhere Viskosität würde dabei die Bildung des Pellets aus Nanopartikeln verzögern (130). Außerdem übt sie eine Gegenkraft beim Transport des gebildeten Pellets aus. Durch die Verwendung von verdünntem Serum konnten diese Probleme weitgehend umgangen werden. Die auf das Pellet ausgeübte Kraft ist relativ klein und der Schwerkraft entgegengesetzt. Daher spielt die Reibung am Diskmaterial eine geringe Rolle. Die größte Hürde beim Transport der Beads ist damit die Überwindung der Oberflächenspannung.

In der ursprünglichen Publikation zur GTM (111) werden 690 μg stark magnetische Beads eingesetzt. Auf die hier verwendeten 2,5 μg Magnetbeads wird nicht genügend magnetische Kraft ausgeübt, um die Oberflächenspannung zu überwinden und so einen Transport zu ermöglichen. Auch die Herabsetzung der Oberflächenspannung durch den Zusatz von Detergens konnte den Transport nicht ermöglichen.

Daher wurden die Beads mit einer Stahlkugel mit 1 mm Durchmesser kombiniert, was die Masse und die damit ausgeübte Kraft um den Faktor 2000 erhöht, während sich die Oberfläche nur verdoppelt. Dadurch konnte ein Transport auch kleinerer Mengen von magnetischen Beads in diesem System erfolgreich realisiert werden.

Verwendung von Materialien mit einer höheren Magnetisierbarkeit (z.B. $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) könnte den Transport noch weiter verbessern. Da Sammel- und Transportmagnet im LabDisk-Player fest installiert sind, muss darauf geachtet werden, dass die Kugeln nicht entgegen der Zentrifugalkraft auch während der Rotation aus den Inkubationskammern gezogen werden. Daher sind diesem Ansatz Grenzen gesetzt. Außerdem sind Neodym-Legierungen korrosionsanfällig, was bei Lagerungsversuchen berücksichtigt werden müsste (131).

Ein anderer Ansatz zur weiteren Verbesserung des Transports wäre die direkte Modifikation der verwendeten 1-mm-Kugeln. Eisenhaltige Oberflächen lassen sich

beispielsweise silanisieren. Das Material der verwendeten Kugeln wird von Herstellerseite mit „Rostfreiem Edelstahl“ angegeben. Daher kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass mehr als 10,5 % Chrom in der Legierung enthalten ist (132). Die Oxidoberfläche von Stahl ist komplex. Beispielsweise ist es wahrscheinlich, dass nur oxidiertes Eisen an der Oberfläche vorliegt, wobei aber alle Legierungsbestandteile begrenzte Mobilität innerhalb des Kristallgitters haben (133). Andererseits sind die rostfreien Eigenschaften des Stahls hier durchaus erwünscht, da sonst die Lagerungsbeständigkeit deutlich leiden würde.

Um einen Austausch des Assays zwischen den Kooperationspartnern zu ermöglichen, wurde eine Methode entwickelt, kleine Mengen des Assaygemisches aliquotiert zu lyophilisieren. Lyophilisierungsstrategien wurden für zahlreiche Enzyme, Impfstoffe und Nanopartikel entwickelt (134). Die Wirksamkeit von Zusatzstoffen ist jedoch abhängig vom Protein, das stabilisiert werden soll. Daher müssen die jeweils am Besten geeigneten Zusatzstoffe für die jeweilige Anwendung experimentell bestimmt werden (135). Zucker und Aminosäuren können Proteine im lyophilisierten Zustand stabilisieren, indem sie die Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stellen, und so durch Interaktion mit den Proteinen einen Zustand herstellen, der einer wässrigen Lösung ähnelt (136). Dabei führte der Zusatz von Trehalose mit Phenylalanin oder Asparagin zu vergleichbarer chemischer Stabilisierung der enthaltenen Reagenzien. Die Kombination aus Trehalose mit Phenylalanin führte darüber hinaus zu einer deutlichen mechanischen Stabilisierung der Lyophilisatpellets. Die resultierende, styroporartige Konsistenz ist wahrscheinlich auf hydrophobe Wechselwirkungen des Phenylalanins mit dem enthaltenen Albumin zurückzuführen, da der alleinige Zusatz von Phenylalanin nicht zu derartigen Pellets führte. Diese Verbesserung erleichterte die weitere Verarbeitung deutlich, ohne die Löslichkeit des Pellets einzuschränken.

Eine Kombination aus 10 mg/mL Trehalose mit 10 mg/mL Phenylalanin mit dem im Assaygemisch enthaltenen 10 mg/mL HSA führten zu einer ausreichenden chemischen und mechanischen Stabilisierung. Nach einer Woche bei 40 °C wurden noch 80 % der ursprünglichen Aktivität erhalten. Es ist davon auszugehen, dass die Pellets bei Raumtemperatur deutlich länger stabil bleiben. Damit unterscheidet sich die hier lyophilisierte Kombination aus Antikörpern und Phosphatase in ihren Anforderungen an die Lyophilisierungszusätze deutlich von Proteinen wie Albumin und α -Chymotrypsin. Diese werden durch den Zusatz von Phenylalanin und Asparaginsäure eher destabilisiert (135).

Im Gegensatz zu vielen auf magnetischen Beads basierenden Assays erlaubt dieses automatisierte Analyse-System, eine Messung auch außerhalb einer Laborumgebung durchzuführen, da keine weiteren Geräte wie Pumpen oder Messgeräte benötigt

werden (111, 129, 120).

Das hier entwickelte POC-System könnte beispielsweise in Arztpraxen eingesetzt werden, um bei unklarer Symptomatik eine Pneumonie auszuschließen, und damit die etablierte Pneumoniediagnostik sinnvoll ergänzen. Die Zeit von der Probennahme zur Messung von unter 20 Minuten erlaubt dabei, diese Diagnostik während eines Arztbesuches durchzuführen. Die Kosten der Verbrauchsmaterialien lassen sich durch Massenfertigung der Disks auf unter 1 € / Disk drücken. Die Immunoassay-Reagenzien kosten in der jetzigen Form etwa 0,25 € pro Assay. Da ein Medizinprodukt sehr aufwändige Zulassungsvoraussetzungen und Qualitätsstandards erfüllen muss, wäre ein Preis von ca. 5 € pro Disk theoretisch möglich. Ein Röntgenthoraxbild wird nach der aktuellen GOÄ mit 26,23 € abgerechnet, und ist bei Verdacht auf Pneumonie angezeigt. Zur Zeit werden aus unterschiedlichen Gründen etwa 15 Millionen Röntgenthoraxuntersuchungen allein in Deutschland ausgeführt (137). Wenn durch den Einsatz der deutlich günstigeren POC-Messung nur 10 % dieser Untersuchungen eingespart werden könnten, würden etwa 16 Millionen € weniger Kosten entstehen. Außerdem sind die Anschaffungskosten für ein Röntgengerät um Größenordnungen höher als die Kosten für die hier verwendete Immunoassay-Plattform. Dadurch könnte das hier entwickelte Analyse-System helfen, Patienten eine bessere und schnellere Diagnostik zukommen zu lassen.

Literaturverzeichnis

- [1] D. M. Musher und A. R. Thorner, “Community-acquired pneumonia,” *New England Journal of Medicine*, Vol. 371, No. 17, S. 1619–1628, 2014.
- [2] G. Höffken, J. Lorenz, W. Kern, T. Welte, T. Bauer, K. Dalhoff, E. Dietrich, S. Ewig, P. Gastmeier, B. Grabein, *et al.*, “Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie–Update 2009,” *Pneumologie*, Vol. 63, No. 10, S. 1–68, 2009.
- [3] G. Herold, “Innere Medizin,” 2006.
- [4] M. Falguera, J. Carratala, A. Ruiz-Gonzales, C. Garcia-Vidal, I. Gazquez, J. Dorca, F. Gudiol, und J. M. Porcel, “Risk factors and outcome of community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacilli,” *Respirology*, Vol. 14, No. 1, S. 105–111, 2009.
- [5] N. Johansson, M. Kalin, A. Tiveljung-Lindell, C. G. Giske, und J. Hedlund, “Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods,” *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 50, No. 2, S. 202–209, 2010.
- [6] A. Assiri, J. A. Al-Tawfiq, A. A. Al-Rabeeah, F. A. Al-Rabiah, S. Al-Hajjar, A. Al-Barrak, H. Flemban, W. N. Al-Nassir, H. H. Balkhy, R. F. Al-Hakeem, *et al.*, “Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study,” *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 9, S. 752–761, 2013.
- [7] H.-N. Gao, H.-Z. Lu, B. Cao, B. Du, H. Shang, J.-H. Gan, S.-H. Lu, Y.-D. Yang, Q. Fang, und Y.-Z. Shen, “Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection,” *New England Journal of Medicine*, Vol. 368, No. 24, S. 2277–2285, 2013.
- [8] D. M. Musher, I. L. Roig, G. Cazares, C. E. Stager, N. Logan, und H. Safar, “Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study,” *Journal of Infection*, Vol. 67, No. 1, S. 11–18, 2013.
- [9] C. Cillóniz, S. Ewig, E. Polverino, M. A. Marcos, C. Esquinas, A. Gabarrús, J. Mensa, und A. Torres, “Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity,” *Thorax*, Vol. 66, No. 4, S. 340–346, 2011.
- [10] W. Lim, M. Van der Eerden, R. Laing, W. Boersma, N. Karalus, G. Town, S. Lewis, und J. Macfarlane, “Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study,” *Thorax*, Vol. 58, No. 5, S. 377–382, 2003.

- [11] M. J. Fine, T. E. Auble, D. M. Yealy, B. H. Hanusa, L. A. Weissfeld, D. E. Singer, C. M. Coley, T. J. Marrie, und W. N. Kapoor, “A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia,” *New England Journal of Medicine*, Vol. 336, No. 4, S. 243–250, 1997.
- [12] L. A. Mandell, R. G. Wunderink, A. Anzueto, J. G. Bartlett, G. D. Campbell, N. C. Dean, S. F. Dowell, T. M. File, D. M. Musher, M. S. Niederman, *et al.*, “Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults,” *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 44 (Supplement 2), S. S27–S72, 2007.
- [13] S. F. van Vugt, T. J. Verheij, P. A. de Jong, C. C. Butler, K. Hood, S. Coenen, H. Goossens, P. Little, und B. D. Broekhuizen, “Diagnosing pneumonia in patients with acute cough: clinical judgement compared to chest radiography,” *European Respiratory Journal*, Vol. 42, No. 4, S. 1076–1082, 2013.
- [14] E. Polverino, A. Torres, R. Menendez, C. Cillóniz, J. M. Valles, A. Capelastegui, M. A. Marcos, I. Alfageme, R. Zalacain, und J. Almirall, “Microbial aetiology of healthcare associated pneumonia in Spain: a prospective, multicentre, case–control study,” *Thorax*, Vol. 68, No. 11, S. 1007–1014, 2013.
- [15] M. A. Said, H. L. Johnson, B. A. Nonyane, M. Deloria-Knoll, L. Katherine, und A. A. P. B. S. Team, “Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques,” *PloS one*, Vol. 8, No. 4, S. 1–13, 2013.
- [16] M. D. Smith, C. L. Sheppard, A. Hogan, T. G. Harrison, D. A. Dance, P. Derrington, R. C. George, und S. W. P. S. Group, “Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection,” *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 47, No. 4, S. 1046–1049, 2009.
- [17] F. Gutiérrez, M. Mar, J. C. Rodríguez, A. Ayelo, B. Soldán, L. Cebrián, C. Mirete, G. Royo, und A. M. Hidalgo, “Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain,” *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 36, No. 3, S. 286–292, 2003.
- [18] S. M. Huijts, M. W. Pride, J. M. Vos, K. U. Jansen, C. Webber, W. Gruber, W. G. Boersma, D. Snijders, J. A. Kluytmans, I. van der Lee, *et al.*, “Diagnostic accuracy of a serotype-specific antigen test in community-acquired pneumonia,” *European Respiratory Journal*, Vol. 42, No. 5, S. 1283–1290, 2013.

- [19] T. Shimada, Y. Noguchi, J. L. Jackson, J. Miyashita, Y. Hayashino, T. Kamiya, S. Yamazaki, T. Matsumura, und S. Fukuhara, “Systematic review and metaanalysis: urinary antigen tests for Legionellosis,” *CHEST Journal*, Vol. 136, No. 6, S. 1576–1585, 2009.
- [20] M. A. Poritz, A. J. Blaschke, C. L. Byington, L. Meyers, K. Nilsson, D. E. Jones, S. A. Thatcher, T. Robbins, B. Lingenfelter, und E. Amriott, “FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection,” *PloS one*, Vol. 6, No. 10, S. 1–14, 2011.
- [21] C. Chartrand, M. M. Leeftang, J. Minion, T. Brewer, und M. Pai, “Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis,” *Annals of Internal Medicine*, Vol. 156, No. 7, S. 500–511, 2012.
- [22] A. Sangil, E. Calbo, A. Robles, S. Benet, M. Viladot, V. Pascual, E. Cuchí, J. Pérez, B. Barreiro, B. Sánchez, *et al.*, “Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratory viruses,” *European Journal of Clinical Microbiology & infectious diseases*, Vol. 31, No. 10, S. 2765–2772, 2012.
- [23] R. Medzhitov, “Inflammation 2010: new adventures of an old flame,” *Cell*, Vol. 140, No. 6, S. 771–776, 2010.
- [24] M. Rocha e Silva, “A brief survey of the history of inflammation,” *Inflammation Research*, Vol. 8, No. 1, S. 45–49, 1978.
- [25] C. Pierrakos, J.-L. Vincent, *et al.*, “Sepsis biomarkers: a review,” *Critical Care*, Vol. 14, No. 1:R15, S. 1–18, 2010.
- [26] J. Lackie, *A Dictionary of Biomedicine*. Oxford University Press, 2010.
- [27] J. Chan, C. Ng, und P. Hui, “A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies,” *Histopathology*, Vol. 12, No. 5, S. 461–480, 1988.
- [28] J. Petäjä, “Inflammation and coagulation. An overview,” *Thrombosis Research*, Vol. 127 (Supplement 2), S. S34–S37, 2011.
- [29] C.-W. Cheng, M.-H. Chien, S.-C. Su, und S.-F. Yang, “New markers in pneumonia,” *Clinica Chimica Acta*, Vol. 419, S. 19–25, 2013.
- [30] M. Christ-Crain und S. M. Opal, “Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia,” *Critical Care*, Vol. 14, No. 1, S. 203, 2010.
- [31] A. Torres, P. Ramirez, B. Montull, und R. Menéndez, “Biomarkers and community-acquired pneumonia: tailoring management with biological data,” in *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 33, S. 266–271, 2012.

- [32] S. Fernández-Serrano, J. Dorca, M. Coromines, J. Carratalà, F. Gudiol, und F. Manresa, “Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia,” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 10, No. 5, S. 813–820, 2003.
- [33] F. Moalli, S. Jaillon, A. Inforzato, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Mantovani, und C. Garlanda, “Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3,” *BioMed Research International*, Vol. 830421, S. 1–15, 2011.
- [34] A. Mantovani, C. Garlanda, A. Doni, und B. Bottazzi, “Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3,” *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 28, No. 1, S. 1–13, 2008.
- [35] P. Póvoa, “C-reactive protein: a valuable marker of sepsis,” *Intensive Care Medicine*, Vol. 28, No. 3, S. 235–243, 2002.
- [36] W. S. Tillett und T. Francis, “Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus,” *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 52, No. 4, S. 561–571, 1930.
- [37] B. Bottazzi, A. Doni, C. Garlanda, und A. Mantovani, “An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm,” *Annual Review of Immunology*, Vol. 28, S. 157–183, 2009.
- [38] M. S. Moreno, H. Nietmann, C. M. Matias, und S. M. Lobo, “C-reactive protein: a tool in the follow-up of nosocomial pneumonia,” *Journal of Infection*, Vol. 61, No. 3, S. 205–211, 2010.
- [39] L. M. Coelho, J. Salluh, M. Soares, F. A. Bozza, J. Verdeal, H. C. Castro-Faria-Neto, J. R. Lapa e Silva, P. T. Bozza, und P. Póvoa, “Patterns of c-reactive protein RATIO response in severe community-acquired pneumonia: a cohort study,” *Critical Care*, Vol. 16, No. 2, S. R53, 2012.
- [40] C. Joyce, R. Fiscus, X. Wang, D. Dries, R. Morris, und R. Prinz, “Calcitonin gene-related peptide levels are elevated in patients with sepsis,” *Surgery*, Vol. 108, No. 6, S. 1097–1101, 1990.
- [41] H. Summah und J.-M. Qu, “Biomarkers: a definite plus in pneumonia,” *Mediators of Inflammation*, Vol. 675753, S. 1–9, 2009.
- [42] K. Reinhart, W. Karzai, und M. Meisner, “Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection,” *Intensive Care Medicine*, Vol. 26, No. 9, S. 1193–1200, 2000.

- [43] M. Christ-Crain, D. Stolz, R. Bingisser, C. Muller, D. Miedinger, P. R. Huber, W. Zimmerli, S. Harbarth, M. Tamm, und B. Muller, "Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 174, No. 1, S. 84–93, 2006.
- [44] D. C. Wirtz, K.-D. Heller, O. Miltner, K.-W. Zilkens, und J. M. Wolff, "Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement," *International Orthopaedics*, Vol. 24, No. 4, S. 194–196, 2000.
- [45] S. L. Navarro, T. M. Brasky, Y. Schwarz, X. Song, C. Wang, A. R. Kristal, M. Kratz, E. White, und J. W. Lampe, "Reliability of serum biomarkers of inflammation from repeated measures in healthy individuals," *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, Vol. 21, No. 7, S. 1167–1170, 2012.
- [46] J. Hallbach, *Klinische Chemie und Hämatologie: Biomedizinische Analytik für MT-LA und Studium*. Georg Thieme Verlag, 2011.
- [47] J. S. Johansen, M. K. Williamson, J. S. Rice, und P. A. Price, "Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture," *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 7, No. 5, S. 501–512, 1992.
- [48] A. Millis, M. Hoyle, E. Reich, und D. Mann, "Isolation and characterization of a Mr= 38,000 protein from differentiating smooth muscle cells," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260, No. 6, S. 3754–3761, 1985.
- [49] J. Rejman und W. Hurley, "Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 150, No. 1, S. 329–334, 1988.
- [50] P. Nyirkos und E. E. Golds, "Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period," *Biochemical Journal*, Vol. 269, No. 1, S. 265–268, 1990.
- [51] B. Hakala, C. White, und A. Recklies, "Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 34, S. 25803–25810, 1993.
- [52] B. W. Morrison und P. Leder, "neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors," *Oncogene*, Vol. 9, No. 12, S. 3417–3426, 1994.
- [53] L. M. Shackelton, D. M. Mann, und A. J. Millis, "Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a

- member of a group of proteins associated with tissue remodeling,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 22, S. 13076–13083, 1995.
- [54] M. Rehli, S. Krause, und R. Andreesen, “Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation,” *Genomics*, Vol. 43, No. 2, S. 221–225, 1997.
- [55] S. Harvey, M. Weisman, J. O’Dell, T. Scott, M. K. J. Visor, und C. Swindlehurst, “Chondrex: new marker of joint disease,” *Clinical Chemistry*, Vol. 44, No. 3, S. 509–516, 1998.
- [56] A. K. Mohanty, G. Singh, M. Paramasivam, K. Saravanan, T. Jabeen, S. Sharma, S. Yadav, P. Kaur, P. Kumar, und A. Srinivasan, “Crystal structure of a novel regulatory 40-kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 16, S. 14451–14460, 2003.
- [57] F. Fusetti, T. Pijning, K. H. Kalk, E. Bos, und B. W. Dijkstra, “Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 39, S. 37753–37760, 2003.
- [58] D. R. Houston, A. D. Recklies, J. C. Krupa, und D. M. van Aalten, “Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 32, S. 30206–30212, 2003.
- [59] K. M. Malinda, L. Ponce, H. K. Kleinman, L. M. Shackelton, und A. J. Millis, “Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells,” *Experimental Cell Research*, Vol. 250, No. 1, S. 168–173, 1999.
- [60] S. W. Krause, M. Rehli, M. Kreutz, L. Schwarzfischer, J. D. Paulauskis, und R. Andreesen, “Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation,” *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 60, No. 4, S. 540–545, 1996.
- [61] G. H. Renkema, R. G. Boot, F. L. Au, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, A. O. Muijsers, M. Hrebicek, und J. M. Aerts, “Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages,” *European Journal of Biochemistry*, Vol. 251, No. 1-2, S. 504–509, 1998.
- [62] M. Rehli, H.-H. Niller, C. Ammon, S. Langmann, L. Schwarzfischer, R. Andreesen, und S. W. Krause, “Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 45, S. 44058–44067, 2003.

- [63] B. Volck, P. A. Price, J. S. Johansen, O. Sørensen, T. L. Benfield, H. J. Nielsen, J. Calafat, und N. Borregaard, “YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils,” *Proceedings of the Association of American Physicians*, Vol. 110, No. 4, S. 351–360, 1997.
- [64] M. Boussac und J. Garin, “Calcium-dependent secretion in human neutrophils: A proteomic approach,” *Electrophoresis*, Vol. 21, No. 3, S. 665–672, 2000.
- [65] A. J. Millis, M. Hoyle, und L. Kent, “In vitro expression of a 38,000 dalton heparin-binding glycoprotein by morphologically differentiated smooth muscle cells,” *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 127, No. 3, S. 366–372, 1986.
- [66] J. Connor, R. Dodds, J. Emery, R. Kirkpatrick, M. Rosenberg, und M. Gowen, “Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization,” *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 8, No. 2, S. 87–95, 2000.
- [67] C. Chung, T. Tallerico, und P. Seeman, “Schizophrenia hippocampus has elevated expression of chondrex glycoprotein gene,” *Synapse*, Vol. 50, No. 1, S. 29–34, 2003.
- [68] J. Johansen, S. Møller, P. Price, F. Bendtsen, J. Junge, C. Garbarsch, und J. Henriksen, “Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis?,” *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Vol. 32, No. 6, S. 582–590, 1997.
- [69] J. S. Johansen, P. Christoffersen, S. Møller, P. A. Price, J. H. Henriksen, C. Garbarsch, und F. Bendtsen, “Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis,” *Journal of hepatology*, Vol. 32, No. 6, S. 911–920, 2000.
- [70] R. B. Kirkpatrick, J. G. Emery, J. R. Connor, R. Dodds, P. G. Lysko, und M. Rosenberg, “Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages,” *Experimental Cell Research*, Vol. 237, No. 1, S. 46–54, 1997.
- [71] M. N. Kim, K. E. Lee, J. Y. Hong, W. I. Heo, K. W. Kim, K. E. Kim, und M. H. Sohn, “Involvement of the MAPK and PI3K pathways in chitinase 3-like 1-regulated hyperoxia-induced airway epithelial cell death,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 421, No. 4, S. 790–796, 2012.
- [72] J.-A. Park, J. M. Drazen, und D. J. Tschumperlin, “The chitinase-like protein YKL-40 is secreted by airway epithelial cells at base line and in response to compressive mechanical stress,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, No. 39, S. 29817–29825, 2010.

- [73] G.-F. Yang, P.-Y. Cai, X.-M. Li, H.-X. Deng, W.-P. He, und D. Xie, “Expression and clinical significance of YKL-40 protein in epithelial ovarian cancer tissues,” *Chinese Journal of Cancer*, Vol. 28, No. 2, S. 142–145, 2009.
- [74] W. S. Shim, S. Jiang, P. Wong, J. Tan, Y. L. Chua, Y. S. Tan, Y. K. Sin, C. H. Lim, T. Chua, M. Teh, *et al.*, “Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 324, No. 2, S. 481–488, 2004.
- [75] D. G. Stokes, G. Liu, I. B. Coimbra, S. Piera-Velazquez, R. M. Crowl, und S. A. Jiménez, “Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis,” *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 46, No. 2, S. 404–419, 2002.
- [76] H. Imabayashi, T. Mori, S. Gojo, T. Kiyono, T. Sugiyama, R. Irie, T. Isogai, J.-i. Hata, Y. Toyama, und A. Umezawa, “Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis,” *Experimental Cell Research*, Vol. 288, No. 1, S. 35–50, 2003.
- [77] J. S. Johansen, K. S. Krabbe, K. Møller, und B. K. Pedersen, “Circulating YKL-40 levels during human endotoxaemia,” *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 140, No. 2, S. 343–348, 2005.
- [78] A. D. Recklies, C. White, und L. Hua, “The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase-and protein kinase B-mediated signalling pathways,” *Biochemical Journal*, Vol. 365, No. 1, S. 119–126, 2002.
- [79] M. Faibish, R. Francescone, B. Bentley, W. Yan, und R. Shao, “A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers,” *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 10, No. 5, S. 742–751, 2011.
- [80] D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K. P. Tsafou, *et al.*, “STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life,” *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, S. D447–D452, 2015.
- [81] C. Ober, Z. Tan, Y. Sun, J. D. Possick, L. Pan, R. Nicolae, S. Radford, R. R. Parry, A. Heinzmann, K. A. Deichmann, *et al.*, “Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function,” *New England Journal of Medicine*, Vol. 358, No. 16, S. 1682–1691, 2008.

- [82] H.-L. Wang, P.-C. Hsiao, H.-T. Tsai, C.-B. Yeh, und S.-F. Yang, “Usefulness of plasma YKL-40 in management of community-acquired pneumonia severity in patients,” *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 14, No. 11, S. 22817–22825, 2013.
- [83] H. Cinarka, A. Gumus, M. Karatas, S. Kayhan, A. Kirbas, S. Ozyurt, A. Kurt, und U. Sahin, “The Clinical Utility of Serum YKL-40 Levels in Community Acquired Pneumonia,” *Advances in Biosciences & Clinical Medicine*, Vol. 3, No. 1, S. 10, 2015.
- [84] N. M. Korthagen, C. H. van Moorsel, P. Zanen, H. J. Ruven, und J. C. Grutters, “Evaluation of circulating YKL-40 levels in idiopathic interstitial pneumonias,” *Lung*, Vol. 192, No. 6, S. 975–980, 2014.
- [85] S. Létuvé, A. Kozhich, N. Arouche, M. Grandsaigne, J. Reed, M.-C. Dombret, P. A. Kiener, M. Aubier, A. J. Coyle, und M. Pretolani, “YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages,” *The Journal of Immunology*, Vol. 181, No. 7, S. 5167–5173, 2008.
- [86] C. Nordenbaek, J. S. Johansen, P. Junker, N. Borregaard, O. Sørensen, und P. A. Price, “YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization,” *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 180, No. 5, S. 1722–1726, 1999.
- [87] P. Ward, E. Paz, und O. Conneely, “Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview,” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, Vol. 62, No. 22, S. 2540–2548, 2005.
- [88] J. Yang, D. Goetz, J.-Y. Li, W. Wang, K. Mori, D. Setlik, T. Du, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. Strong, *et al.*, “An iron delivery pathway mediated by a lipocalin,” *Molecular Cell*, Vol. 10, No. 5, S. 1045–1056, 2002.
- [89] H.-R. Kim, C.-D. Jun, K.-S. Lee, J.-H. Cho, E.-T. Jeong, S.-H. Yang, Y.-J. Lee, und D.-S. Park, “Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease,” *Cytokine*, Vol. 58, No. 3, S. 336–343, 2012.
- [90] E. Høgdall, J. Johansen, S. Kjaer, P. Price, J. Blaakjaer, und C. Høgdall, “Stability of YKL-40 concentration in blood samples,” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, Vol. 60, No. 4, S. 247–252, 2000.
- [91] S. E. Bojesen, J. S. Johansen, und B. G. Nordestgaard, “Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population,” *Clinica Chimica Acta*, Vol. 412, No. 9, S. 709–712, 2011.
- [92] J. S. Johansen, T. Lottenburger, H. J. Nielsen, J. E. B. Jensen, M. N. Svendsen, G. Kollerup, und I. J. Christensen, “Diurnal, weekly, and long-time variation in

- serum concentrations of YKL-40 in healthy subjects,” *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 17, No. 10, S. 2603–2608, 2008.
- [93] J. Johansen, K. Krabbe, K. Møller, und B. Pedersen, “Circulating YKL-40 levels during human endotoxaemia,” *Clinical & Experimental Immunology*, Vol. 140, No. 2, S. 343–348, 2005.
- [94] R. S. Yalow und S. A. Berson, “Immunoassay of endogeneous plasma insulin in man,” *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 39, No. 7, S. 1157, 1960.
- [95] E. Engvall und P. Perlmann, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G,” *Immunochemistry*, Vol. 8, No. 9, S. 871–874, 1971.
- [96] N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, und F. Weis-Garcia, “Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources,” *ILAR Journal*, Vol. 46, No. 3, S. 258–268, 2005.
- [97] H. Keller, *Klinisch-Chemische Labordiagnostik für die Praxis; Analyse, Befund, Validation*. G. Thieme, 1991.
- [98] C. A. Spencer, M. Takeuchi, M. Kazarosyan, F. MacKenzie, G. J. Beckett, und E. Wilkinson, “Interlaboratory/intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assays of thyrotropin (TSH) and impact on reliability of measurement of subnormal concentrations of TSH,” *Clinical Chemistry*, Vol. 41, No. 3, S. 367–374, 1995.
- [99] DIN 32645:2008-11, “Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung,” *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*, 2008.
- [100] DIN ISO 11843-1:2004-09, “Erkennungsfähigkeit - Teil 1: Begriffe (Einschließlich Technisches Korrigendum 1:2003),” *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*, 2004.
- [101] P. G. Gottschalk und J. R. Dunn, “The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic,” *Analytical Biochemistry*, Vol. 343, No. 1, S. 54–65, 2005.
- [102] J. W. Findlay und R. F. Dillard, “Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays,” *The AAPS Journal*, Vol. 9, No. 2, S. E260–E267, 2007.
- [103] D. Ratkowsky, *Handbook of nonlinear regression models*. Statistics, textbooks and monographs, M. Dekker, 1990.
- [104] M. Ehni, “Validierung und Assayimplementierung im Rahmen der Entwicklung eines neuen optischen Biosensorsystems für die medizinische Diagnostik,” 2012.

- [105] D. Horák, M. Babič, H. Macková, und M. J. Beneš, “Preparation and properties of magnetic nano-and microsized particles for biological and environmental separations,” *Journal of Separation Science*, Vol. 30, No. 11, S. 1751–1772, 2007.
- [106] B.-I. Haukanes und C. Kvam, “Application of magnetic beads in bioassays,” *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, Vol. 11, No. 1, S. 60–63, 1993.
- [107] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, und P. Couvreur, “Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications,” *Chemical Reviews*, Vol. 112, No. 11, S. 5818–5878, 2012.
- [108] G. Adam, P. Lauger, und G. Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer-Verlag, 2009.
- [109] T. Kreisig, R. Hoffmann, und T. Zuchner, “Homogeneous fluorescence-based immunoassay detects antigens within 90 seconds,” *Analytical Chemistry*, Vol. 83, No. 11, S. 4281–4287, 2011.
- [110] A. A. El Wahed, A. El-Deeb, M. El-Tholoth, H. A. El Kader, A. Ahmed, S. Hassan, B. Hoffmann, B. Haas, M. A. Shalaby, F. T. Hufert, *et al.*, “A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus,” *PloS one*, Vol. 8, No. 8, S. e71642, 2013.
- [111] O. Strohmeier, A. Emperle, G. Roth, D. Mark, R. Zengerle, und F. von Stetten, “Centrifugal gas-phase transition magnetophoresis (GTM)—a generic method for automation of magnetic bead based assays on the centrifugal microfluidic platform and application to DNA purification,” *Lab on a Chip*, Vol. 13, No. 1, S. 146–155, 2013.
- [112] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, No. 1-2, S. 248–254, 1976.
- [113] C. E. Metz, “Basic principles of ROC analysis,” in *Seminars in Nuclear Medicine*, Vol. 8, S. 283–298, 1978.
- [114] W. J. Youden, “Index for rating diagnostic tests,” *Cancer*, Vol. 3, No. 1, S. 32–35, 1950.
- [115] J. M. Bland und D. Altman, “Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement,” *The Lancet*, Vol. 327, No. 8476, S. 307–310, 1986.
- [116] H. Passing und W. 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,” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 21, No. 11, S. 709–720, 1983.

- [117] L. Bulst, “YKL-40 - ein neuer Biomarker im Serum für bronchopulmonale Erkrankungen: Analytische Charakterisierung und klinische Evaluierung,” 2016.
- [118] E. Fantino, C. L. Gangell, D. Hartl, P. D. Sly, *et al.*, “Airway, but not serum or urinary, levels of YKL-40 reflect inflammation in early cystic fibrosis lung disease,” *BMC Pulmonary Medicine*, Vol. 14, No. 1, S. 28, 2014.
- [119] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, und A. Bairoch, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer, 2005.
- [120] O. Strohmeier, M. Keller, F. Schwemmer, S. Zehnle, D. Mark, F. von Stetten, R. Zengerle, und N. Paust, “Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications,” *Chemical Society Reviews*, Vol. 44, No. 17, S. 6187–6229, 2015.
- [121] A. James, K. Stenberg-Hammar, L. Reinius, J. Konradsen, C. Pedroletti, E. Melén, C. Söderhäll, J. Kere, S.-E. Dahlén, und G. Hedlin, “Serum YKL-40 is elevated in children with pneumonia and RSV infection,” *European Respiratory Journal*, Vol. 44, No. Suppl 58, S. 395, 2014.
- [122] S. Spoorenberg, S. M. Vestjens, G. T. Rijkers, B. Meek, C. H. Moorsel, J. C. Grutters, und W. J. W. Bos, “YKL-40, CCL18 and SP-D predict mortality in patients hospitalized with community-acquired pneumonia,” *Respirology*, Vol. 22, No. 3, S. 542–550, 2017.
- [123] D. Kreisel, R. G. Nava, W. Li, B. H. Zinselmeyer, B. Wang, J. Lai, R. Pless, A. E. Gelman, A. S. Krupnick, und M. J. Miller, “In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 107, No. 42, S. 18073–18078, 2010.
- [124] V. C. Ardi, T. A. Kupriyanova, E. I. Deryugina, und J. P. Quigley, “Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 104, No. 51, S. 20262–20267, 2007.
- [125] H. Bazin, E. Trinquet, und G. Mathis, “Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions,” *Reviews in Molecular Biotechnology*, Vol. 82, No. 3, S. 233–250, 2002.
- [126] O. S. Wolfbeis und M. Leiner, “Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization,” *Analytica Chimica Acta*, Vol. 167, S. 203–215, 1985.

- [127] M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek, und V. Adam, “Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application,” *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 74, S. 562–574, 2015.
- [128] R. S. Sista, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, M. G. Pollack, S. Palanki, und V. K. Pamula, “Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform,” *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 12, S. 2188–2196, 2008.
- [129] H. C. Tekin und M. A. Gijs, “Ultrasensitive protein detection: a case for microfluidic magnetic bead-based assays,” *Lab on a Chip*, Vol. 13, No. 24, S. 4711–4739, 2013.
- [130] R. Hong, M. J. Cima, R. Weissleder, und L. Josephson, “Magnetic microparticle aggregation for viscosity determination by MR,” *Magnetic resonance in medicine*, Vol. 59, No. 3, S. 515–520, 2008.
- [131] M. Drak und L. Dobrzański, “Corrosion of Nd-Fe-B permanent magnets,” *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, Vol. 20, No. 1-2, S. 239–242, 2007.
- [132] DIN EN 10088-2:2014-12, “Nichtrostende Stähle - Teil 1: Verzeichnis der nichtrostenden Stähle,” *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*, 2014.
- [133] G. Allen, J. Dyke, S. Harris, und A. Morris, “A surface study of the oxidation of type 304L stainless steel at 600 K in air,” *Oxidation of Metals*, Vol. 29, No. 5-6, S. 391–408, 1988.
- [134] W. Wang, “Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals,” *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 203, No. 1, S. 1–60, 2000.
- [135] K. M. Forney-Stevens, R. H. Bogner, und M. J. Pikal, “Addition of Amino Acids to Further Stabilize Lyophilized Sucrose-Based Protein Formulations: I. Screening of 15 Amino Acids in Two Model Proteins,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 105, No. 2, S. 697–704, 2016.
- [136] S. D. Allison, B. Chang, T. W. Randolph, und J. F. Carpenter, “Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 365, No. 2, S. 289–298, 1999.
- [137] BFS, “Strahlenexposition durch Medizinische Maßnahmen,” 12/2013.

Tabellenverzeichnis

1.1	Bewertungssystem für die Zuweisung in PSI-Risikoklassen	20
2.1	Verwendete Reagenzien	44
2.2	Verwendete Puffer	45
2.3	Verwendete Antikörper und ELISA-Kits	45
2.4	Verwendete Software	45
2.5	Verwendete Geräte	49
4.1	Charakteristika der Studienteilnehmer	59
4.2	Vierfeldertafel Inflammation vs. Gesund	61
4.3	Vierfeldertafel Pneumonien vs. Gesund	62
4.4	Vierfeldertafel Pneumonien vs. anderweitige inflammatorische Erkrankungen	62
4.5	Eigenschaften der Reagenzien zur Kopplung	65
4.6	Parameter der 4PL-Funktion des FRET-Assays	69
4.7	Nachweis der Serumdepletion	76
4.8	Assayparameter	76
4.9	Parameter der 4PL-Funktion	76
4.10	Verdünnungslinearität absolut	77
4.11	Verdünnungslinearität relativ	77
4.12	Spike Recovery absolut	78
4.13	Spike Recovery relativ	78
4.14	Frequenzprotokoll zur Automatisierung des MB-FIA auf einer Labdisk.	85
4.15	Messung von Serumproben mit dem automatisierten System.	89

Abbildungsverzeichnis

1.1	Radiogramm einer Pneumonie	21
1.2	Struktur von YKL-40 mit Chitinresten	28
1.3	STRING Interaktionsnetzwerk	30
1.4	Verlauf der YKL-40 und CRP-Plasmakonzentrationen nach Gabe von Endotoxin	31
1.5	Immunoassay-Formate	34
1.6	Bedeutung der Parameter des 4PL-Modells	39
1.7	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm eines Moleküls	41
1.8	Schema eines FRET-Immunoassays	43
2.1	Fluoreszenzdetektor	47
2.2	TubeScanner	47
2.3	Diskreader	50
3.1	Kopplung	52
4.1	ROC-Plot zur Eignung von YKL-40 bei Pneumonien	60
4.2	Vergleich der YKL-40- und CRP Konzentrationen zwischen den Untersuchungsgruppen	60
4.3	Labeling und Reinigung	64
4.4	Ergebnisse der Kopplungsreaktion	66
4.5	Aufbau des FRET-Assays	68
4.6	FRET-Assayperformance	68
4.7	Assayablauf	71
4.8	DDAO-Spektren	72
4.9	Konzentration der Phosphatase	73
4.10	Waschschritte und Antikörperkonzentration	74
4.11	Detektionstemperatur und Inkubationszeit	75
4.12	Kalibrationskurve	78
4.13	Serumproben gemessen mit dem Tubeassay	79
4.14	Methodenvergleich mit Passing-Bablok-Regression	80
4.15	Methodenvergleich mit Bland-Altman-Plot	80
4.16	Aufbau der LabDisk	83
4.17	Ablösung der Beads nach Transport	83
4.18	Lyophilisierung	87
4.19	Lyophilisierungszusätze	88
4.20	Demonstrationsmessungen im Diskreader-System	89

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Luppä möchte ich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe zu schreiben, seine Unterstützung und die Freiheiten, die mir bei der Themenfindung und Gestaltung der Arbeit zugestanden wurden. Herrn Prof. Nießner danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit und die immer hilfreichen und konstruktiven Diskussionen im Zuge der Seminarvorträge. Herrn Dr. Alexander Le Blanc danke ich für die sehr wertvollen Gespräche und Einschätzungen, die mir einen guten Weg durch das Projekt und meine weitere Arbeit gezeigt haben.

Frau Schreiegg möchte ich danken für ihre ebenso bodenständige wie leidenschaftliche Art, für die Durchführung der ELISAs mit absolut perfekter Präzision und Effizienz und hervorragenden Apfelkuchen (auch, wenn sie das anders sieht).

Herrn Dr. med. Ludwig Bulst gehört mein Dank für die disziplinübergreifenden Diskussionen, die die klinische Studie in dieser Form möglich gemacht haben, seinen unermüdlichen Einsatz während der Vorbereitung des Ethikantrages und Durchführung der Studie und natürlich die äußerst hilfreichen Informationen über die Funktionsweise der weniger bekannten Bereiche des Internets.

Dr. Andreas Bietenbeck hat völlig selbstlos die für die Studie notwendige Aufklärung der Patienten übernommen; ohne seine Hilfe hätte die Arbeit so nicht geschrieben werden können, und die gemeinsamen Grill- und Spielabende tragen sehr stark zum interdisziplinären Austausch bei (Optimierung des Grillanzündens...).

Christopher Beaudoin hat mit seiner positiven Lebenseinstellung, seiner unermüdlichen Motivation und nicht zuletzt mit einer stetigen Versorgung mit Neuigkeiten und Knabereien aus Übersee in mehr als einer Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Leider konnten wir ihn nicht von einer dauerhaften Übersiedlung ins schöne Deutschland überzeugen, aber die momentanen politischen Verhältnisse lassen zumindest hoffen.

Ich danke Stefanie Mak und Ruoyu Sun für ihr auch in turbulenten Zeiten ruhiges und zuversichtliches Wesen, die Erhaltung der Fitness im Labor, spannende Diskussionen über das Ost-West- und andere Verhältnisse, ihren untrüglichen kulinarischen Kompass, Cocktailverkostungen, Kalorienbomben, die hervorragende Zusammenarbeit und natürlich Filmabende (Sound of music)...

Allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Biosensorik danke ich für die immer faire und gute Zusammenarbeit, spannende Gespräche und nicht zuletzt für eine immer gefüllte Verpflegungsschublade. Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie für eine immer kollegiale und freundliche Atmosphäre danken, auch wenn die Kaffemaschine vielleicht einmal nicht funktioniert hat.

Herrn Dr. Gregor Czilwik und Dr. Oliver Stohmeier vom Institut für Mikroanalyzesysteme der Hahn-Schickard-Gesellschaft möchte ich für die sehr kollegiale und produktive Kooperation im Zuge des [RES]Check-Projektes danken.

Dem BMBF danke ich für die Förderung des [RES]Check-Projektes, ohne das diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Ich danke meiner Mutter für ihre positive Lebenseinstellung, immerwährende Unterstützung auch in schwierigen Zeiten und hervorragende Schüfele.

If you can keep your head when all about you
 Are losing theirs and blaming it on you,
 If you can trust yourself when all men doubt you,
 But make allowance for their doubting too;
 If you can wait and not be tired by waiting,
 Or being lied about, don't deal in lies,
 Or being hated, don't give way to hating,
 And yet don't look too good, nor talk too wise;

If you can dream - and not make dreams your master;
 If you can think - and not make thoughts your aim;
 If you can meet with triumph and disaster
 And treat those two impostors just the same;
 If you can bear to hear the truth you've spoken
 Twisted by knaves to make a trap for fools,
 Or watch the things you gave your life to, broken,
 And stoop and build them up with worn-out tools;

 If you can make a heap of all your winnings
 And risk it all in one game of pitch-and-toss,
 And loose, and start again at your beginnings
 And never breathe a word about your loss;
 If you can force your heart and nerve and sinew
 To serve your turn long after they are gone,
 And so hold on when there is nothing in you
 Except the will which says to them: "Hold on!"

If you can talk with crowds and keep your virtue,
 Or walk with kings - nor lose the common touch,
 If neither foes or loving friends can hurt you,
 If all men count with you, but none too much;
 If you can fill the unforgiving minute
 With sixty seconds' worth of distance run,
 Yours is the earth and everything that's in it,
 And - which is more - you'll be a Man, my son.

Rudyard Kipling

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt und indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich weiß, dass die Arbeit in digitalisierter Form daraufhin überprüft werden kann, ob unerlaubte Hilfsmittel verwendet wurden und ob es sich – insgesamt oder in Teilen – um ein Plagiat handelt. Zum Vergleich meiner Arbeit mit existierenden Quellen darf sie in eine Datenbank eingestellt werden und nach der Überprüfung zum Vergleich mit künftig eingehenden Arbeiten dort verbleiben. Weitere Vervielfältigungs- und Verwertungsrechte werden dadurch nicht eingeräumt. Die Arbeit wurde weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift