

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -

Die Entwicklung eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Heckhoff, Uta
aus Duisburg

2008

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Prof. Volker Arolt

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Gert Gabriels

Tag der mündlichen Prüfung:

18.11.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Gert Gabriels

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays

Heckhoff, Uta

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Entwicklung eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays, der die quantitative Detektion eines individuellen patientenentsprechenden Zytokinmusters durch die Vermessung einer Serumprobe gewährleistet. Dieses Zytokinmuster ermöglicht Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand des Patienten und beispielsweise auf Abstoßungsreaktionen transplantierte Organe. Um einen derartigen Microarray-Immunoassay zu etablieren werden zunächst monoklonale Antikörper auf eine Oberfläche gespottet und mit festgelegten Antigenkonzentrationen inkubiert. Die Bindung der Antigene wird durch spezifische Detektionsantikörper sichtbar gemacht und in einem Scanner ausgelesen. Die Ergebnisse werden in einer Kalibrationskurve festgehalten, die daraufhin zur Bestimmung des Interleukingehaltes in unbekanntem Serumproben herangezogen werden kann.

Die Entwicklung eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays wird durch viele Parameter beeinflusst, die optimiert werden müssen. Der Spotprozess sowie die Lagerung der gespotteten Slides, die Inkubation unter Verwendung des geeigneten Puffersystems, das Scannen und die Auswertung müssen aufeinander abgestimmt werden. Überdies sollten geeignete Interleukine so ausgewählt werden, dass sie nicht untereinander bei ihrer Anbindung interagieren. Hierzu werden unabhängige Methoden herangezogen wie der enzymgebundene Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay) und die Oberflächenplasmonresonanz (SPR von engl. Surface Plasmon Resonance).

Nach Validierung und Optimierung einzelner Parameter ist die Etablierung eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays für zehn Interleukine im Picogramm-Sensitivitätsbereich gelungen. Der Einsatz eines derartigen Immunoassays erleichtert das klinische Arbeiten durch multiplexe Detektion einer Vielzahl von Analyten. Ein Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassay verringert als zukunftsweisende Technologie den zeitlichen Aufwand bei der Diagnostik spezifischer Erkrankungen und beschleunigt somit den Beginn der Therapie.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Multianalyt-Protein-Microarray-Assay	9
1.2	Anwendungsgebiete der Microarray-Technologie.....	10
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	11
2	Grundlagen	13
2.1	Zytokine	13
2.1.1	Interleukine, Interferone und Chemokine.....	14
2.2	Bisherige Entwicklung vom Assay zum Microarray-System.....	15
2.2.1	Vor- und Nachteile gegenüber herkömmlichen Verfahren.....	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Reagenzien.....	19
3.2	Oberfläche.....	20
3.3	Antikörper und Antigene	22
3.3.1	Rekonstituierung der Antikörper und Antigene.....	24
3.4	Arbeitsmaterialien	24
3.5	Geräte.....	25
3.5.1	Spotter Affymetrix 417 Arrayer	25
3.5.2	GMS 418 Array Scanner	28
3.5.3	Sandwich-Assay.....	30
3.5.4	Enzyme linked immunosorbent assay [ELISA].....	32
3.5.5	Oberflächenplasmonresonanz.....	34
3.5.5.1	Aufbau des SPR-Sensorchips.....	36
3.5.5.2	SPR-Messung	37
3.6	Computerprogramme.....	42
3.7	Methodik der Inkubation des Multianalyt-Protein-Microarray-Assays ..	43

4	Ergebnisse	46
4.1	Die Entwicklung eines Zytokinchips	46
4.1.1	Herstellung der Titerplatte für das Spotten	47
4.1.1.1	Lagerstabilität der Titerplatte	49
4.1.1.2	Die Slides nach dem Spotten	51
4.1.2	Inkubation des Antigens	54
4.1.3	Inkubation der polyklonalen Antikörper	55
4.1.3.1	Die Wiederverwendung inkubierter polyklonaler Anti-körper	56
4.1.4	Das Scannen	57
4.1.5	Die Auswertung	59
4.1.6	Die Anwendung beim Vermessen von Serumproben	61
4.1.7	45er Panel	62
4.2	SPR-Messungen	65
4.2.1	Bindungsverhalten des Chemokins CCL-18/PARC	67
4.2.2	Vergleich des Bindungsverhaltens zweier monoklonaler Anti-CCL18/PARC-Antikörper	68
4.2.3	Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers nach erfolgter Dialyse und Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers	70
4.2.4	SPR-Messung von IL-20	73
4.3	Verschiedene Puffersysteme	76
4.3.1	Einflussnahme anderer Puffer auf die Scanergebnisse bei Negativkontrollen	80
5	Diskussion	82
5.1	Der Sandwich-Microarray-Immunoassay	83
5.2	Probleme bei der Entwicklung des Microarray-Immunoassays	86
5.2.1	Slideoberfläche	88
5.2.2	Kreuzreaktivität	89
5.2.3	Heterogenität der einzelnen Antigen-Antikörper-Paare	90

5.2.4	Verunreinigung der monoklonalen Antikörper.....	91
5.2.5	Lagerung der gespotteten Slides.....	91
5.2.6	Detektion der Proteinbindung.....	92
5.2.7	Wiederverwendung bereits inkubierter polyklonaler Anti-körper	93
5.3	Verwendung des Microarray-Immunoassays.....	94
6	Verwendete Abkürzungen.....	97
7	Literaturverzeichnis.....	98
8	Lebenslauf.....	112
9	Danksagung.....	113

1 Einleitung

1.1 Multianalyt-Protein-Microarray-Assay

Ein Microarray-Immunoassay hat die Aufgabe, viele Analyte in einer unbekanntem Probe, wie zum Beispiel im Serum von Patienten, zeitgleich zu bestimmen. Durch den quantitativen Nachweis der enthaltenen Proteine werden Informationen über den Gesundheitszustand eines Patienten gewonnen.

Der Begriff „Multianalyt-Protein-Microarray-Assay“ bedarf zunächst einer Definition. „Multianalyt“ steht für die gleichzeitige Prozessierung vieler Analyte, im vorliegenden Fall vieler Proteine. „Microarray-Assay“ bedeutet, dass in einem Miniaturformat untersucht wird. Die Analyte werden dabei in einem dicht gepackten, geordneten Muster immobilisiert [55].

Um einen Microarray-Immunoassay als Standardnachweismethode zur Untersuchung von Patientenproben verwenden zu können, muss zunächst eine Kalibrierung vorgenommen werden. Hierzu wird innerhalb eines Versuches durch die Inkubation mit Antigenen von zuvor festgelegten Antigenkonzentrationen eine spezifische Konzentrationskurve aufgenommen. Nach Bindung der Antigene an ihre Fangantikörper werden entsprechende Detektionsantikörper hinzugegeben. Die dabei zustande kommenden Bindungen können mit Hilfe eines Scanvorganges sichtbar und auswertbar gemacht werden. Durch die Bindung der gelabelten Antikörper wird eine Fluoreszenz sichtbar, die mit der Konzentration der Antigene korreliert. Je mehr Bindungsereignisse stattgefunden haben, desto intensiver wird die Fluoreszenz. Durch die Fluoreszenzzunahme bei der Inkubation von Antigenen steigender

Konzentrationen soll eine konzentrationsabhängige Kurve entstehen. Diese ermöglicht es, die in einer unbekanntem Probe enthaltene Proteinmenge bestimmen zu können.

1.2 Anwendungsgebiete der Microarray-Technologie

Microarray-Systeme gehören zu den Weiterentwicklungen der bereits in den 50er Jahren [18] begonnenen Technologie der Festphasenassays, worauf in Kapitel 2.2 genauer eingegangen wird. Durch derartige Assays wurden zunächst die Bindungsreaktionen von Antikörper-Antigen-Komplexen untersucht. Dies führte dazu, dass zum Beispiel Hormone in Sensitivitätsbereichen gemessen werden konnten, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht vorstellbar waren. Den Einzug in die Medizin hielten in den 60er bis 80er Jahren die „Radioimmunoassays“ [18]. In dieser Zeit wurden sie in der Pharmakologie und Hämatologie als vorherrschende mikroanalytische Methode gefeiert [18]. Nachdem die Entwicklung weiter voranschritt, gelingt es der Wissenschaft heute durch die Microarray-Technologie weitere Bereiche der medizinischen Analytik abdecken zu können. Wie damals werden auch heute noch Interaktionsstudien und Funktionsstudien bezüglich der Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Rezeptor-Liganden-Interaktionen durchgeführt [55]. Außerdem ist es über DNA-Microarray-Systeme möglich, alle Gene eines Zelltyps oder eines Gewebes, die exprimiert werden, unter Vorgabe bekannter DNA-Sequenzen darzustellen. Hierdurch wird erforscht, wie viele Gene von einem Genom ausgehend exprimiert werden [55].

Aus medizinischer Sicht viel bedeutsamer sind allerdings die Errungenschaften bezüglich der Diagnostik genetischer Erkrankungen und komplexer Krankheiten. So ist es durch Microarray-Technologien möglich, Bestimmungen des Immunstatus vorzunehmen. Assay-Formate, bei denen Fang-Antikörper auf dem Microarray-Substrat immobilisiert sind, können dazu dienen, infektiöse

Krankheiten, wie HIV oder Hepatitis, nachzuweisen [9;26;74;92]. Außerdem können mittels Microarrays Versuche bezüglich der Wirkmechanismen und toxikologischen Nebenwirkungen von Medikamenten für die präklinische Pharmaforschung durchgeführt werden. Der Nachweis proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, TNF-alpha, IL-6 oder IL-12 beispielsweise, ist in Ansätzen möglich, wodurch sich Tumore oder Leukämie diagnostizieren lassen[55]. Außerdem könnten Microarray-Systeme in der Zukunft helfen, Transplantatabstoßungsreaktionen frühzeitig erkennen zu können.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Etablierung eines neuen für die klinische Anwendung einsetzbaren Multianalyt-Protein-Microarray-Assays erfolgen. Die klinische Anwendung bezieht sich auf die Detektion eines individuellen patientenentsprechenden Zytokinmusters. Hierzu müssen alle Schritte und Materialien optimal aufeinander abgestimmt sein.

Auf geeigneten Substratoberflächen werden spezifische monoklonale Antikörper aufgebracht. Dieser Vorgang wird als „Spotten“ bezeichnet. Das Spotten kann durch die Veränderung einiger Parameter optimiert werden. Zu diesen zählen zum Beispiel Luftfeuchtigkeit, das Verwenden verschiedener Antikörperkonzentrationen und unterschiedlicher Puffer. Die Parameter werden kontrolliert und solange verbessert, bis ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht ist.

Die darauffolgenden Prozesse der Inkubation mit Antigenen verschiedener Konzentration und der Inkubation mit fluoreszenzgelabelten polyklonalen Antikörpern werden ebenfalls zeitlich optimiert und durch die Verwendung veränderter Konzentrationen verbessert. Außerdem werden zum Vergleich bereits erprobte Methoden herangezogen, wie die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR von engl. Surface Plasmon Resonance) oder der

enzymgebundene Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay). Diese sind hilfreich, um die Messergebnisse zu validieren. Überdies ermöglichen sie zum Beispiel eine optimale Pufferauswahl und die Etablierung geeigneter Inkubationsparameter.

In dieser Arbeit sollen Programmparameter für das Scannen der inkubierten Slides angepasst und neu kalibriert werden. Es sollen überdies Auswertungsmakros angefertigt werden, die die gescannten Fluoreszenzen in anschauliche Zahlenwerte umwandeln. Diese Umwandlung ermöglicht überhaupt erst das Zeichnen von Diagrammen, damit auswertbare Kurven für eine Routinedetektion dargestellt werden können.

Anhand dieser Konzentrationsreihen soll bei späteren Versuchen mit Serumproben die Bestimmung der darin enthaltenen Antigene erfolgen. Das Zytokinmuster könnte zum Beispiel Voraussagen über drohende Transplantatabstoßungen liefern.

2 Grundlagen

2.1 Zytokine

Zytokine dienen dem zellulären „Crosstalk“. Sie kontrollieren das Wachstum und die Differenzierung von Leukozyten. Sie sind für die einleitende Immunantwort verantwortlich und fördern beziehungsweise hemmen diese [25]. Verschiedene Zytokinsysteme stehen in engem Kontakt miteinander und bilden ein Netzwerk, in dem sie miteinander interagieren können.

Zu den Zytokinen werden Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine gezählt [55]. Es handelt sich bei allen Zytokinen um Polypeptide mit Molekulargewichten von ca. 15-25kDa, die ihre Funktion in pico- bis nanomolaren Konzentrationen ausführen. Zytokine werden basal exprimiert und können in der Reaktion auf Infektionen oder Verletzungen beziehungsweise in Stresssituationen vermehrt freigesetzt werden.

Allen gemein ist die Auslösung von Signaltransduktionskaskaden durch die Bindung an spezifische Rezeptoren an der Membranoberfläche der Zielzellen. Zu diesen zählen zum Beispiel eine veränderte Genexpression und Stoffwechselaktivität sowie Zelldifferenzierungen, Proliferation, Migration und Apoptose [55]. Es finden also Entzündungsantworten, Infekt-abwehrreaktionen und beispielsweise die Abwehr von Tumoren statt. In der Klinik sind die Symptome vieler Erkrankungen individuell unterschiedlich aufgrund einer vermehrten oder verminderten Produktion der Zytokine selber. Die Expression von Zytokinen ist für Erkrankungen spezifisch. Ein Multianalyt-Zytokin-

Microarray-Immunoassay kann viele Zytokine zur gleichen Zeit messen und damit schnell und leicht Rückschlüsse auf Erkrankungen zulassen.

2.1.1 Interleukine, Interferone und Chemokine

Es gibt eine Vielzahl von Zytokinen. Zu ihnen gehört zum Beispiel das proinflammatorische Interleukin-1 [48], welches Fieber induziert. IL-1 wird gehäuft bei entzündlichen Exsudaten wie bei denjenigen der Pleura oder des Zahnfleisches exprimiert. Außerdem wird es bei Verbrennungen oder ausgeprägten Fieberschüben vermehrt gefunden. Im normalen Urin ist IL-1beta in aggregierter Form (75kDa) und in Bruchstücken aufzufinden [25].

Zytokine können auch antiinflammatorische Wirkung haben, wie dies zum Beispiel bei IL-4 und IL-10 der Fall ist. IL-4 ist verstärkt bei Allergien aufzufinden, da es die B-Lymphozyten zur IgE-Produktion anregt. Es wirkt immunmodulatorisch wie die Interleukine IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, indem es das Wachstum von T-Lymphozyten fördert. Die Interleukine IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9 sind wesentlich für die Immunabwehrregulation verantwortlich. Sie beeinflussen Entzündungsreaktionen, Hämatopoese und Apoptose. IL-2 wird von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und vermittelt die Immunabwehr der T-Lymphozyten. Die Abstoßungsreaktion von Transplantaten kann durch Antikörper gegen IL-2-Rezeptoren therapeutisch beeinflusst werden [25]. IL-6 fördert die Differenzierung und das Wachstum von B- und T-Zellen, es ist an der Hämatopoese beteiligt und zählt zu den Akute-Phase-Proteinen des Körpers [4;55]. IL-8 gehört zu den wichtigsten chemotaktischen Chemokinen, die die Neutrophilen aktivieren. Es wird durch die Stimulation von IL-1 beta von den Endothelzellen gebildet. Ein Interferon, das in diesem Zytokinassay verwendet wird, ist IL-10. Interferone dienen der Proliferationshemmung, der Virusabwehr und wie die Interleukine führen sie zur Apoptose. Die Chemokine sind für die

Migration und Chemotaxis zuständig. Zu ihnen gehören unter anderem die in unserem Fall verwendeten Interleukin 8 und CCL-18/PARC.

2.2 Bisherige Entwicklung vom Assay zum Microarray-System

Immunologische Nachweisverfahren für Zytokine wurden bereits in den 50er Jahren entwickelt. Zu den als erste Generation bezeichneten Nachweisverfahren zählen die kompetitiven Assays [18]. Bei diesen kompetitiven Assays konkurriert eine unbekannte Menge nicht markierter Zytokine mit einer konstanten Menge markierter Zytokine um eine limitierte Zahl von Bindungsstellen einer konstanten Menge eines spezifischen Antikörpers [55]. Die Markierung der Zytokine erfolgt durch kovalente Kopplung an Enzyme oder durch ein radioaktives Atom. Ein Meilenstein ist beispielsweise die Entwicklung des Radioimmunassays (RIA von engl. Radioimmunoassay) für Insulin von Yalow und Berson 1959 gewesen [18]. Ein Radioimmunoassay beruht auf der kompetitiven Bindung eines Antigens an einen Antikörper [68]. Hierbei konkurriert eine unbekannte Menge Antigen mit radioaktiv gelabeltem Antigen bekannter Konzentration um die Bindung an einen Antikörper ebenfalls bekannter Konzentration. Der Betrag an gebundenem gelabeltem Antigen ist nun umgekehrt proportional zur Konzentration des ungelabelten Antigens, dessen Konzentration auf diese Weise bestimmt wird. Die praktischen und theoretischen Nachteile des kompetitiven Assays sind nach Davies, dass nicht das vollkommene Potential einer immunanalytischen Technik ausgeschöpft wird, weil die Sensitivität durch die Äquilibriumskonstante des Antikörpers beherrscht wird [7]. Bei anderen Methoden als beim Radioimmunassay kann allerdings durch das Labeln die Wiedererkennung des Antikörpers herabgesetzt oder vollkommen verhindert sein.

In den späten 60er Jahren wurden die als zweite Generation bezeichneten Immunometrischen Assays als immunologisches Nachweisverfahren entwickelt

[18]. Diese sind empfindlicher als die der ersten Generation angehörenden Nachweisverfahren. Die Immunometrischen Assays zählen zu den Festphasenmethoden, bei denen hauptsächlich mit markierten Antikörpern gearbeitet wird. Als gängige immunometrische Nachweisverfahren gelten der immunometrische Assay (IRMA) und der enzymgebundene Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay), bei denen die Antikörper jeweils an eine Festphase binden.

Im Jahre 1968 wurden die einseitigen immunometrischen Assays von Miles und Hales in Cambridge ins Leben gerufen [64]. Diese stellen die entscheidende Entwicklung der monoklonalen Antikörper dar. Die monoklonalen Antikörper können jeweils an ein Epitop binden, wodurch die Entwicklung definierter Assays möglich wurde. Die Sensitivität dieser definierten Assays ist in viel kürzerer Zeit höher als bei den anderen Nachweisverfahren. Die monoklonalen Antikörper finden aber zunächst wegen erhöhter Kosten, Zweifel an der Sensitivität und Schwierigkeiten in der Produktion sauber gelabelter Antikörper wenig Zuspruch. Diese Technologie soll erst in den späten 80er Jahren zum Einsatz kommen [18].

Im Jahre 1970 wird von Addison und Hales der Sandwichassay (Abb.1) entwickelt [7]. Dieser Assay macht sich zunutze, dass viele Proteine multiple Epitope besitzen. Mehrere Epitope ermöglichen gleichzeitig die Bindung eines Fangantikörpers sowie die Bindung eines Detektorantikörpers an ein Protein. Nach der Inkubation des Fangantikörpers und einem darauffolgenden Waschschrift, bei dem die nicht reagierenden Komponenten entfernt werden, wird mit dem Detektionsantikörper inkubiert, der an das zweite Epitop des Proteins binden kann. Danach findet die Messung statt.

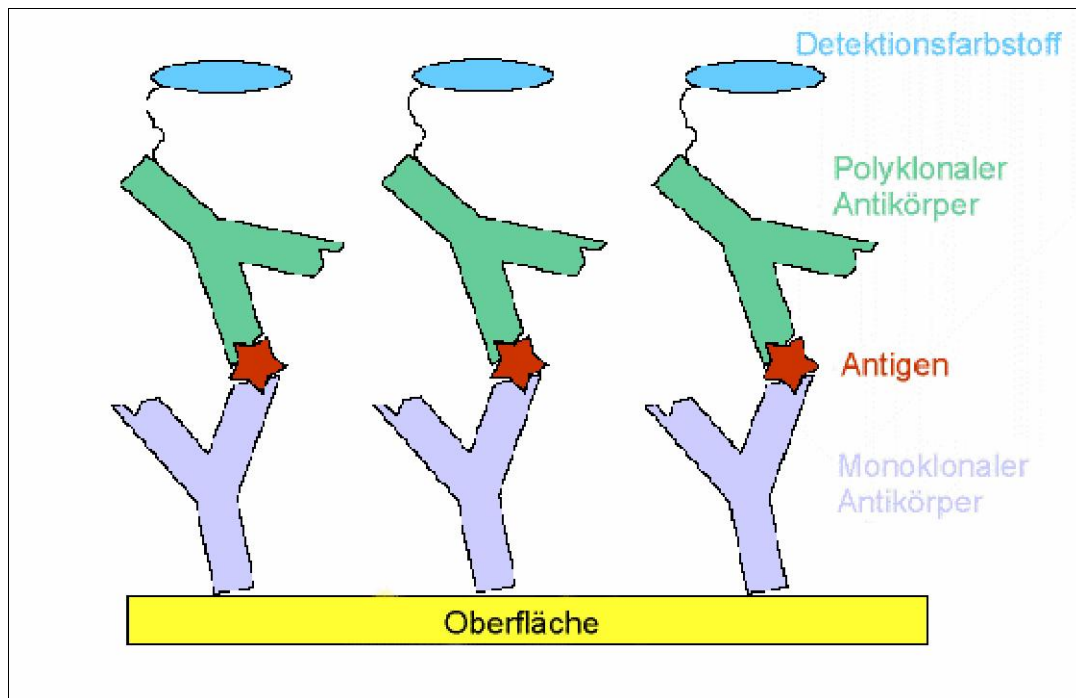


Abbildung 1 Sandwich Assay

Zur dritten Generation der immunologischen Nachweisverfahren gehört der seit den 80er Jahren entwickelte microarraybasierende Multianalyt Assay, durch dessen Weiterentwicklung die Etablierung der ultrasensitiven Antikörper- und Oligonukleotid-Microarray-Technologie im Jahre 1991/1992 möglich wird, was die Basis der Microarray-Technologie darstellt [1;16-18;76]. Es ist heute möglich mit Oligonukleotidarrays DNA-Analysen durchzuführen, die beispielsweise wichtig sind für die Gewebetypisierung bei Transplantationen, für den genetischen Fingerabdruck in der Forensik und für die Identifizierung von Infektionen in humanem Gewebe und Serum [18]. Größere Probleme bestehen allerdings nach wie vor bei der gleichzeitigen Detektion von Proteinen, da diese physikochemisch vielseitiger sind als DNA, leicht denaturieren und zu unspezifischen Anbindungen neigen.

2.2.1 Vor- und Nachteile gegenüber herkömmlichen Verfahren

Gegenwärtig wird die Bestimmung von Zytokinen auf der Basis ihrer Reaktionen mit spezifischen Antikörpern durch Radioimmunoassays oder ELISAs durchgeführt [44]. Die Mikroarray-Technologie ist dabei, sich neu zu etablieren. In der Abteilung für Anästhesiologie und Mikrobiologie von Buffalo/New York und in der Pathologie der Universität von Michigan wurden direkte Vergleiche der Mikroarray-Technologie mit dem ELISA-Verfahren durchgeführt. Die Grenze der Detektion liegt laut Knight und Sreekumar für den Microarray Immunoassay im Vergleich verschiedener Antigene bei 4-12 pg/ml. Das ELISA-Verfahren kommt auf schlechtere Detektionsgrenzen. Bei Versuchen wurde eine Standardkurve für 16 Zytokine sowohl im ELISA als auch im Microarray-Immunoassay angefertigt, die bei ihrem Vergleich die gleichen Fluoreszenzsignale liefern [44]. Demnach ist die in der Entwicklung stehende Mikroarray-Technologie in der Lage, genau die gleichen Ergebnisse wie das bereits seit langem bestehende ELISA-System zu generieren.

Da durch einen Microarray-Immunoassay viele Zytokine innerhalb einer Probe gleichzeitig gemessen werden können, erhält man bei geringerem Aufwand, kleinerem Probenvolumen und geringeren Kosten mehr Informationen. Bei Knight und Sreekumar werden für das ELISA-Verfahren beispielsweise 800µl Probenvolumen benötigt, wohingegen der Microarray Immunoassay nur 40µl gebraucht hat.

Dennoch gilt es zu berücksichtigen, dass derzeit noch wesentliche Entwicklungsprobleme bestehen und sich die Microarray-Immunoassay-Technologie noch in ihrer Anfangsphase befindet [46]. Im Microarray-Immunoassay ist hauptsächlich aufgrund schwer unterdrückbarer Kreuzreaktivitäten bisher erst die Analyse von Proben geringer Komplexität erfolgreich gewesen [79].

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Reagenz	Anbieter
Oyster 650 P, NHS-aktiviert Oyster 550 P, NHS-aktiviert	Denovo Biolabels GmbH
N,-N-Dimethylformamid	Fluka
Thiomersal	Sigma
PBS, pH 7,4	Klinik, Apotheke
BSA, Fraktion V	Sigma
Tris (zur Herstellung von TBS)	Sigma
Tween	Fluka
Trehalose	Sigma
Ethanolamin	Fluka
Essigsäure	Aldrich
Schutzlösung	Xantec Bioanalytics GmbH
Low Cross	Candor GmbH
Diluent	RnD Systems

Tabelle 1 Reagenzien

3.2 Oberfläche

Die Oberfläche des Microarray-Immunoassays besteht aus einer Hydrogelschicht, genauer einer Polycarboxylat-Hydrogel-Beschichtung, welche auf die polierte Oberfläche eines Objektträgers aufgebracht wird. Die genauere Beschreibung des beschichteten Objektträgers ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Glastyp	Borosilikatglas mit niedriger Eigenfluoreszenz
Maße	76,0 x 25,0 mm ± 0,2 mm
Dicke	1,00 mm ± 10 µm
Planheit	< 2 µm
Oberflächenbehandlung	optisch poliert
Beschichtung	< 5 µm Hydrogel auf einer Seite
spottbarer Bereich	60 x 21 mm

Tabelle 2 Technische Daten des HCX Slides

Die Protein-Biochip-Oberfläche ist bioinert und weist eine höhere Immobilisierungskapazität als DNA-Chip-Oberflächen und andere planare Oberflächen auf. Verglichen mit diesen Standard-Oberflächen-beschichtungen ist die Immobilisierungskapazität der Hydrogelmatrix 10-15 mal höher. Das Hydrogel unterdrückt einen gewissen Anteil unspezifischer Wechselwirkungen, die auftreten können. Die Aktivierung der Oberfläche erfolgt durch N-Hydroxysuccinimid. Auf ihr können unterschiedliche Fangantikörper ohne Separationswände in einem dicht gepackten geordneten Muster [55] und in extrem hohen Dichten immobilisiert werden.

Diese Oberflächen werden von der Firma Xantec Bioanalytics GmbH gestellt. Ihre Struktur ist der Abbildung 1 zu entnehmen, wobei an hydrophile Polymere (grün) Antikörper (blau) immobilisiert sind, die die Analytmoleküle (beige Vierecke) binden.

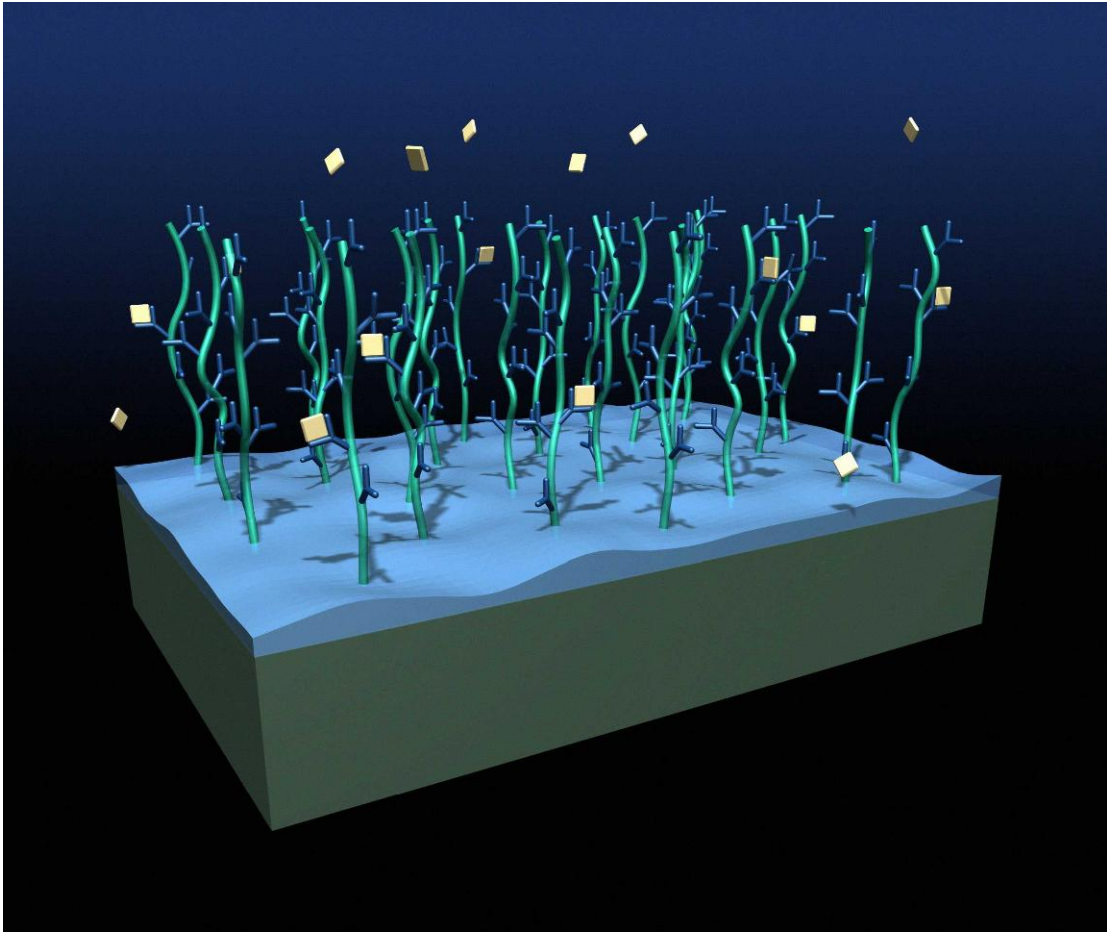


Abbildung 2 Oberflächenstruktur des hydrogelbeschichteten
Microarraysubstrates

3.3 Antikörper und Antigene

Alle Antikörper und Antigene werden von RnDSystems, Minneapolis USA, bezogen.

	Antikörper monoklonal	Antikörper polyklonal	Antigene
Anti-human IL-1 beta Ab	MAB601	AF201	361-MI-025/CF
Anti-human IL-2 Ab	MAB602	AF202	360-MP-025/CF
Anti-human IL-3 Ab	MAB603	AF203	336-MD-025/CF
Anti-human IL-4 Ab	MAB604	AF204	343-E2-025/CF
Anti-human IL-6 Ab	MAB206	AF206	334-TK-025/CF
Anti-human IL-7 Ab	MAB207	AF207	653-E3-025/CF
Anti-human IL-10 Ab	MAB217	AF217	376-CT-025/CF
Anti-human IL-17 Ab	MAB317	AF317	717-VC-025/CF
Anti-human IL-18 Ab	MAB646	AF646	271-BME- 010/CF
Anti-human IL-20 Ab	MAB1102	AF1102	266-IP-050/CF
Anti-human I-309/CCL1 Ab	MAB272	AF272	272-I-010/CF
Anti-human MCP-1/CCL2 Ab	MAB679	AF279	279-MC-010/CF
Anti-human MIP-1 alpha/CCL3	MAB670	AF270	270-LD-010/CF
Anti-human RANTES/CCL5 Ab	MAB678	AF278	278-RN-010/CF
Anti-human MCP-3/CCL7 Ab	MAB282	AF282	282-P3-010/CF
Anti-human MCP-2/CCL8 Ab	MAB281	AF281	281-CP-010/CF
Anti-human Eotaxin/CCL11 Ab	MAB320	AF320	320-EO-020/CF
Anti-human MCP-4/CCL13 Ab	MAB327	AF327	327-P4-025/CF
Anti-human MIP-1 delta/Leukotactin-1/CCL15 Ab	MAB363	AF363	628-LK-025/CF
Anti-human HCC-4/CCL16 Ab	MAB328	AF802	802-HC-025/CF
Anti-human TARC/CCL17 Ab	MAB364	AF364	364-DN-025/CF

Anti-human PARC/CCL18 Ab	MAB394	AF394	394-PA-010/CF
Anti-human MIP-3 betaAb	MAB361	AF361	361-MI-025/CF
Anti-human MIP-3 alpha/CCL 20	MAB360	AF360	360-MP-025/CF
Anti-human MDC/CCL 22 Ab	MAB336	AF336	336-MD-025/CF
Anti-human Eotaxin-2/CCL24 Ab	MAB343	AF343	343-E2-025/CF
Anti-human TECK/CCL 25 Ab	MAB3341	AF334	334-TK-025/CF
Anti-human Eotaxin-3/CCL 26 Ab	MAB653	AF653	653-E3-025/CF
Anti-human CTACK/CCL27 Ab	MAB3761	AF376	376-CT-025/CF
Anti-human CCL28 Ab	MAB7171	AF717	717-VC-025/CF
Anti-human MIP-1beta/CCL4 Ab	MAB271	AF271	271-BME-010/CF
Anti-human IP-10//CXCL10 Ab	MAB266	AF266	266-IP-050/CF
Anti-human CTGF/CCN2 C-terminal peptide Ab	MAB660	AF660	nicht vorhanden
Anti-human Fractalkine/CX3CL1	MAB3652	AF365	365-FR-025/CF
Anti-human Gro alpha/CXCL1 Ab	MAB275	AF275	275-GR-010/CF
Anti-human PF-4/CXCL4 Ab	MAB795	AF795	795-P4-025/CF
Anti-human GCP-2/CXCL6 Ab	MAB333	AF333	333-GC-025/CF
Anti-human NAP-2/CXCL7 Ab	MAB393	AF393	393-NP-010/CF
Anti-human IL-8/CXCL8 Ab	MAB208	AF208	208-IL-010/CF
Anti-human MIG/CXCL9 Ab	MAB392	AF392	392-MG-010/CF
Anti-human I-TAC/CXCL-11 Ab	MAB672	AF260	672-IT-025/CF
Anti-human/mouse SDF- 1/CXCL12 Ab	MAB350	AF310	350-NS-010/CF
Anti-human EGF Ab	MAB636	AF236	236-EG-200
Anti-human ENA-78/CXCL5 Ab	MAB654	AF254	254-X-010/CF
Anti-human FGF acidic Ab	MAB232	AF232	232-FA-025/CF

Tabelle 3 Antikörper und Antigene

3.3.1 Rekonstituierung der Antikörper und Antigene

Die Antikörper und Antigene werden aus lyophilisiertem Zustand rekonstituiert. Für die Rekonstitution wird PBS mit Thiomersal gegen mikrobielles Wachstum benötigt. Dieser Puffer enthält darüber hinaus Trehalose, welches der Stabilisierung der Antikörper dient. Es wird eine Konzentration von 1mg/mL hergestellt mit 10% Trehalose und 0,005% Thiomersal. Die Lagerung der darauffolgend aliquotierten Antikörper und Antigene erfolgt bei -20°C.

3.4 Arbeitsmaterialien

Eppendorf -Pipetten:

0,5-10 µl	Serien-Nr.: 01342
10-100µl	Serien-Nr.: 403886
50-200 µl	Serien-Nr.: 077395
100-1000 µl	Serien-Nr.: 1005982
500-2500 µl	Serien-Nr.: 422646
Multipette	Serien-Nr.: n. a.

Tabelle 4 Pipetten

HCX-SPR-Disk Charge HCX L 11/05A	Xantec bioanalytics
HCX-Slide Charge HCX L 09/05A	
Trockene Pressluft	
Polyspritzflasche	
Dialysemembran 3.500 MWCO	SpectrumLabs

Tabelle 5 Materialien

3.5 Geräte

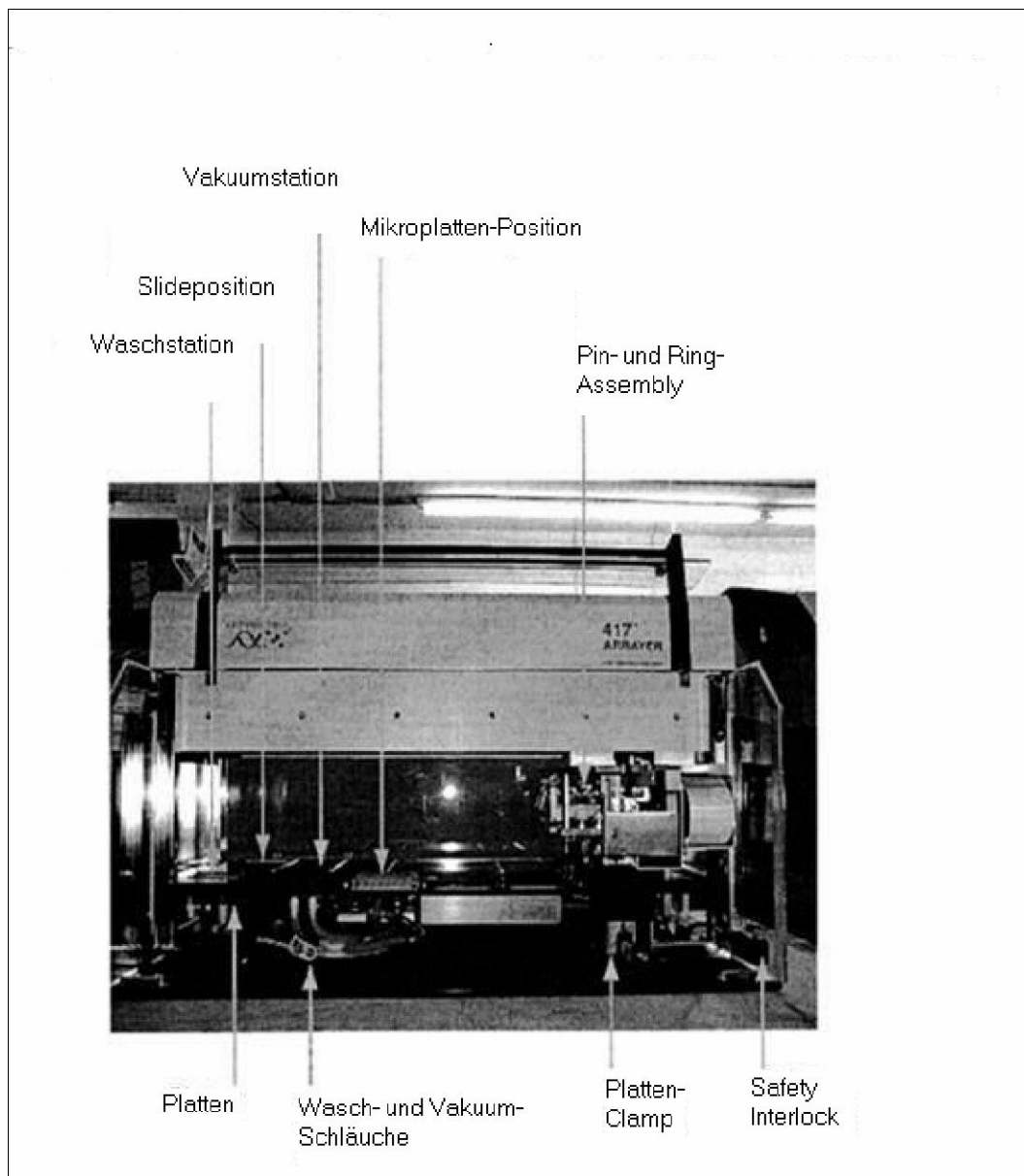
Gerät	Modell	Hersteller
Microarray-Reader	GMS 417	Affymetrix
Analysenwaage	AT261	Mettler-Toledo
Vortexer	Vortex Genie2	Scientific Industries
Taumelrollenmischer	Assistent 348	RMS
Wasserstrahlpumpe		
Inkubationskammern	Eigenbau	

Tabelle 6 Geräte

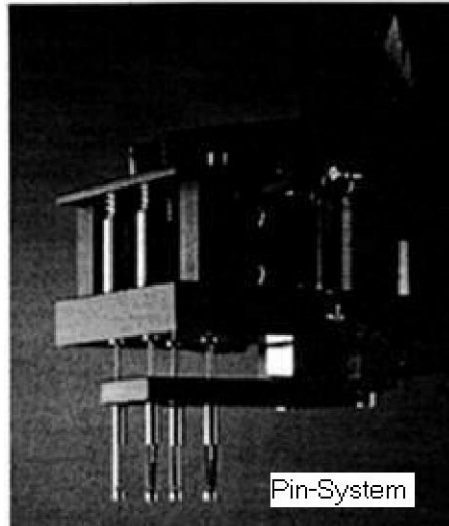
3.5.1 Spotter Affymetrix 417 Arrayer

Der Affymetrix 417 Arrayer-Spotter ermöglicht es, mit Hilfe der Ring-Pin-Methode Microspots auf Glasslides zu spotten. Oberflächenspannung und Oberflächenenergie wirken dabei gemeinsam, um ein Aliquot in dem jeweiligen

Ring zu halten und die Probe aus der Titerplatte entnehmen zu können. Um daraufhin einen Anteil der im Ring enthaltenen Probe auf den Glasslide zu bringen, fahren die Pins mit einer Größe von 125 µm die Proben ab und bringen Tropfen von 7-8 nl auf die Slideoberfläche.

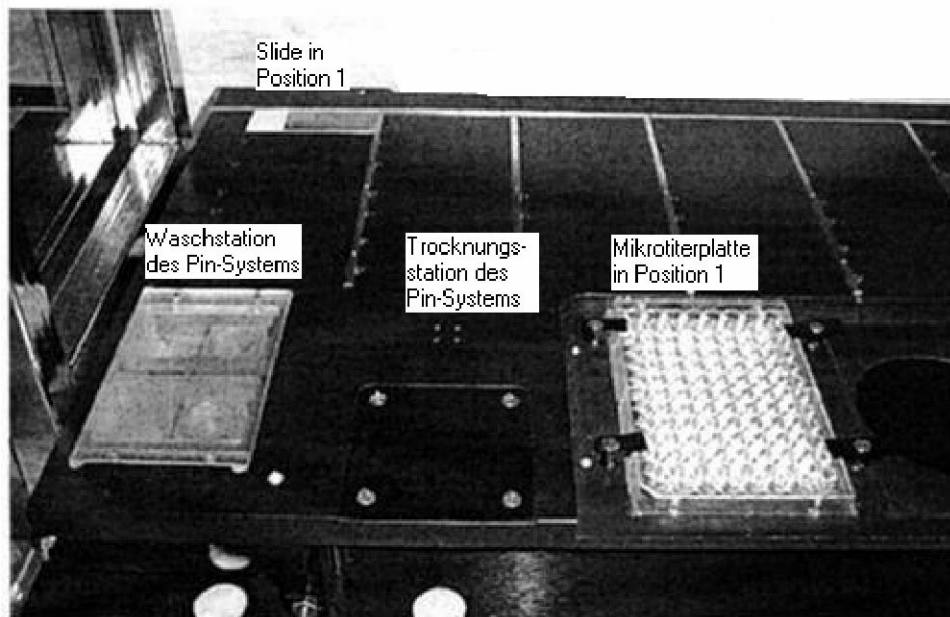


Darstellung 1 Spotter



Darstellung 2 Pins zum Bessputten der Glasslide-Oberflächen

Der Spottvorgang läuft wie folgt ab: Nach dem Waschen der Pumpen und des Ring-Pin-Systems werden Ring- und Pin-Position kalibriert, damit sichergestellt ist, dass bei der Probenentnahme das Ringsystem ausreichend von der Probe umgeben ist und dass das Pinsystem einen genügenden Kontakt mit der Slideoberfläche hat. Die Titerplatte, aus der die Proben entnommen werden, ist je nach Einstellung des Spottmusters, das innerhalb des Software-Programms zuvor eingerichtet wurde, zu befüllen. Dementsprechend ist die Anzahl der Slides, die gespottet werden sollen, mit der Software vor Beginn des Spottens einzustellen.



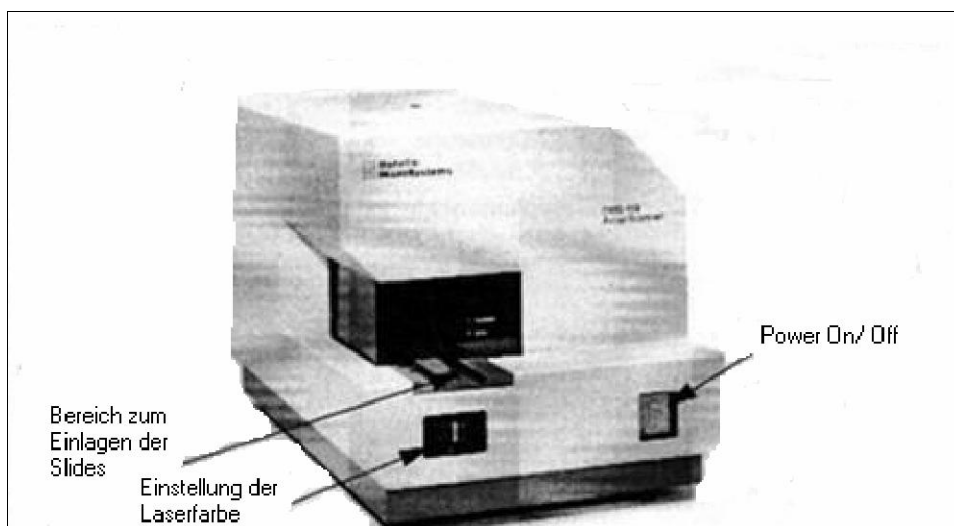
Darstellung 3 Spotterarbeitsplatz

Die Software des Affymetrix 417 Arrayer gibt dem Spotter Anweisungen, wie viele Slides und Mikrotiterplatten positioniert werden, wie viele Proben von jeder Mikrotiterplatte gespottet werden sollen und wie viele Replicate-Spots auf jeden Slide gebracht werden müssen.

3.5.2 GMS 418 Array Scanner

Der GMS 418 Array Scanner besteht aus einem beweglich gelagerten Laser, mit dem jeder Punkt des Slides abgescannt werden kann, und aus einem epifluoreszenten Mikroskop. Das Detektionsprinzip des Scanners basiert auf laserinduzierter Fluoreszenz. Das bedeutet, dass sich ein Fluorophor durch die Bestrahlung mit Laserlicht seiner Anregungswellenlänge in einen elektronisch angeregten Zustand versetzen lässt. Der Grundzustand wird unter Emission von Licht wiederhergestellt, wobei dieses Licht eine größere Wellenlänge als das

absorbierte Licht hat. Weil der Detektor nur für Licht der Emissionswellenlänge sensitiv ist, wird gewährleistet, dass sich selbst geringste Fluoreszenz messen lässt. Die Energiedifferenz, die hierbei auftritt, wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Der Scanner ist in der Lage, die durch den Laser verursachte Fluoreszenz des mit Farbstoff gelabelten Materials in grau-skalierte binäre oder in künstlich-colorierte Daten umzuwandeln. Der Laser kann kleinste Fluoreszenzen auf Slides erkennen. Er kann in zwei Wellenlängen betrieben werden, die beide am Gerät selber und in der Software je nach verwendetem Farbstoff vor dem Scannen eingestellt werden. Das Mikroskop fokussiert die Fluoreszenz der Probe, welche durch den Detektor in eine proportionale analoge Spannung umgewandelt wird. Der Scanner misst die Koordinaten des Slides von einem Ausgangspunkt, der sich immer 23,5 mm vom linken Rand des Slides entfernt befindet. Dies geschieht mit Hilfe der durch eine Kamera gesteuerten Positionierungseinrichtung, die den Slide in seine entsprechende Scanposition bringt. Nach dem Einlegen wird der Slide langsam unter dem Laser hindurchgezogen, der den Slide kontinuierlich in der Breite scannt.



Darstellung 4 GMS 418 Array Scanner

Mit der Array Scanner Software wird der Scanner eingestellt, kontrolliert und kalibriert, also dem jeweiligen Slide angepasst. Danach wird der Scanvorgang durch computergesteuerte Anweisung begonnen. Durch die Software des GMS 418 Array Scanners lassen sich der Laser und das Mikroskop dem jeweils durchgeführten Versuch und somit dem gespotteten Slidemuster anpassen. Mit der Schaltfläche Laserpower wird die einstrahlende Lichtstärke eingestellt, durch die Schaltfläche Gain wird der Verstärkungsfaktor des Detektors bestimmt. Dies erfolgt in einer Skala von 0-100%. Mit Hilfe der verwendeten Software Imagene 5.0 werden durch Einstellung des Grids, das dem gespotteten beziehungsweise gescannten Slide angepasst wird, die einzelnen Spots auf ihre Fluoreszenz vermessen. Ein Grid ist ein Raster, welches vom Computer über ein Subarray gelegt wird. Dabei ist darauf zu achten, jeden Spot in seiner ganzen Größe in die Vermessung miteinzubeziehen. Außerdem sollte jeder einzelne Slide mit einem neu angepassten Grid vermessen werden, da innerhalb einer Charge durch das Spotten möglicherweise kleinere Veränderungen der Lage der jeweiligen Spots aufgetreten sein könnten. Die gemessenen Fluoreszenzen werden durch ein selbstentwickeltes Makro im Microsoft Excel-Programm ausgewertet und mit Hilfe des Origin-Programms in ein je nach Fragestellung ausgerichtetes Schaubild gebracht.

3.5.3 Sandwich-Assay

Der Sandwich Assay gehört zu der Gruppe der Festphasenimmunassays. Diese machen sich die Wechselwirkung zwischen dem Antigen und einem hierfür spezifischen Antikörper zunutze, um die Konzentration des Antigens bestimmen zu können. Das spezifische Merkmal eines Sandwich-Assays ist, dass der Fängerantikörper auf ein festes Substrat immobilisiert wird, das Antigen bindet und hieran wie in einem Sandwich wiederum der Detektorantikörper bindet (Abb. 1 Kap. 2.2.). Das Antigen wird einer Oberfläche zugeführt, die mit bekannten

Antikörpern bespottet wurde. Die Antigenbindung an den immobilisierten Antikörper kann durch verschieden gelabelte Detektorantikörper sichtbar gemacht werden. Erstens kann die Antigenbindung durch mit Fluoreszenzfarbstoff direkt gelabelte Detektorantikörper erfolgen. Zweitens kann die Sichtbarmachung der Antikörperbindung indirekt durch ein hochspezifisches System mit hoher Empfindlichkeit erfolgen. Hierzu zählt die Avidin-Biotin-Komplex-Bildung (ABC-System von engl. Avidin-Biotin-Complex). Die Antwort der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung kann hierbei verstärkt werden, indem man sich die Affinität der Proteine zu Biotin zunutze macht. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert und wird durch Zugabe des SAV-Oyster-Konjugates, also durch Zugabe des Avidin gebundenen Farbstoffes, sichtbar gemacht. Drittens kann eine Detektion durch ein Enzym wie der Horseradish-Peroxidase (HRP) stattfinden, die ein ungefärbtes Substrat in ein gefärbtes überführt. Insbesondere bei der letzten Methode lassen sich erhöhte Sensitivitäten erzielen, da das Enzym katalysiert wird und theoretisch unbegrenzte Mengen Farbstoff umsetzen kann. Diese Detektion ist allerdings nur im enzymgebundenen Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay) einsetzbar und kann im Microarray-Immunoassay-Format nicht verwendet werden, da der entstandene Farbstoff nicht an einen Spot bindet, sondern sich durch Diffusion über den gesamten Slide verteilen würde.

3.5.4 Enzyme linked immunosorbent assay [ELISA]

Der enzymgebundene Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay) ist ein Testverfahren, das zum einen dem qualitativen Nachweis von Protein-Antikörper-Komplexen dient und zum anderen eine quantitative Aussage zu der vorhandenen Menge an Bindungen ermöglicht. Für diesen Zwei-Antikörper-Sandwich-Assay wird der Fänger-Antikörper auf einem Trägermaterial immobilisiert (1), wobei hierzu Mikrotiterplatten (Maxisorb-Platten), die 96 Vertiefungen aufweisen und aus speziell behandeltem Polystyrol bestehen, verwendet werden [55]. Die Vorgehensweise bei der Inkubation ist der Abbildung 3 und dem nachfolgenden Schema zu entnehmen.

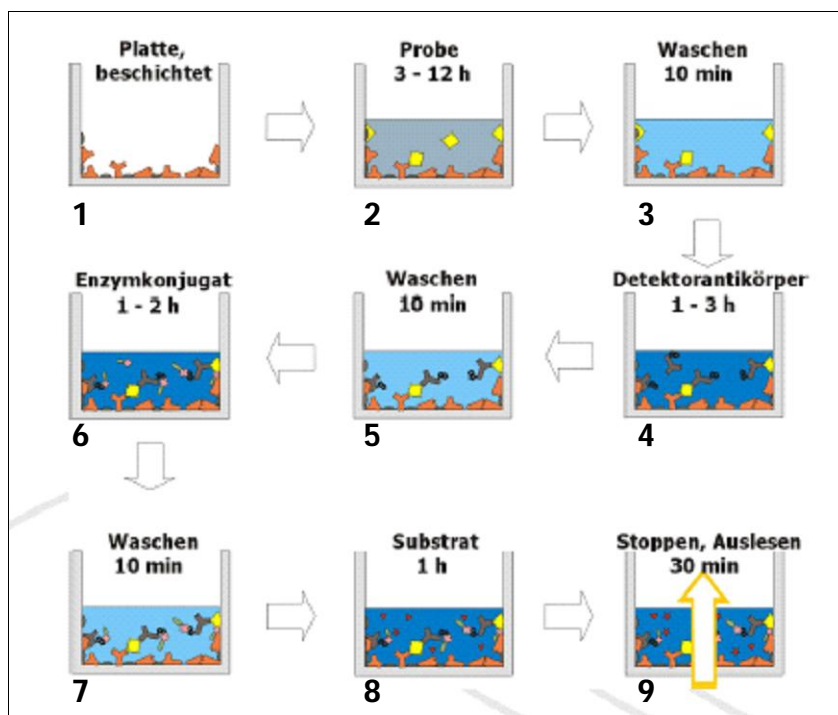
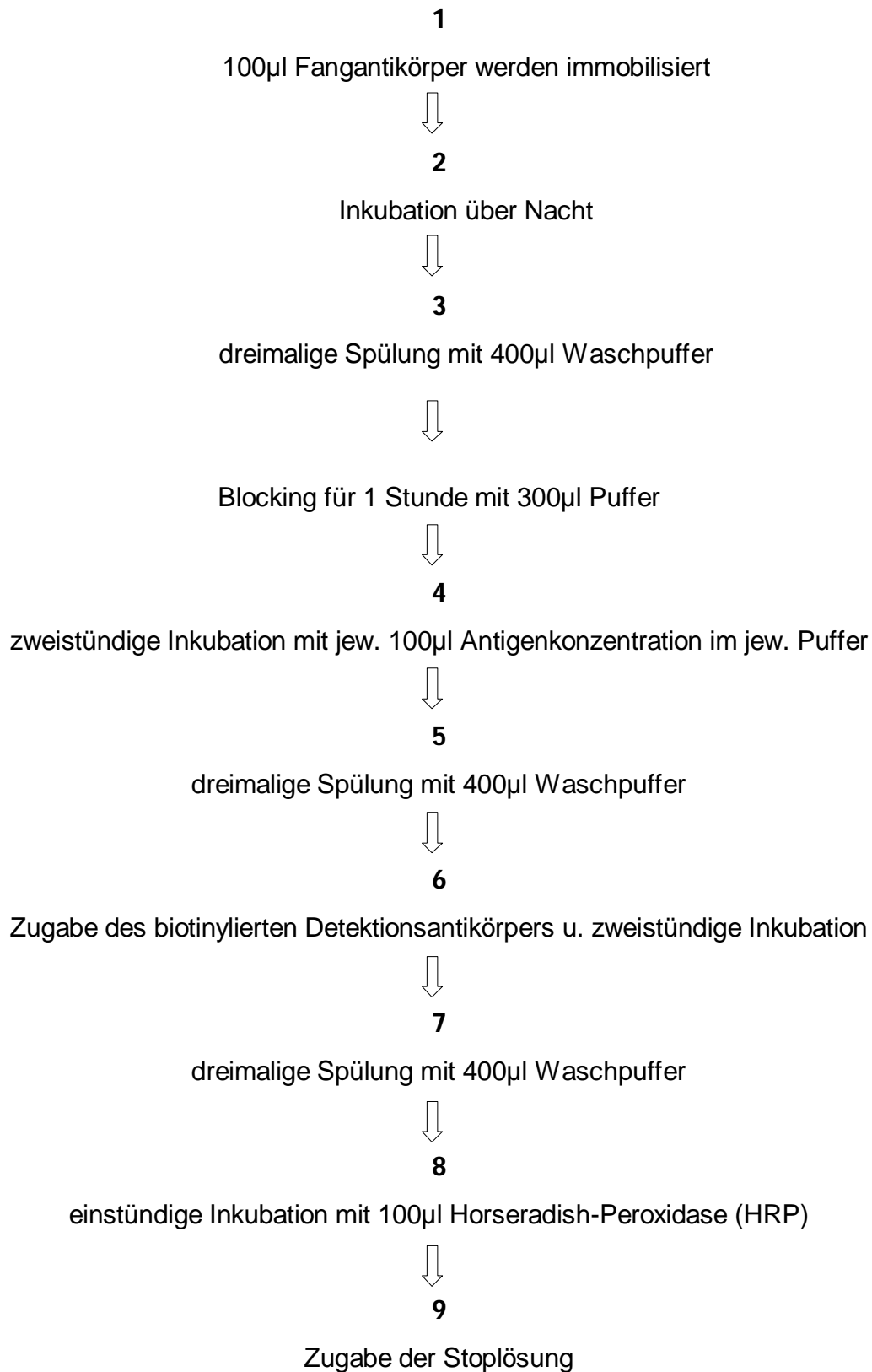


Abbildung 3 ELISA-Verfahren



Bei dem Enzymkonjugat handelt es sich meistens um Horseradish-Peroxidase (HRP) gelabelten Detektorantikörper. Anschließend wird als Substrat üblicherweise 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinen hinzugegeben, wobei durch HRP-katalysierte Reaktion eine Farbänderung erfolgt, deren Ausmaß proportional zur HRP und damit zur Menge an gebundenem Antigen ist. Durch Zugabe der Stopplösung erfolgt der Umschlag des blauen Produktes in gelb und es wird die optische Dichte gemessen. Diese ist umso größer, je mehr Sav-HRP an das Biotin, das an den jeweiligen Antikörper konjugiert vorliegt, gebunden hat. Die optische Dichte wird mit der easyWIN fitting Version 6.0a bestimmt. Dieses Programm ermittelt dann anhand der optischen Dichte, die zu den Standardkonzentrationen in Bezug gesetzt wird, die Konzentration des gebundenen Sandwich-Assays.

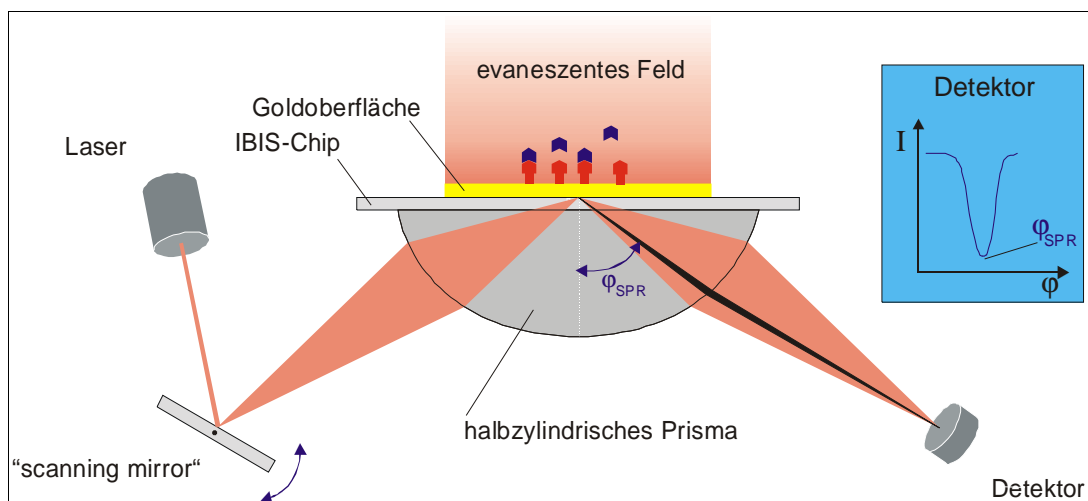
Bei der anderen Möglichkeit des Nachweises einer AK-Antigen-AK Reaktion in Form eines kompetitiven Immunoassays wird ein markiertes Kompetitor-Antigen verwendet. Der Analyt und der Kompetitor konkurrieren um einen Bindungsplatz am Antikörper, so dass das Signal indirekt proportional zur Analyt-Konzentration ist. Es erfolgt wiederum das Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure und das Auslesen im Computer.

3.5.5 Oberflächenplasmonresonanz

Biomolekulare Interaktionen werden konventionell mit dem ELISA oder der Affinitätschromatographie gemessen. Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR von engl. Surface Plasmon Resonance) ist eine weitere Möglichkeit diese Interaktionen zu detektieren. Der große Vorteil dieses Systems besteht darin, dass die Bindungen in Echtzeit aufgenommen werden und dass labelfreie Detektion von makromolekularen Interaktionen aufgezeichnet werden können.

Die Oberflächenplasmonenresonanz gehört zu den direkt optischen Messverfahren. Die bereits 1902 von Wood entdeckte und seit 1983 für

biosensorische Zwecke [53] eingesetzte Oberflächenplasmonenresonanz ist vor allem wegen der relativ geringen apparativen Anforderungen am weitesten verbreitet. Hierbei wird monochromatisches, kohärentes Licht (Laser) auf eine Gold-, Silber- oder Kupferoberfläche gestrahlt und von dieser wieder reflektiert (Darstellung 5). Bei richtiger Polarisierung und einem bestimmten Einfallswinkel tritt das einfallende Licht mit den freien Elektronen des Edelmetalls in Resonanz [77] und ein Teil der eingestrahelten Lichtenergie wird von den oszillierenden Elektronen absorbiert. Die elektromagnetische Strahlung beschränkt sich nicht ausschließlich auf den Metallfilm, sondern breitet sich auf das darüberliegende Dielektrikum aus. Dieses sogenannte evaneszente Feld, welches bis ca. 300nm [96] über die Oberfläche hinaus wechselwirkt, reagiert auf Veränderungen des Brechungsindex sehr empfindlich. Diese können zum Beispiel durch die Adsorption eines Analyten entstehen, welches eine Veränderung des SPR-Winkels zur Folge hat.



Darstellung 5 Funktionsweise SPR

Die Sensitivität des SPR-Messgerätes wird in erheblichem Maße durch Randbedingungen, wie Temperaturschwankungen, Brechungsindexunterschiede der Probenlösungen, Analytadsorption an Schlauch- und Gefäßwänden

oder unspezifische Wechselwirkungen von Bestandteilen der Probenmatrix mit der Sensoroberfläche limitiert. Unter günstigen Bedingungen sorgt eine Proteinbelegung von weniger als 1pg/mm^2 für eine Verschiebung der Resonanzkurve entsprechend einer Brechungsindex-änderung von weniger als 10^{-6} . Die Korrelation zwischen der SPR-Winkeländerung und der Anzahl der gebundenen Moleküle auf der Sensoroberfläche kann durch die entstehende Brechungsindexveränderung abgeschätzt werden. Vorteilhaft ist die Dreidimensionalität des evaneszenten Feldes. Sie erlaubt Messungen über der direkten Oberfläche des Sensor-chips. In der Praxis bedeutet dies, dass durch die Verwendung dreidimensionaler Matrix-Strukturen die Immobilisierungskapazitäten um ein Vielfaches erhöht werden können.

3.5.5.1 Aufbau des SPR-Sensorchips

Ein SPR-Sensorchip ähnelt den Microarrayslides in bezug auf Oberflächenstruktur, hat jedoch eine geringere Immobilisierungskapazität. Es handelt sich üblicherweise um ein Glasplättchen, auf welches ein Goldfilm mit einer Schichtdicke von 40 - 60 nm aufgedampft wird, der für die Oberflächenplasmonresonanz erforderlich ist [42]. Auf diese Goldoberfläche wird zunächst ein Haftvermittler adsorbiert, der anschließend von einer Hydrogelschicht überzogen wird.

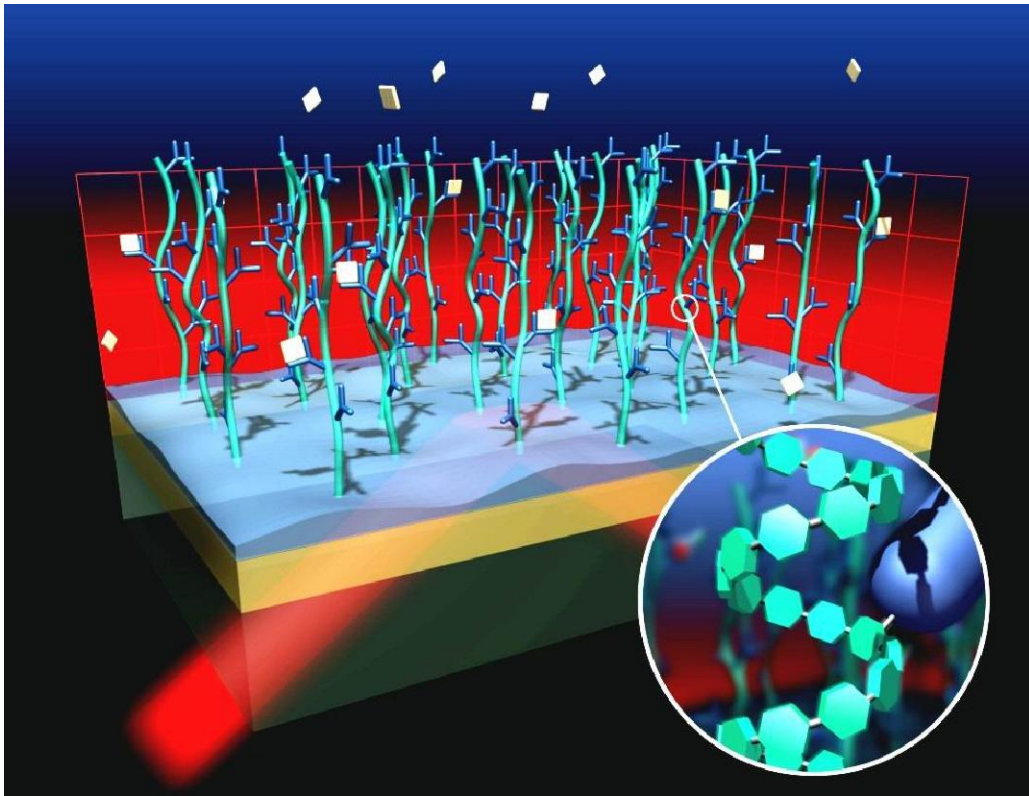


Abbildung 4 Aufbau des SPR-Biosensorchips

3.5.5.2 SPR-Messung

Im SPR werden Brechungsindexänderungen gemessen, die durch die Bindung der Proteine an die Sensoroberfläche verursacht werden. Die Temperatur sollte dabei immer konstant gehalten werden, da sich der Brechungsindex mit der Temperatur ändert. Außerdem ist es wichtig bei der Auswertung darauf zu achten, dass das SPR-Signal zum Molekulargewicht des Analyten proportional ist. Antigene haben eine Masse von ca. 8000Da und zeigen deshalb eine andere Anbindung als Antikörper, die eine Masse von ca. 150000Da aufweisen. Anhand der Tabelle 7 soll die Aktivierung des Chips beschrieben werden, um im Anschluss auf die SPR-Messung einzugehen, die in der Abbildung 6 nachzuvollziehen ist.

Zugabe von:	Aufgabe:
Acetatpuffer (5mM)	Basislinie erzeugen
Elutionspuffer (alkalisch)	Reinigung der Sensoroberfläche
N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N- (dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	Aktivierung der Oberfläche

Tabelle 7 Chipaktivierung

Die Oberfläche, die als Hydrogeloberfläche bezeichnet wird, wird aus Carboxymethyl-Dextranen hergestellt. Diese langkettigen Polysaccharide zeichnen sich durch eine hohe Flexibilität und geringe unspezifische Wechselwirkung aus. Carboxymethyl-dextran (CM-Dextran) muss zur Ausbildung einer kovalenten Bindung an den Haftvermittler erst aktiviert werden. Hierzu gibt man zunächst Elutionspuffer auf die Sensoroberfläche, um Kontaminationen herauszuwaschen. Dieser ist alkalisch und dient der Reinigung der Oberfläche, dem Herauslösen von Substanzen aus der stationären Phase. Im darauffolgenden Schritt werden die Carboxylgruppen der Oberfläche des Chips mit Hilfe von einer Mischung aus N-Hydroxy-succinimid (NHS) und N-Ethyl-N (dimethylaminopropyl) –carbodiimid (EDC) aktiviert. Diese aktiven Ester reagieren mit den primären Aminofunktionen des Liganden (Protein) unter Bildung einer Peptidbindung (Abb. 5B). Überschüssige aktivierte Ester werden durch alkalische Hydrolyse wieder in Carboxylgruppen überführt (Abb. 5C). Eine Alternative ist die Aminolyse mittels Ethanolamin, die hier allerdings nicht gezeigt wird.

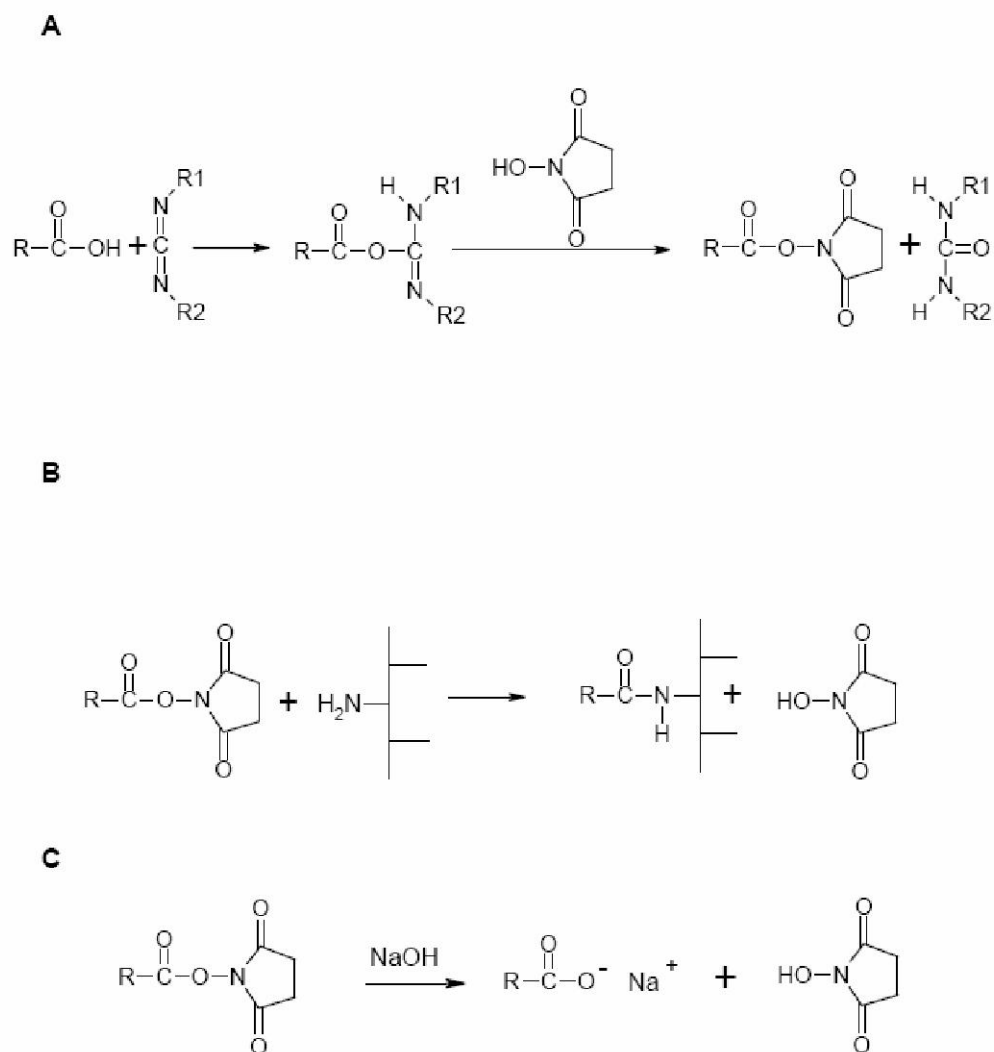


Abbildung 5 Beispiel einer Immobilisierung mittels NHS/EDC-Methode

A: Reaktion der Carboxymethylgruppen mit NHS/EDC zu aktivierten NHS-Estern

B: Reaktion der aktivierten Ester mit einem primären Amin zu einer Peptidbindung

C: Rückbildung der aktivierten Ester durch alkalische Hydrolyse mit NaOH

Die Anbindung des monoklonalen Antikörpers auf der Hydrogeloberfläche sowie die Anbindung des Analyten und die eines weiteren Antikörpers werden in Echtzeit mittels einer Kurve erkennbar. In der folgenden Grafik ist eine komplette SPR-Messung dargestellt, die nach der Aktivierung der Hydrogeloberfläche aufgezeichnet wurde. Die Einzelschritte dieser Messung sind nachfolgend genauer erläutert. Es handelt sich hierbei um die Darstellung einer optimalen Kurve, die aus einem guten Bindungsverhalten des Analyten resultiert.

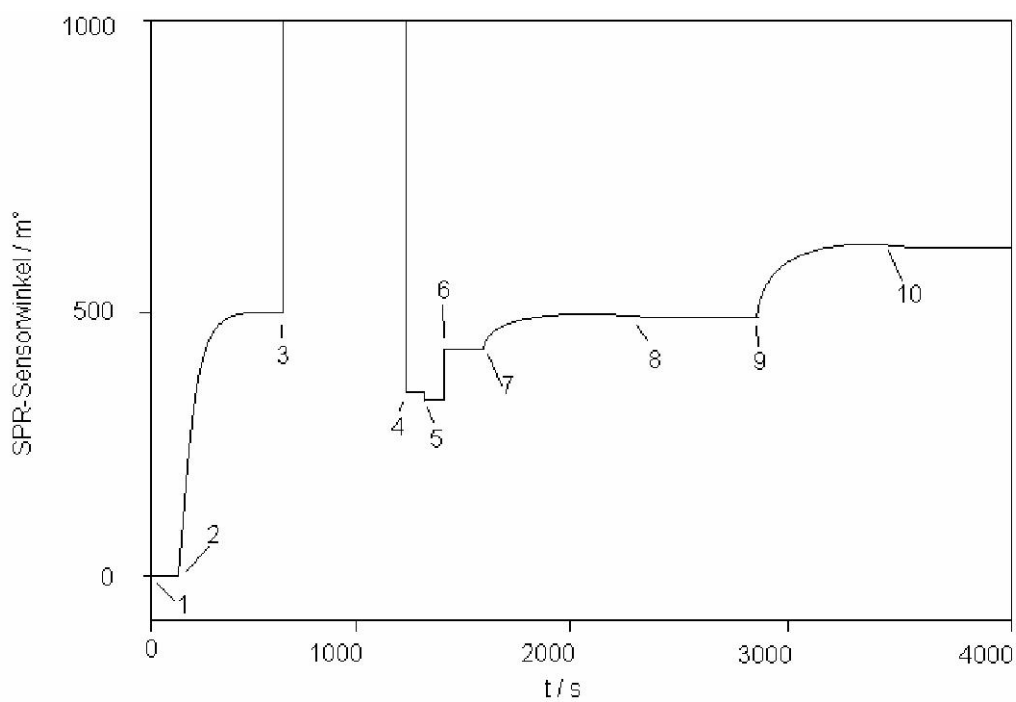


Abbildung 6 SPR-Messung

Punkt	Zugabe:	Aufgabe:
1:	Acetatpuffer (5mM)	Basislinie erzeugen
2:	monoklonaler Antikörper	Immobilisierung des Antikörpers auf der Oberfläche
3:	1 M Ethanolamin (Blockingpuffer)	Quenchen: verbliebene Gruppen auf Chipoberfläche werden abgesättigt
4:	destilliertes H ₂ O	Basislinie: wirklich gebundene Menge monoklonalen Antikörpers wird sichtbar
5:	destilliertes H ₂ O	Basislinie: wirklich gebundene Menge monoklonalen Antikörpers wird sichtbar
6:	PBS/BSA 0,1 %	Umpufferung zur Stabilisierung des Analyten, Nachahmung eines serumähnlichen Milieus
7:	Antigen	Anbindung an den monoklonalen Antikörper
8:	PBS/BSA 0,1 %	Basislinie
9:	Polyklonaler Antikörper	Anbindung an das Antigen
10:	PBS/BSA 0,1 %	Basislinie

Tabelle 8 Abfolge der Reagenzienzugabe

Nach der Aktivierung soll eine Basislinie erzeugt werden (Punkt 1), die zunächst durch 30 sekundige Zugabe von destilliertem H₂O aufrechterhalten wird und danach durch die Zugabe des monoklonalen Antikörpers für 600-1000 Sekunden einen Ausschlag erfährt (Punkt 2). Für die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers wird dieser zuvor mit Acetatpuffer versetzt. Das Signal steigt wegen der Adsorption des Antikörpers nach dessen Zugabe an. Um die Oberfläche in diesem Zustand zu erhalten wird der Chip, nachdem

dieser für 150 Sekunden mit H₂O beaufschlagt wurde, mit 1M Ethanolamin pH8,5 für 600 Sekunden gequ coastet (Punkt 3). Der hohe Signalsprung ist wegen des erhöhten Brechungsindex des Ethanolamins refraktärer Natur. Die wirklich gebundene Menge monoklonalen Antikörpers wird nach wiederholter Zugabe von ddH₂O (Punkt 4) ersichtlich. Die Differenz der Basislinien vor und nach der Immobilisierung gibt die Menge des gebundenen Immobilisats auf der Chipoberfläche wieder. Es erfolgt nun ein Wechsel des Laufpuffers in PBS/BSA 0,1% (Punkt 6). Sobald durch diesen Puffer eine Basislinie erreicht wird, kann das betreffende Antigen hinzugegeben werden (Punkt 7). Wie zuvor bereits erwähnt, ist an diesem Punkt ein nicht so großer Ausschlag der Kurve zu erwarten, da durch die geringere Masse des Analyten im Vergleich zum Antikörper eine geringe Brechungsindexverschiebung erfolgt. Nach ausreichender Inkubation des Antigens wird erneut eine Basislinie mit Hilfe der Zugabe von PBS/BSA 0,1% genommen (Punkt 8). Daraufhin wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Punkt 9), wobei dieser im Unterschied zum fluoreszenzbasierten Detektionsverfahren nicht gelabelt sein muss. Um erneut eine Basislinie zu erreichen, wird ein letztes Mal mit PBS/BSA 0,1% inkubiert (Punkt 10).

3.6 Computerprogramme

Microsoft Excel

GMS 418 Array Scanner Software

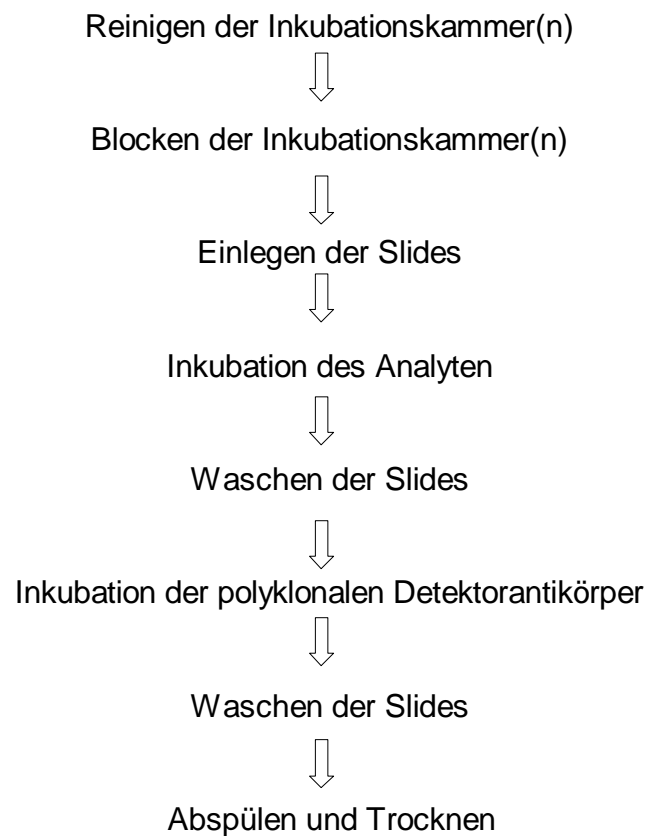
OriginPro 7,5

Imagene 5.0

417 Arrayer Software

3.7 Methodik der Inkubation des Multianalyt-Protein-Microarray-Assays

Im Folgenden soll eine kurze Einführung in das Inkubationssystem gegeben werden, das hauptsächlich in den Versuchen des Microarray-Assay-Designs Verwendung findet.



Das Reinigen der Inkubationskammern erfolgt durch einstündiges Einwirken von 1%iger Mucosal-Lösung und anschließendes mehrfaches Spülen mit ddH₂O. Daraufhin werden die Inkubationskammern mit 2ml des Puffers (PBS 1mg BSA/ml PBS) für 20 Minuten geblockt. Das Blocken dient dazu, die Wände der Inkubationskammern mit Proteinen zu belegen und dadurch die Adsorption der Analyten zu verringern. Im Anschluss an das Blocken werden die Inkubationskammern wiederholt für fünf Minuten mit PBS gewaschen. In den Inkubationskammern wird nun der zum RnD-System gehörige Diluent-Puffer vorgelegt. Die Antigene werden in den entsprechenden Konzentrationen dazugegeben und die Slides werden in die Inkubationskammern gelegt. Die Antigeninkubation erfolgt für zwei Stunden. Nach Ablauf der Zeit wird die überstehende Lösung abgesaugt. Die Inkubationskammern werden zweimal für zwei Minuten mit PBS gespült, welches schließlich wieder abgesaugt wird. Die Inkubation der polyklonalen Detektionsantikörper erfolgt wiederum in Diluent, wobei die Antikörper-konzentration einem zehnfachen molaren Überschuss der Analyt-konzentration entsprechen sollte. Nach erneuter zweistündiger Inkubation werden die Antikörper je nach Bedarf zurückpipettiert, damit man eine weitere Inkubation mit ihnen vornehmen kann. Es erfolgt eine zweimal zwanzigminütige Zugabe von PBS/Tween 0,05% und ein zweimal fünfminütiges Spülen mit PBS. Die Slides werden daraufhin aus ihren Kammern entnommen und mit ddH₂O aus einer Polyspritzflasche vorsichtig gewaschen. Die Trocknung erfolgt durch Abblasen mit trockener Pressluft. Die Vorgehensweise wird in der folgenden Abbildung 7 verdeutlicht.

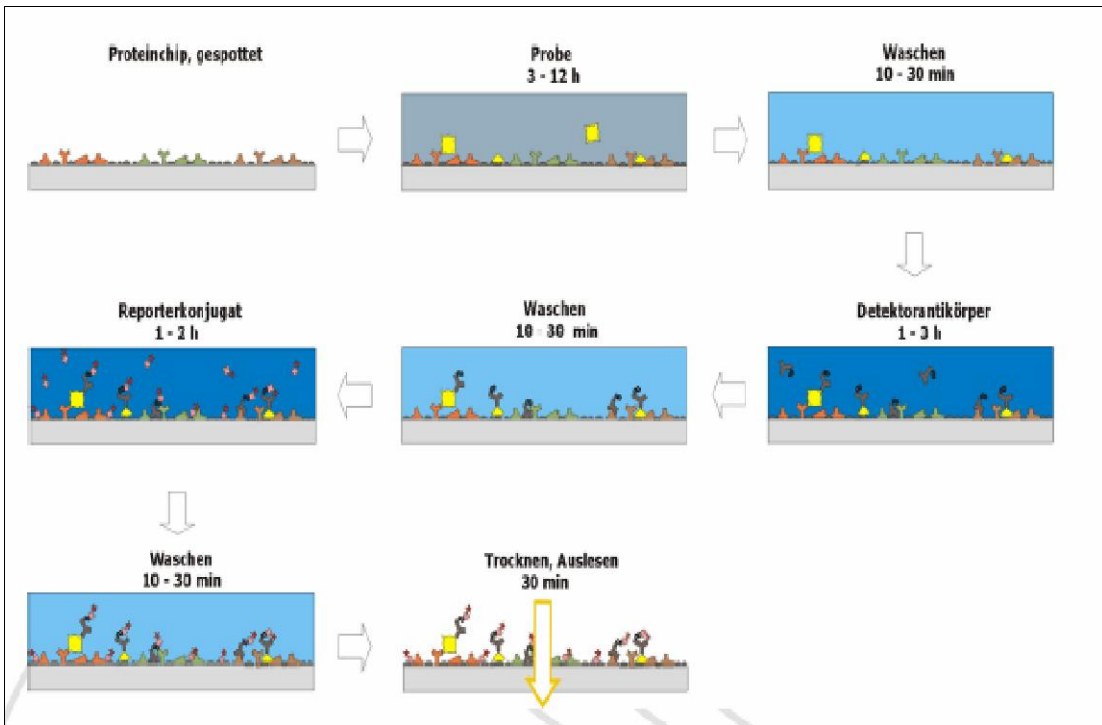


Abbildung 7 Darstellung der Inkubationsabfolge

4 Ergebnisse

Die Entwicklung eines Microarray-Assays ist wegen der Komplexität der Durchführung und der Einflussnahme vieler verschiedener Parameter sehr schwierig. Das theoretische Detektionslimit wird von Kusnezow bei wenigen Femtogramm angegeben, allerdings erreichten die Sensitivitäten bisher kaum den Picogrammbereich [46]. Darüber hinaus sind bislang aufgrund der bereits erwähnten Kreuzreaktivitäten nur Analysen von Proben geringer Komplexität wirklich erfolgreich gewesen [79].

Im Folgenden wird die Entwicklung des Zytokinchips beschrieben. Hierbei wird das Beschicken der Titerplatte für das Spotten und das Spotten als solches erklärt. Im Anschluss werden die Inkubation mit den Antigenen und polyklonalen Antikörpern sowie die Auswertung der dabei entstehenden konzentrationsabhängigen Fluoreszenzen aufgezeigt.

Darauffolgend wird die Wahl der zehn verschiedenen Zytokine für das 10er-Panel erläutert, die dann um weitere 35 Zytokine/Chemokine ergänzt werden. Des Weiteren wird die SPR-Methode vorgestellt und ELISA-Versuche zur Pufferwahl werden beschrieben.

4.1 Die Entwicklung eines Zytokinchips

Das Entwickeln einer Konzentrationsreihe beginnt mit der Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper. Diese werden in eine Titerplatte gegeben, damit der Spotter aus dieser mit Hilfe des Pin-Ring-Systems einzelne Microspots auf die Hydrogeloberfläche der Slides spotten kann. Es folgt die Inkubation ausgewählter Antigenkonzentrationen, deren Bindung durch die Zugabe von Detektionsantikörpern im Scanner dargestellt werden kann. Die prozessierten

Slides werden durch die Imagene 5.0 Software ausgemessen, die Ergebnisse werden mit OriginPro 7,5 und Excel dargestellt.

4.1.1 Herstellung der Titerplatte für das Spotten

In der ersten Phase einer Versuchsreihe, dem Spotten, also der Beschichtung der Slides mit den monoklonalen Antikörpern, wird die Titerplatte je nach ausgewähltem Spotmuster mit monoklonalen Antikörpern versehen. Für das Spotten muss zunächst ein passendes Spotmodell programmiert werden. Pro Slide werden 12 Felder angelegt, die jeweils 6 Spalten mal 4 Reihen enthalten. Dadurch wird eine zwölffache Wiederholung der Versuche auf einem Slide möglich, oder der Slide lässt sich durch eine Silikonkammer in 12 Segmente teilen, in denen jeweils unterschiedliche Versuchsabläufe durchgeführt werden könnten. Die folgende Abbildung zeigt einen derart gespotteten Slide.

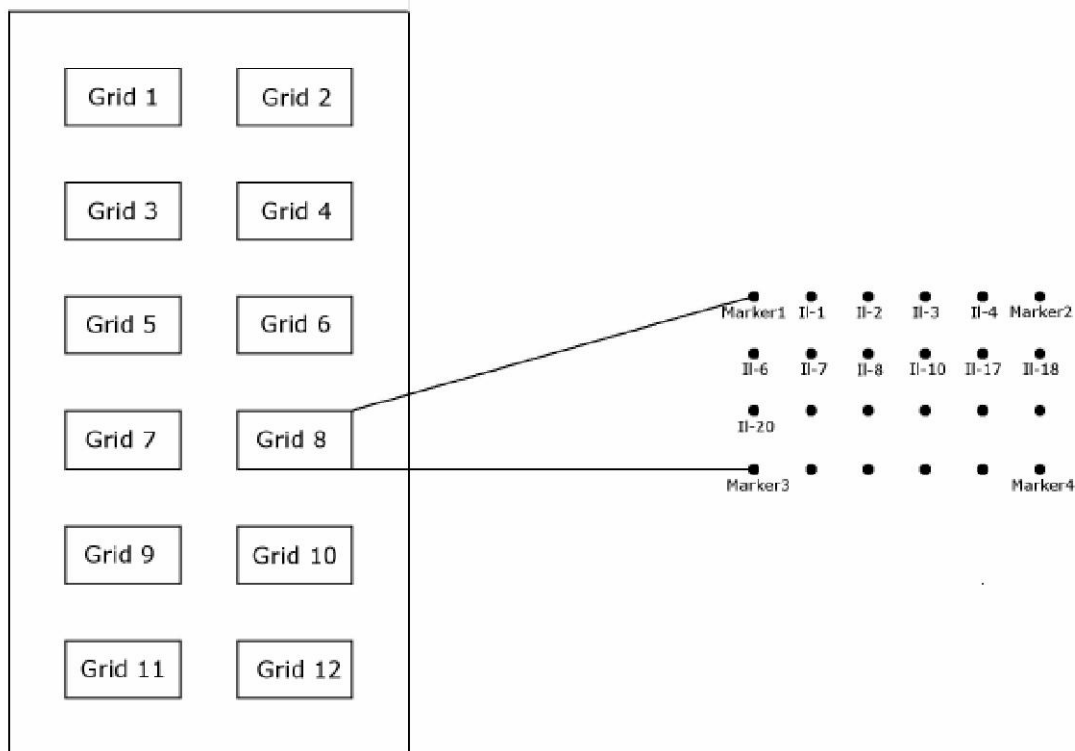


Abbildung 8 Schema eines gespotteten Slides

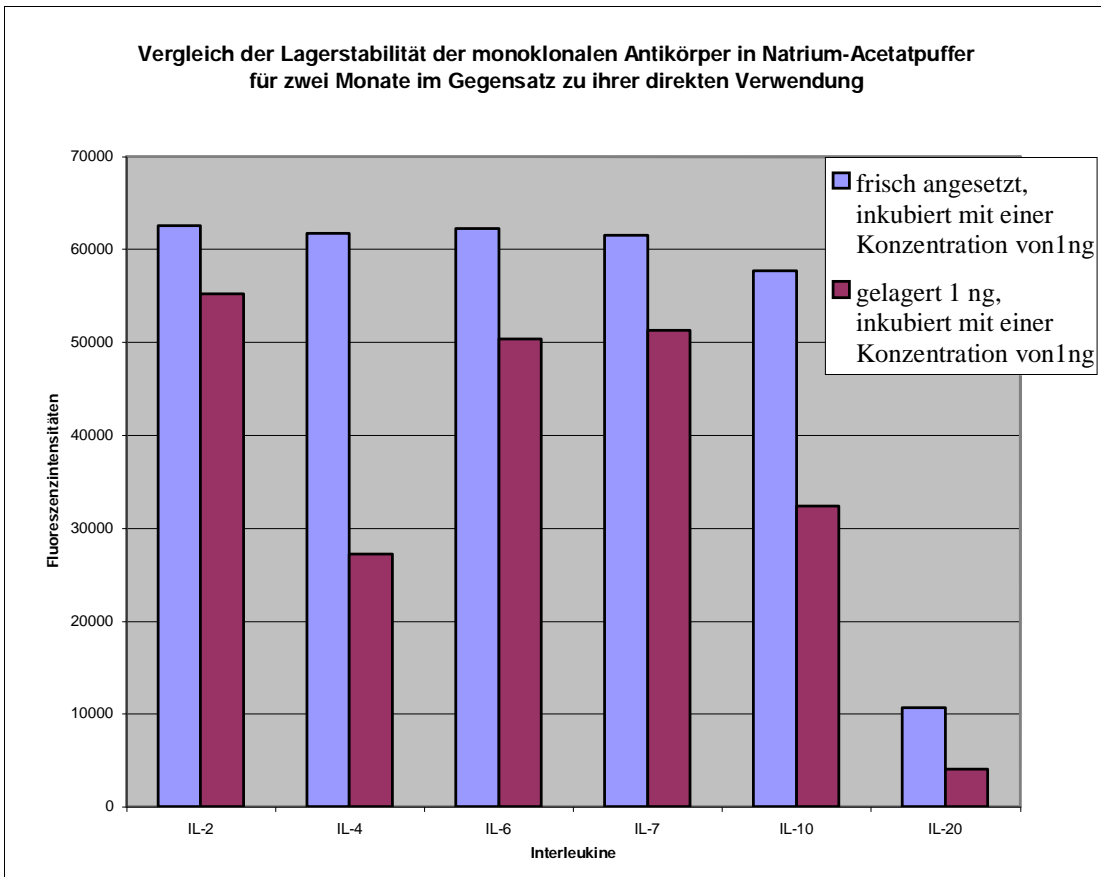
Es wird eine Titerplatte verwendet und pro Spottedurchgang werden neun Slides gespottet. Hierbei werden üblicherweise vier Treffer per Rasterpunkt gespottet, wodurch sich die Menge des Antikörpers pro Spot erhöht. Um 12 einzelne Felder beziehungsweise Versuchswiederholungen zu erhalten, müssen zwei Wiederholungen durchgeführt werden. Die Titerplatte wird mit den monoklonalen Antikörpern befüllt, wobei eine Konzentration von jeweils 7 μl des Antikörpers vorgelegt wird. Danach wird mit 24,5 μl 5mM Acetatpuffer aufgefüllt. Der für die Positionierung der Grids wichtige Marker wird jeweils in die Ecken der Titerplatte gefüllt, wobei hier ebenso 7 μl Markerstammlösung mit 24,5 μl Acetatpuffer gemischt werden. Für jeden einzelnen Spot auf dem Slide wird eine Menge von 1 nl verwendet. Im folgenden Bild ist eine Darstellung der Titerplatte zu sehen, mit deren Hilfe die Slides gespottet werden. Diese Darstellung ermöglicht die nach den Inkubationen erreichten Fluoreszenzen den jeweiligen Analyten zuzuordnen.

Marker	Marker	IL-1	IL-1	IL-2	IL-2			IL-4	IL-4	Marker	Marker
Marker	Marker	IL-1	IL-1	IL-2	IL-2			IL-4	IL-4	Marker	Marker
IL-6	IL-6	IL-7	IL-7	IL-8	IL-8	IL-10	IL-10	IL-17	IL-17	IL-18	IL-18
IL-6	IL-6	IL-7	IL-7	IL-8	IL-8	IL-10	IL-10	IL-17	IL-17	IL-18	IL-18
Marker	Marker									Marker	Marker
Marker	Marker									Marker	Marker

Tabelle 9 Titerplatte für den Spottingprozess

4.1.1.1 Lagerstabilität der Titerplatte

Bei mehrfachen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass beim Spotten der monoklonalen Antikörper auf die Slideoberfläche am besten eine frisch angesetzte Titerplatte verwendet wird. Die frisch angesetzte Titerplatte zeigt nämlich höhere Fluoreszenzintensitäten bei einer Konzentration des Antigens von 1ng/mL im Vergleich zu einer Lagerung der Titerplatte für zwei Monate bei – 80°C (Balkendiagramm 1).

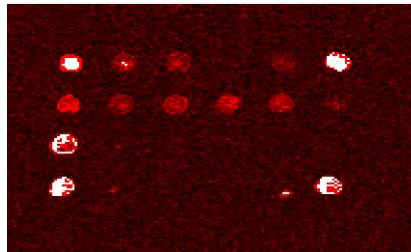


Balkendiagramm 1 Lagerstabilität der Titerplatte fürs Spotten

Es wird deutlich, dass im Gegensatz zu der unmittelbar vor dem Bespotten der Slides angesetzten Titerplatte die zwei Monate gelagerte Titerplatte Fluoreszenzintensitätseinbuße von 13% für IL-2, von 55% für IL-4 und von sogar 67% für IL-20 aufweist. Um kleinere Analytmengen im Pico-grammbereich und somit auch niedrige Fluoreszenzbereiche überhaupt messen zu können, sollte deshalb eine frisch angesetzte Titerplatte verwendet werden.

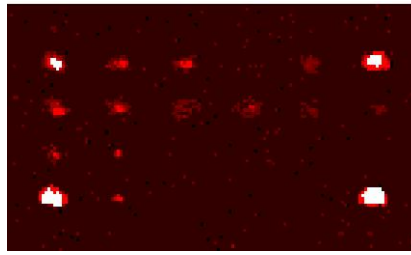
4.1.1.2 Die Slides nach dem Spotten

Die Slides werden nach der angefertigten Titerplatte und dem zuvor bestimmten Spottingmuster mit den monoklonalen Antikörpern bespottet. An den Ecken jedes einzelnen Spotting-Musters befinden sich Marker, die durch eine starke Fluoreszenz gekennzeichnet sind. Alle monoklonalen Antikörper weisen in dem aufgespotteten Zustand eine gewisse Eigenfluoreszenz auf. Interleukin 20 zeigt eine sehr starke Fluoreszenz, auf die nachfolgend näher eingegangen wird. Die anderen Interleukine zeigen geringe für Antikörper übliche Eigenfluoreszenzen, die später bei der Auswertung abgezogen werden.



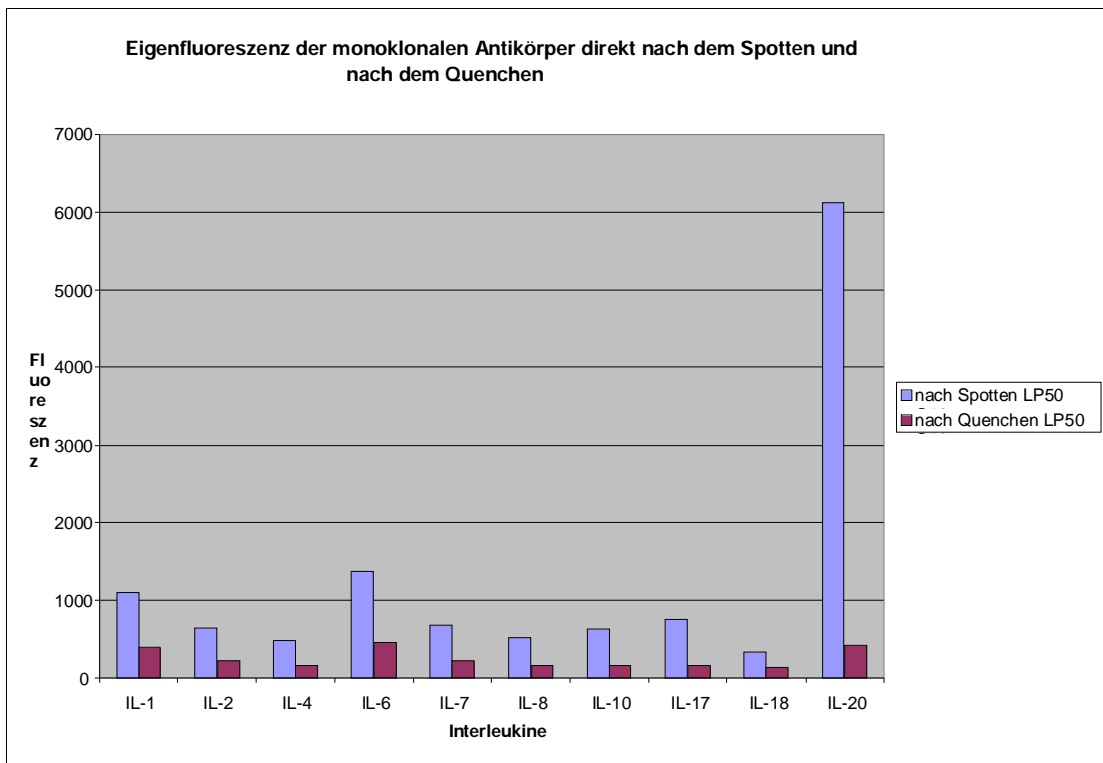
Darstellung 6 Zustand nach dem Spotten

Nach dem Spotten wird mit Ethanolamin gequencht. Hierdurch werden restliche aktive NHS-Ester aminolysiert (Abb. 5 Kapitel 3.5.5.2). Würde man dies nicht tun, würden in nachfolgenden Inkubationsschritten Analyt sowie Detektorantikörper unspezifisch kovalent gebunden werden, wodurch ein hoher Hintergrund entstünde. Die Slides werden eine halbe Stunde unter starkem Schwenken in Ethanolamin inkubiert. Nach dem Quenchen sieht das Scanmuster folgendermaßen aus:



Darstellung 7 Zustand nach dem Quenchen

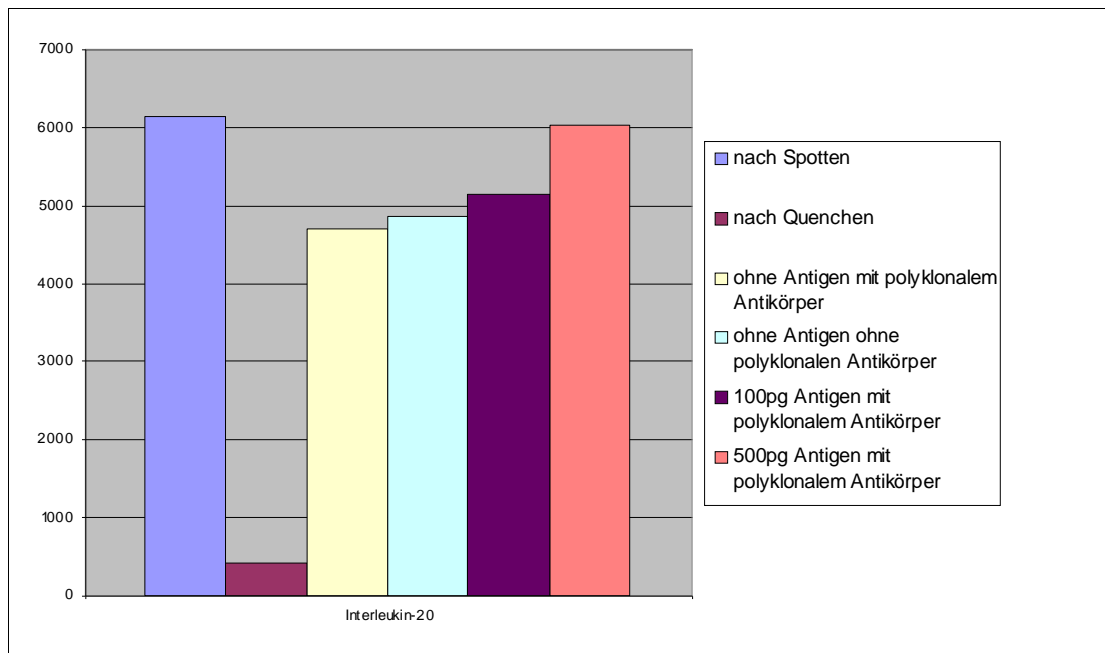
Hier ist zu erkennen, dass die Eigenfluoreszenz durch das Quenchen zurückgegangen ist. Beim Quenchen werden offensichtlich also nicht nur die verbliebenen reaktiven NHS-Ester abgesättigt, sondern auch nicht kovalent gebundene Antikörper eluiert. Ein vergleichendes Schaubild ermöglicht es, sich die Bindungen der jeweiligen monoklonalen Antikörper auf der Slideoberfläche direkt nach dem Spotten und dann nach dem Quenchen zu verdeutlichen. Auch hier wird noch einmal sichtbar, dass der Anti-Interleukin 20 Antikörper eine hohe Eigenfluoreszenz aufweist, die allerdings nach dem Quenchen durch die Elution wieder sinkt.



Balkendiagramm 2 Vergleich der Fluoreszenz nach dem Spotten und nach dem Quenchen

In dem oben zu sehenden Schaubild fällt Interleukin-20 durch seine im Gegensatz zu den anderen Interleukinen hohe Fluoreszenz auf. Die Ursache hierfür muss untersucht werden. Es werden Negativkontrollen durchgeführt, wobei diese innerhalb einer Konzentrationsreihe mitprozessiert werden. Die Negativkontrollen werden den Puffern ausgesetzt, gespült und abgeblasen wie die zur Konzentrationsreihe gehörenden Slides (Abb.7 Kap. 4.7). Einer der Slides wird weder mit Antigen noch mit polyklonalem Antikörper inkubiert. Ein weiterer Slide wird nur mit dem polyklonalen Antikörper inkubiert. Zwei weitere Slides werden sowohl dem Antigen als auch dem polyklonalen Antikörper ausgesetzt, wobei die Antigenkonzentrationen 100pg für den einen Slide und 500pg für den anderen Slide betragen. Nachfolgend werden die vier Fluoreszenzen mit den Fluoreszenzintensitäten direkt nach dem Spotten und denjenigen nach dem Quenchen verglichen. Zu erwähnen sei an dieser Stelle,

dass zu diesem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung biotinylierte polyklonale Antikörper verwendet wurden.



Balkendiagramm 3 Vergleichende Fluoreszenzmessungen von IL-20

Unter Berücksichtigung der extrem hohen Fluoreszenz nach dem Spotten wird vermutet, dass diese monoklonale Antikörperpräparation verunreinigt war.

Um diesen Effekt zu erklären, werden erneute Versuche mittels SPR durchgeführt, was im Kapitel 4.2.4 erläutert wird.

4.1.2 Inkubation des Antigens

Für die Entwicklung des Immunoassays ist es wichtig die Prozessierung der gespotteten Slides zu optimieren.

Es erfolgt eine umfangreiche Untersuchung potenzieller Einflussfaktoren und Fehlerquellen, die die Empfindlichkeit des Assays verbessern sollen. Während

der Erstellung der Kalibrationskurve werden die Inkubationskammern wie folgt vorbereitet: Sie werden zunächst mit PBS/BSA für zwanzig Minuten und danach zweimal fünfminütig mit PBS gespült. Daraufhin werden nach folgendem Schema Antigene in Diluent in die Inkubationskammern gegeben und danach werden die Slides hineingelegt:

Slide 1	Slide2	Slide3	Slide4	Slide5	Slide6	Slide7	Slide8
10ng/mL Antigen	5ng/mL Antigen	1ng/mL Antigen	500pg/mL Antigen	250pg/mL Antigen	100pg/mL Antigen	10pg/mL Antigen	Kein Antigen
+	+	+	+	+	+	+	+
2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl
Diluent	Diluent	Diluent	Diluent	Diluent	Diluent	Diluent	Diluent

Tabelle 10 Inkubationsschema

Wir konnten zeigen, dass verschiedene Puffersysteme entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis haben. Ausführlich wird dies im Kapitel 4.3 dargestellt. Als optimaler Puffer für den Zytokinchip konnte der Diluent-Puffer charakterisiert werden.

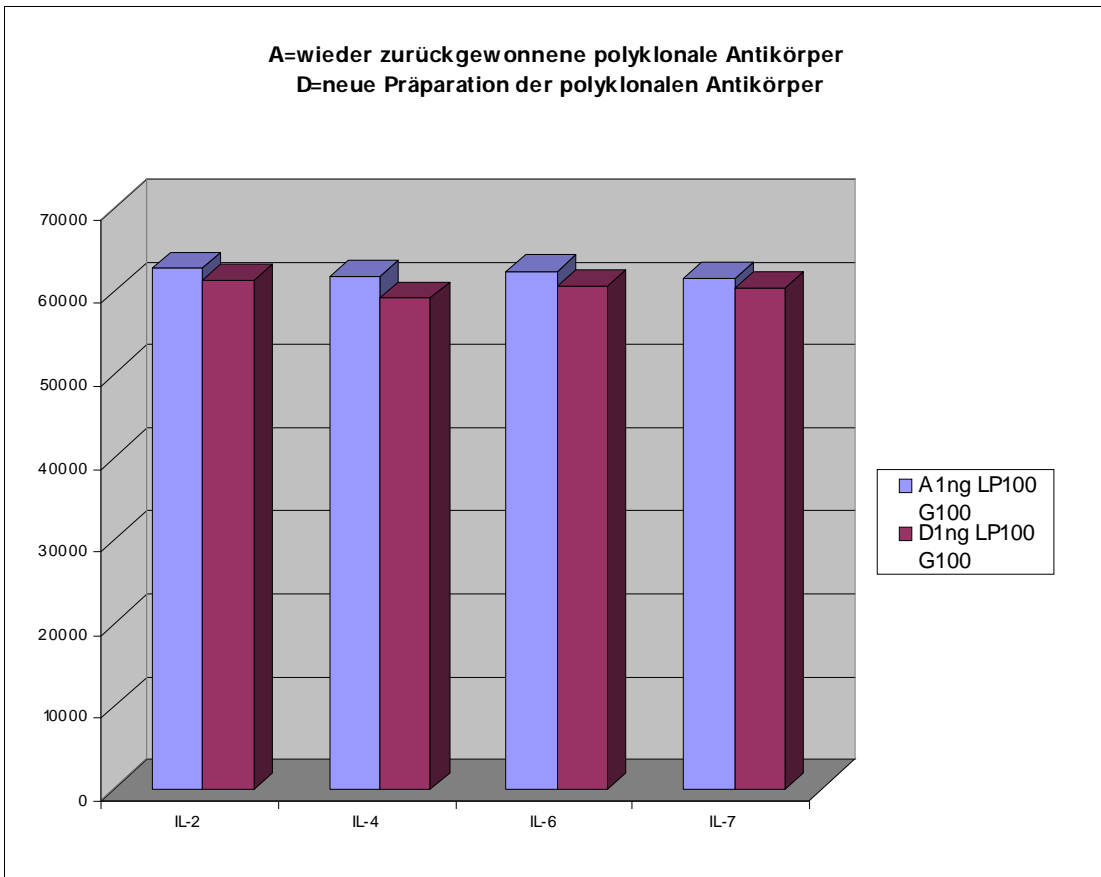
4.1.3 Inkubation der polyklonalen Antikörper

Nach zweistündiger Inkubation der Antigene erfolgt nach vorherigem Absaugen der Antigene und zweimaligem fünfminütigen Spülen mit PBS die Zugabe der Antikörper in Diluent. Die Antikörper werden nach Lieferung zur Verbesserung der Bindungseigenschaften innerhalb der Kalibrationsreihen gereinigt. Es werden jeweils 0,5µl jedes gelabelten polyklonalen Antikörpers mit 2 ml Diluent in acht Inkubationskammern gegeben. Nach zwei Stunden werden die

Antikörperlösungen aus den Inkubationskammern abgesaugt. Sie werden gesammelt, um weiterverwendet werden zu können. Die Slides werden noch zweimal zwanzig Minuten in PBS/Tween gelagert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen werden die Slides herausgenommen, mit destilliertem Wasser abgespült, mit einer Druckluftpistole getrocknet und gescannt.

4.1.3.1 Die Wiederverwendung inkubierter polyklonaler Antikörper

Für regelmäßige Experimente ist es, auch aus Kostengründen, wichtig zu wissen, wie häufig die bereits inkubierten polyklonalen Antikörper wiederverwendet werden und reproduzierbare Ergebnisse liefern können. Hierzu werden die Intensitätsbereiche, die bei einer Antigenkonzentration von 1ng/mL für IL-2, IL-4, IL-6 und IL-7 erreicht werden, mit den Fluoreszenzerggebnissen noch nicht inkubierter polyklonaler Antikörper verglichen. Dieser Versuch zeigt eine um maximal 5% abweichende Fluoreszenzintensität, wobei die Fluoreszenz bei der Inkubation mit den bereits inkubierten polyklonalen Antikörpern interessanterweise um 5% höher liegt. Es ist also in jedem Falle möglich, die bereits für eine Inkubation verwendeten Detektionsantikörper für weitere Versuche zu benutzen, ohne dass mit Fluoreszenzintensitätseinbußen zu rechnen ist.



Balkendiagramm 4 Vergleich von neuen und wiederverwendeten polyklonalen Antikörperlösungen

4.1.4 Das Scannen

Das Scannen ergibt bei einer Laserpower-Einstellung von 100 % Laserleistung und voller Verstärkung folgende Ergebnisse, wobei hier nur einige Beispiele gegeben werden. Bei einer Konzentration von 10 pg/mL ist durch den Scanner zu erkennen, dass die Marker, die sich in den Ecken befinden, im Maximum des ausmessbaren Bereiches liegen. Interleukin-1beta, Interleukin-2, Interleukin-6 und Interleukin-8 haben ebenfalls ein Maximum erreicht, so dass in diesem Fall auf eine geringere Laserleistung und Verstärkung zurückgegriffen werden muss, um unverfälschte Ergebnisse zu erhalten.

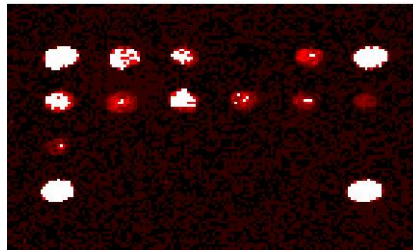


Abbildung 9 Scanergebnis bei einer Konzentration von 10pg/ml

Bei einer Konzentration von 500 pg/mL ist bei noch mehr Analyten ein Fluoreszenzmaximum bei einer Laserleistung und Verstärkung von 100% erreicht. Hier wird schon deutlich, dass durch die höhere Konzentration des Antigens auch eine deutlichere Fluoreszenzintensität gemessen werden kann.

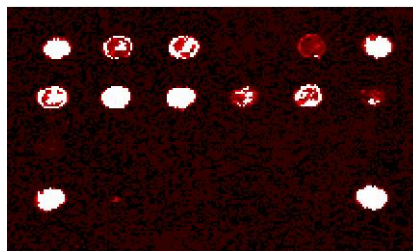


Abbildung 10 Scanergebnis bei einer Konzentration von 500pg/ml

Bei einer Konzentration von 1ng/mL sind nun alle Analyten außer Interleukin-4, Interleukin-18 und Interleukin 20 im Fluoreszenzmaximum angelangt.

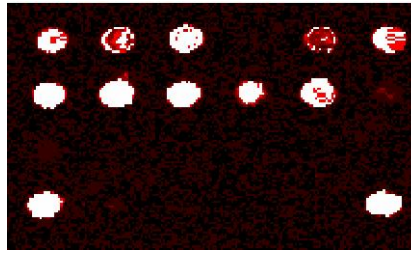
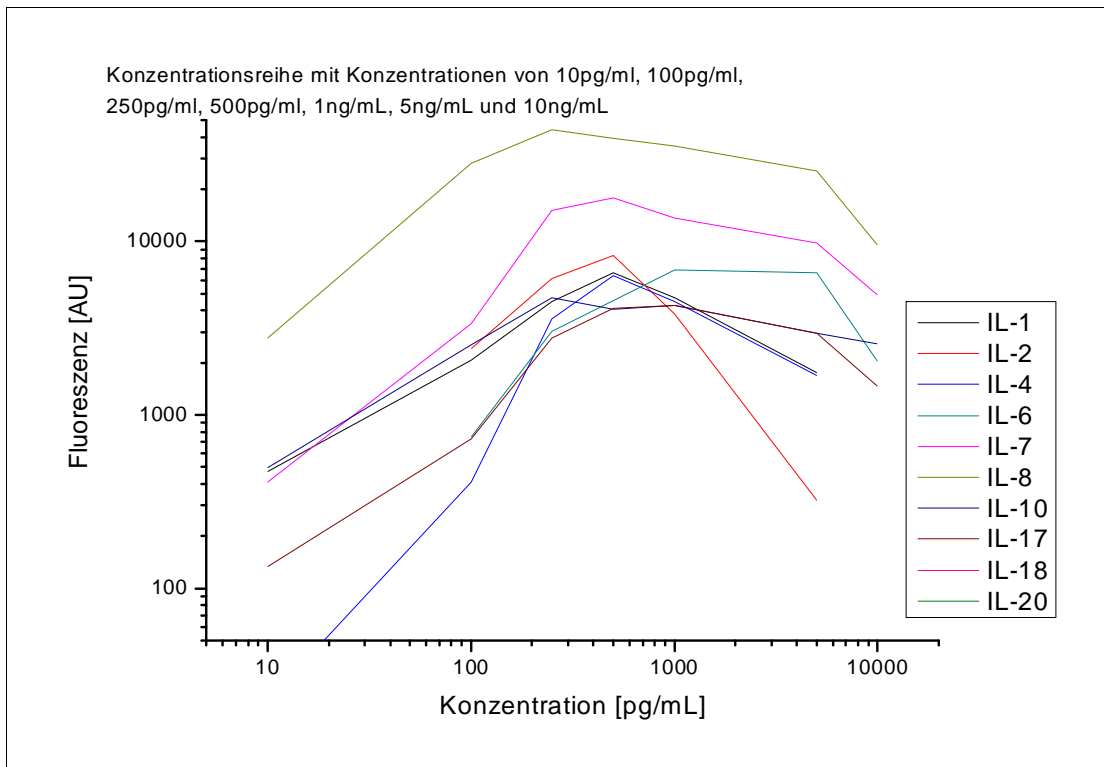


Abbildung 11 Scanergebnis bei einer Konzentration von 1ng/ml

4.1.5 Die Auswertung

Die oben gezeigten Bilder, die mit Hilfe des Scanners von der Oberfläche der Slides ausgelesen werden, können mit der Imagene-Software bearbeitet werden. Dadurch entstehen eine Menge an Rohdaten, die mittels Makros ausgewertet werden. Diese Makros wurden mit Excel angefertigt. Für die Mittelwerte und Standardabweichungen einzelner Interleukine werden je nach Fragestellung Diagramme mit Excel oder mit OriginPro7,5 gezeichnet. Die Konzentrationsreihe, die im folgenden Schaubild mit OriginPro7,5 verdeutlicht wurde, lässt die konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensitäten erkennen und könnte somit zur Bestimmung des Interleukingehaltes in unbekanntem Serumproben herangezogen werden.



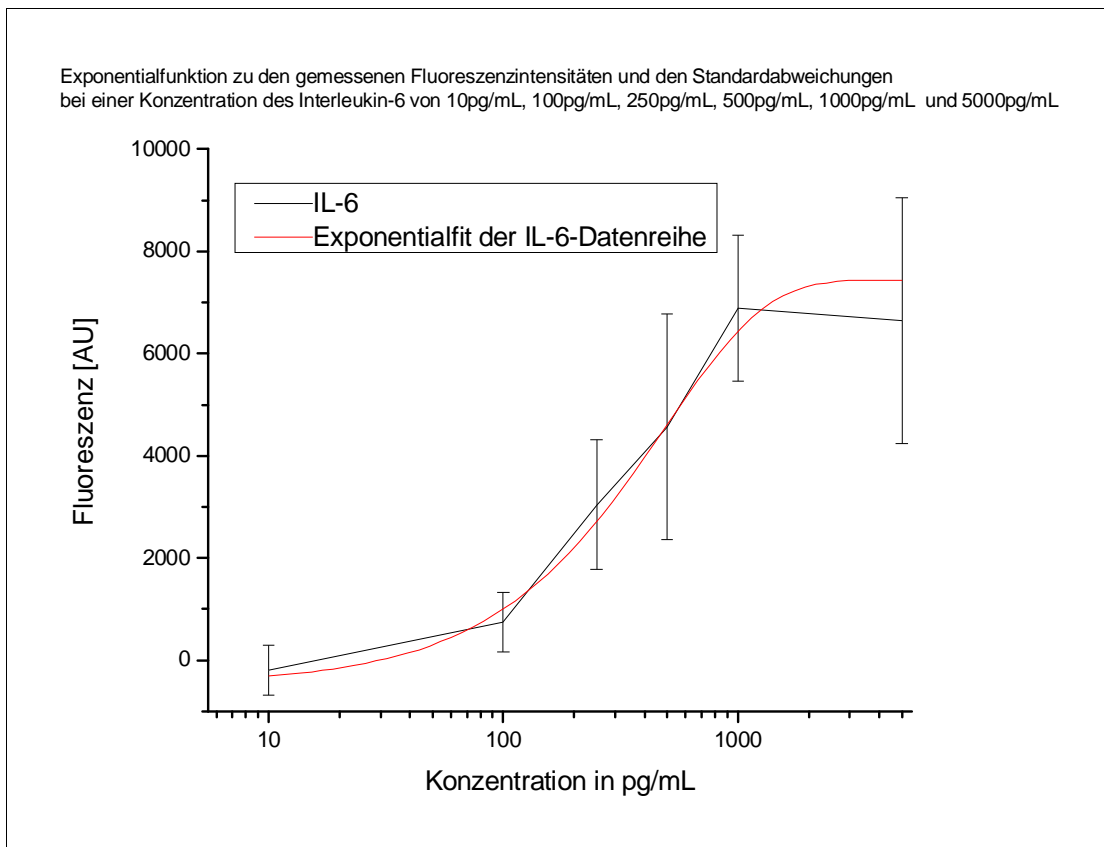
Kurvendiagramm 1 Konzentrationsreihe der zehn zunächst gemessenen Interleukine

Der Abfall der Kurve bei einer Konzentration von ca. 1000pg/mL lässt sich durch die Absättigung des monoklonalen Antikörpers bei der Bindung des Antigens erklären. Sobald die Analytkonzentration zu hoch ist, können alle Antikörper-Bindungsstellen belegt sein und zusätzliche Analyt-Moleküle werden nicht mehr im Rahmen der Bindungskurve ermittelt. Es kommt zu falsch-niedrigen Messwerten, die als Hook-Effekt bezeichnet werden.

Gute konzentrationsabhängige Ergebnisse sind im Bereich von 10pg/mL bis 1000pg/mL zu verzeichnen.

4.1.6 Die Anwendung beim Vermessen von Serumproben

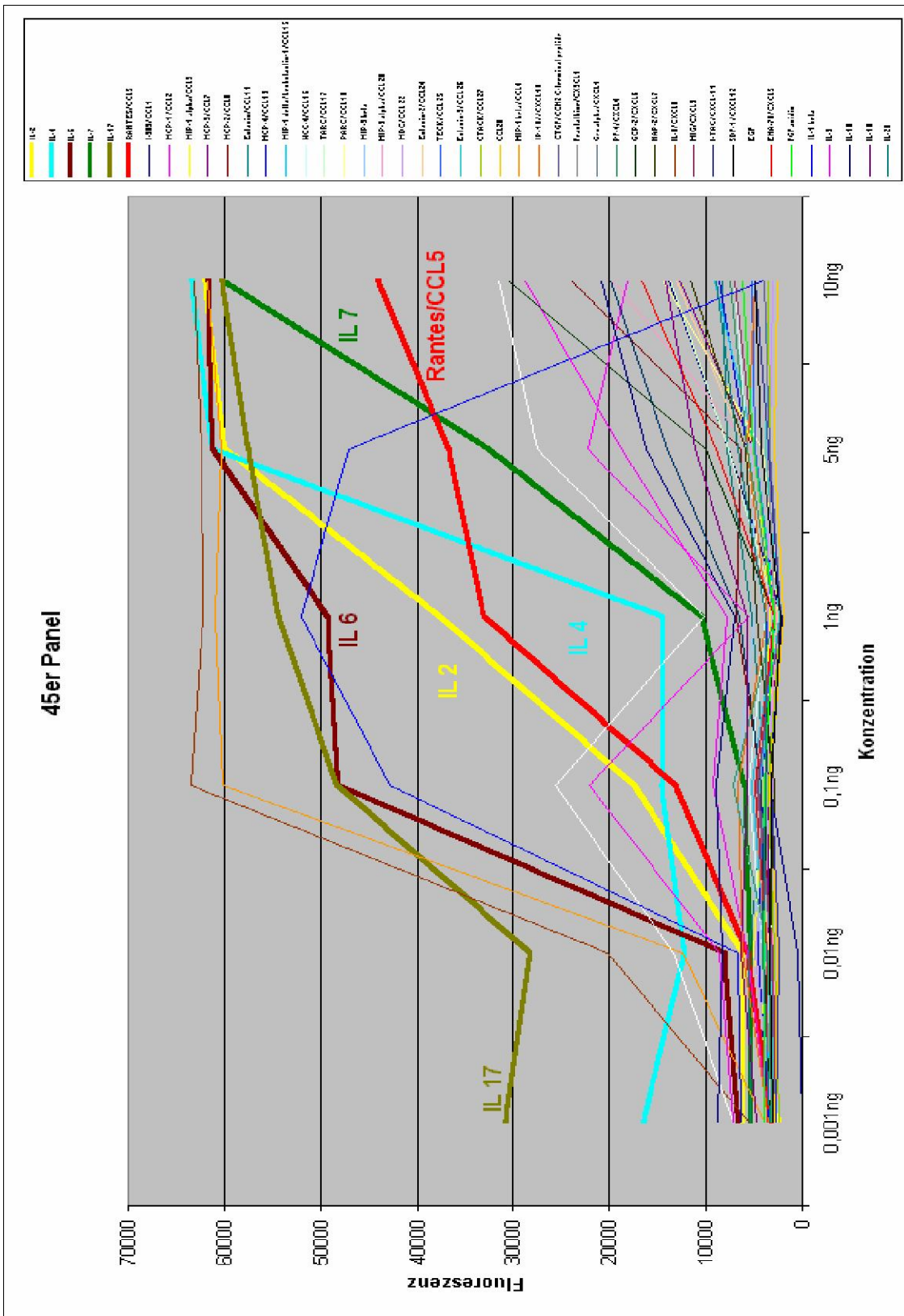
Durch die erreichte Konzentrationsreihe kann für jedes einzelne Interleukin mit Hilfe der Mittelwerte und Standardabweichungen eine Exponentialfunktion mit OriginPro7,5 erstellt werden. Diese ermöglicht beim Vermessen von Serumproben die genaue Bestimmung der Konzentration eines bestimmten Interleukins innerhalb der vorhandenen Probe. Die enthaltene Konzentration kann direkt unter Zuhilfenahme einer solchen Funktion, wie sie unten für IL-6 angefertigt wurde, anhand der Fluoreszenzergebnisse abgelesen werden.



Kurvendiagramm 2 Kalibrationsgerade für IL-6

4.1.7 45er Panel

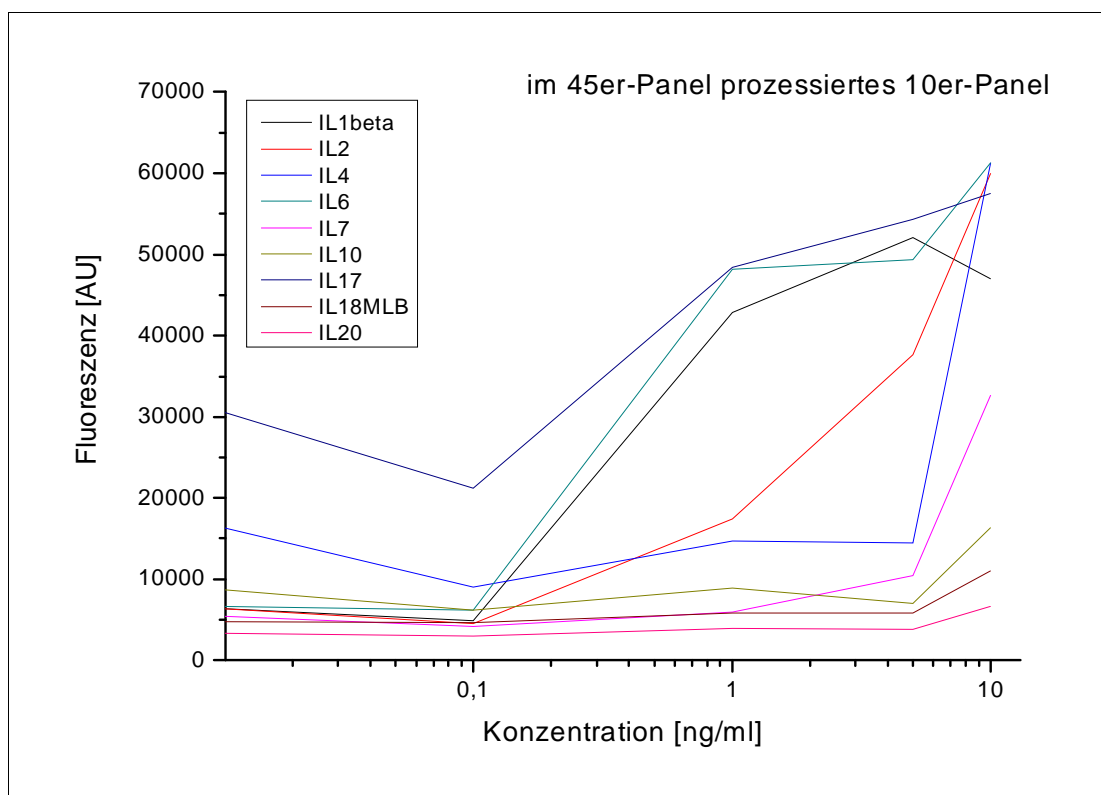
Bei der Entwicklung eines Microarray-Assays besteht die zentrale Frage, welche Analyten überhaupt verwendet werden sollen und wie viele gleichzeitig vermessen werden können. Nach den ersten Versuchen mit 10 Interleukinen zeichnen sich die folgenden Versuchsreihen durch das Prozessieren von 45 Analyten gleichzeitig auf einem Slide aus. Die Antigenkonzentrationen liegen bei 0,001ng/ml, 0,01ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml und 10 ng/ml. Als Puffer wird 0,1 % BSA in PBS verwendet. Bei der Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung der Kalibrationsfunktionen ist allerdings bei einer Anzahl der Analyte keine wesentliche Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration zu verzeichnen. Es musste deshalb anhand der Microarray-Assay-Versuche und anhand darauffolgender SPR-Messungen, die im Kapitel 4.2 beschrieben werden, eine Auswahl geeigneter Zytokine für das vorliegende Microarray-Format getroffen werden. Letztendlich handelt es sich um die Interleukine 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 17, 18 und 20. Diese wurden unter anderem anhand der nachfolgenden Daten aus dem 45-er Panel ausgewählt. Alle 45 Zytokine wurden gemeinsam prozessiert.



Kurvendiagramm 3 Konzentrationsreihe 45er Panel

Anhand des Kurvendiagramms 3 ist lediglich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität für IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-17 und RANTES CCL-5 zu verzeichnen. Die Interleukine 1 beta, 10, 18 und 20, die für das 10er-Panel ausgewählt wurden, verzeichnen im 45er-Panel bei gleichzeitiger Hinzugabe der weiteren Antikörper keine detektierbare Fluoreszenz.

CCL-2 und CCL-8, CCL-17, CCL-18, CCL-20, CCL-22 und CCL-24 weisen erst bei Konzentrationen über 5 ng/ml eine Zunahme des Fluoreszenzsignals auf. CCL-4 und CXCL-8 zeigen extreme anfängliche Signalsteigerungen. Die anderen hier aufgeführten Interleukine zeigen nur geringfügige konzentrationsabhängige Interaktionen, für EGF und IL-3 ergeben sich keine Korrelationen.



Kurvendiagramm 4 Interleukine des 10er Panels

In dem Kurvendiagramm 4 sind nochmals diejenigen 10 Interleukine aufgeführt, die nicht alle, sofern sie mit 35 anderen Interleukinen gleichzeitig auf einem

Assay prozessiert werden, eine konzentrationsabhängige Anbindung zeigen. Lediglich bei der Untersuchung dieser 10 Interleukine auf einem Slide erfolgt eine konzentrationsabhängige Anbindung wie im Kapitel 4.1.5 durch das Kurvendiagramm 1 bereits ersichtlich wurde.

4.2 SPR-Messungen

Aufgrund der teilweise unzureichenden Ergebnisse bei der gleichzeitigen Detektion von 45 Antigenen wird in verschiedenen Antikörper-Sandwich-Assays die Bindungsfähigkeit der Einzelkomponenten mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) untersucht.

Um Aussagen über die allgemeine Bindungsfähigkeit machen zu können, werden durch ein standardisiertes Messprotokoll die einzelnen Messungen der verschiedenen Analyten untereinander verglichen und somit bereits gewonnene Erkenntnisse aus verschiedenen Methoden (ELISA, div. Assayformate im Microarray) verglichen. Der Vorteil der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) liegt in ihrem sogenannten direkt-optischen Verfahren, das markierungsfreie und zeitaufgelöste Messungen möglich macht. Jeder Schritt ist einzeln nachzuvollziehen, wohingegen im enzymgebundenen Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay) und im Microarray-Assay nur ein Wert am Ende der Inkubationsreihe generiert wird.

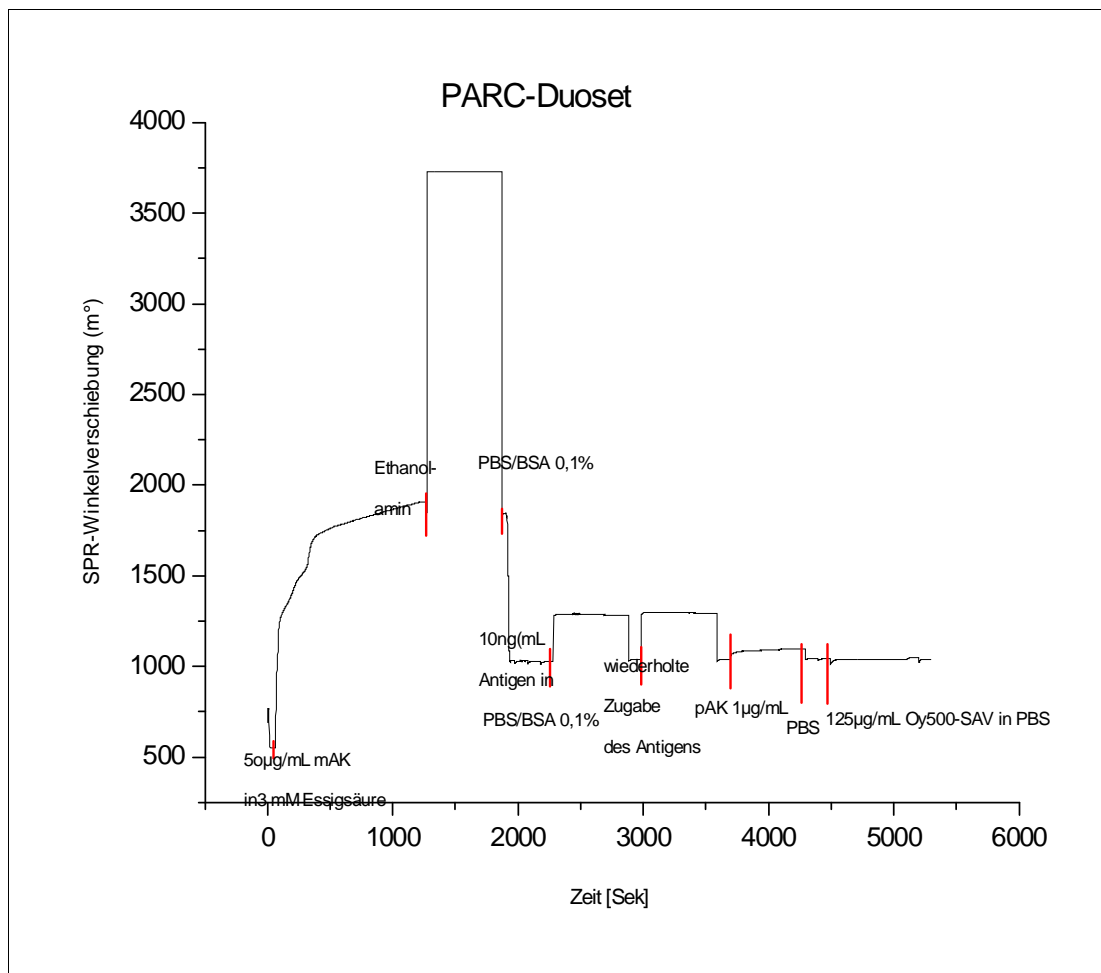
Exemplarisch wird das von RnD angebotene DuoSet des Chemokins CCL-18/ PARC mit einem eigens zusammengestellten aus einzeln gelieferten Antikörper- und Antigenkomponenten bestehenden System verglichen. Hierfür wird das zuvor beschriebene SPR-System angewendet. Die im Microarray-Assay-Format erhaltenen Signale sollen über das Bindungsverhalten im SPR, das die Bindungen in Echtzeit wiedergibt, verifiziert werden. Besonderes Augenmerk gilt der Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers an die HCX-Oberfläche, der Bindung des Antigens an den immobilisierten monoklonalen Antikörper und der

Anbindung des biotinylierten Detektorantikörpers an das zuvor gebundene Antigen sowie die folgende Assoziation mit Streptavidin FITC. Durch die SPR-Bindungsanalyse des im Duoset gelieferten Chemokins PARC, die in Darstellung 8 zu sehen ist, wird zunächst die Antikörper-Antigen-Reaktion quantifiziert. In den darauffolgenden Abbildungen 9 und 10 wird im Besonderen auf die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers an die Chipoberfläche eingegangen. Ohne ausreichende Immobilisierung wäre keinerlei Bindung des Antigens detektierbar.

Die darauffolgenden SPR-Messungen (Darstellungen 11 und 12) werden erneut das Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers zeigen. Dieses wird im HCX-PARC-Assay PBS/BSA 0,1% durch die zuvor durchgeführte Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers verbessert. Außerdem geben die Abbildungen Aufschluss über eine mögliche Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers.

4.2.1 Bindungsverhalten des Chemokins CCL-18/PARC

Im Folgenden wird die SPR-Bindungsanalyse der verschiedenen Komponenten des Sandwich-Assays erläutert (Darstellung 8).



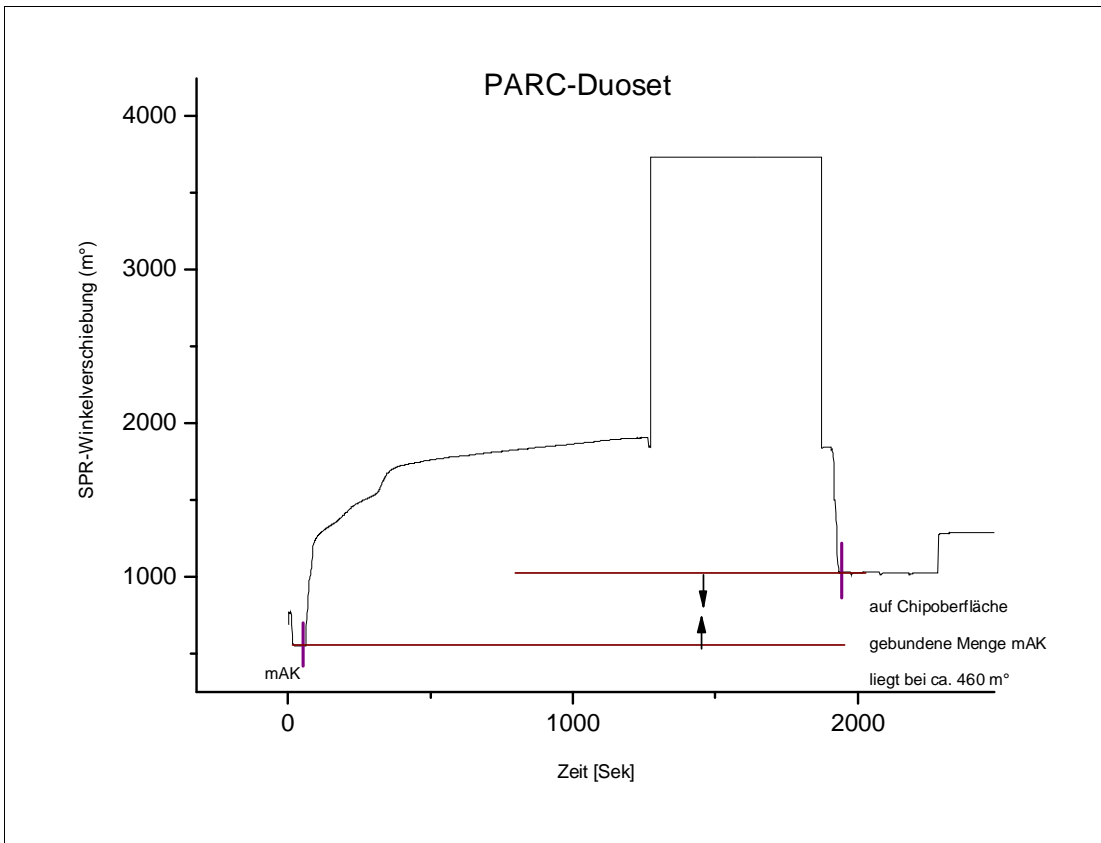
Darstellung 8 SPR-Messung von PARC im Duoset

Die mit NHS aktivierte Oberfläche wird, wie zuvor in Kapitel 3.5.5.2 beschrieben, mit 5 mM Essigsäurepuffer gespült. Für die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers werden 2,5 µl einer 1 mg/mL Antikörper-Lösung mit 50 µl 5 mM

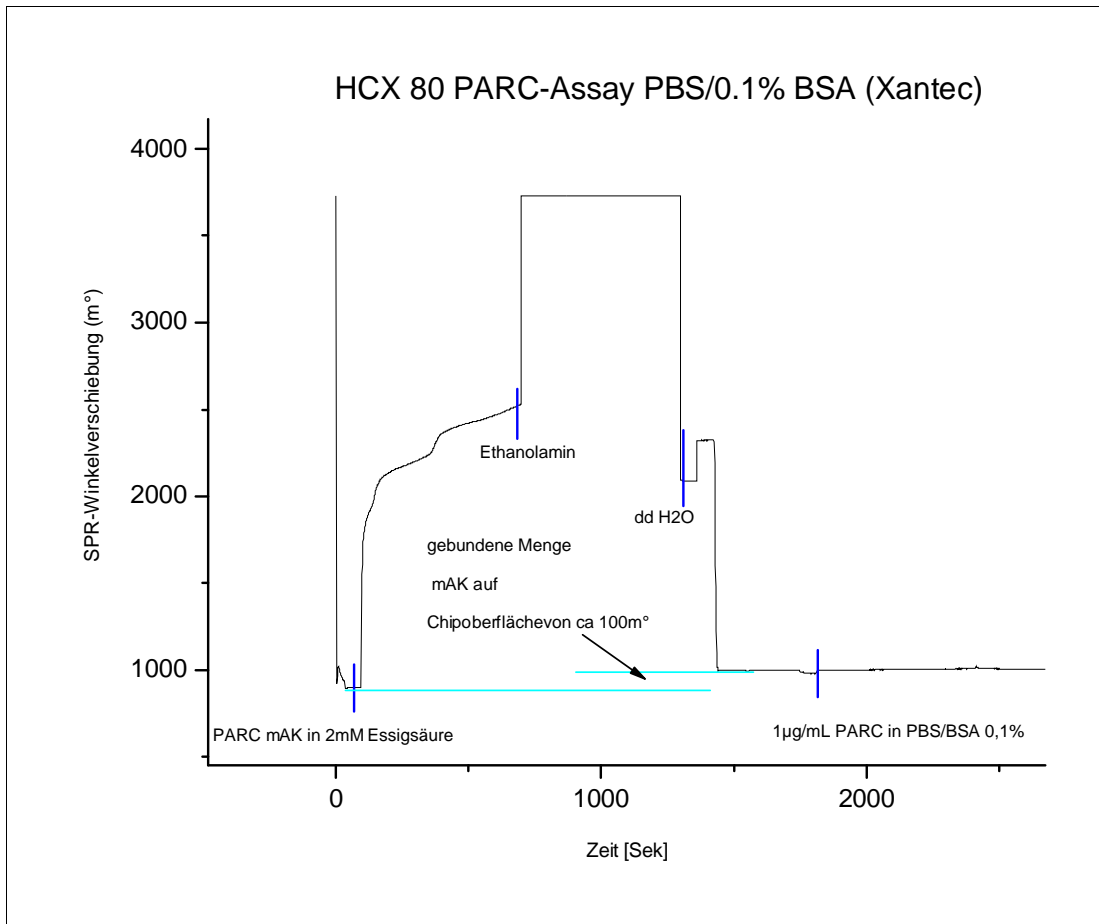
Acetatpuffer pH5 versetzt, so dass eine Konzentration des Antikörpers von 50 µg/mL erreicht wird. Der monoklonale Antikörper wird auf die Chipoberfläche gegeben. Im darauffolgenden Schritt wird der Chip mit Ethanolamin geblockt, damit die verbliebenen aktiven Gruppen, die keinen Antikörper gebunden haben, auf der Chipoberfläche reagieren. Es erfolgt nun ein Pufferwechsel in PBS/BSA 0,1% und die Aufnahme einer neuen Basislinie. Das entsprechende Antigen wird daraufhin in einer Konzentration von 1ng/mL hinzugegeben. Da bei Zugabe des Antigens die Basislinie nur geringfügig steigt, wird erneut mit dem Antigen inkubiert. Auch dieses Mal ist nur eine schwache Bindung erkennbar, was allerdings im Vergleich zu dem Kurvenverlauf nach Zugabe des monoklonalen Antikörpers durch die geringere Masse des Analyten im Gegensatz zum Antikörper zu erklären ist. Nach wiederholter Schaffung einer Basislinie durch den Puffer wird der biotinylierte polyklonale Antikörper hinzugegeben, der eine Konzentration von 1 µg/mL aufweist. Um im Anschluss daran die Bindung sichtbar zu machen, wird mit dem Oy500-SAV-Konjugat inkubiert. Es konnte weder eine Bindung des Antigens noch konsequenterweise eine Anbindung des Detektorantikörpers beobachtet werden, was daraufhin deutet, dass die Affinität des monoklonalen Antikörpers gegenüber dem Antigen schlecht ist.

4.2.2 Vergleich des Bindungsverhaltens zweier monoklonaler Anti-CCL18/PARC-Antikörper

Ein Vergleich des im Duoset verwendeten monoklonalen Antikörpers (Darstellung 9) zeigt eine bessere Anbindung als der in 0,1% BSA in PBS gelöste monoklonale Antikörper Anti-human Parc/CCL18Ab (Darstellung 10). Im Duoset haben 360 m° des monoklonalen Antikörpers mehr gebunden als im HCX-PARC-Assay PBS/BSA 0,1%. Es wurde versucht, diese Diskrepanz durch die Dialyse des Antikörpers zu eliminieren. Zunächst werden im Folgenden die Sensorgramme gezeigt.



Darstellung 9 Anbindung des monoklonalen Antikörpers des Duosets
CCL18/PARC

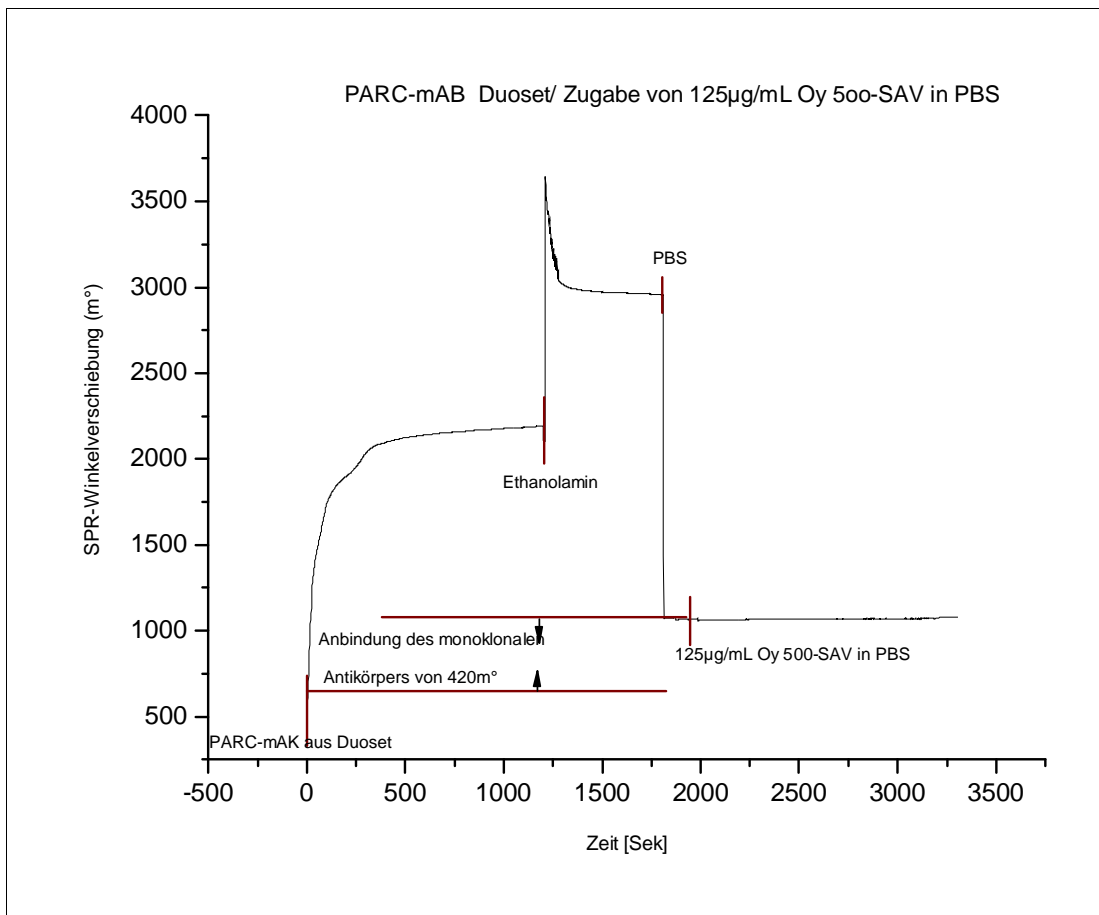


Darstellung 10 Anbindung des monoklonalen Antikörpers CCL18/PARC im HCX-PARC-Assay in 0,1% BSA in PBS

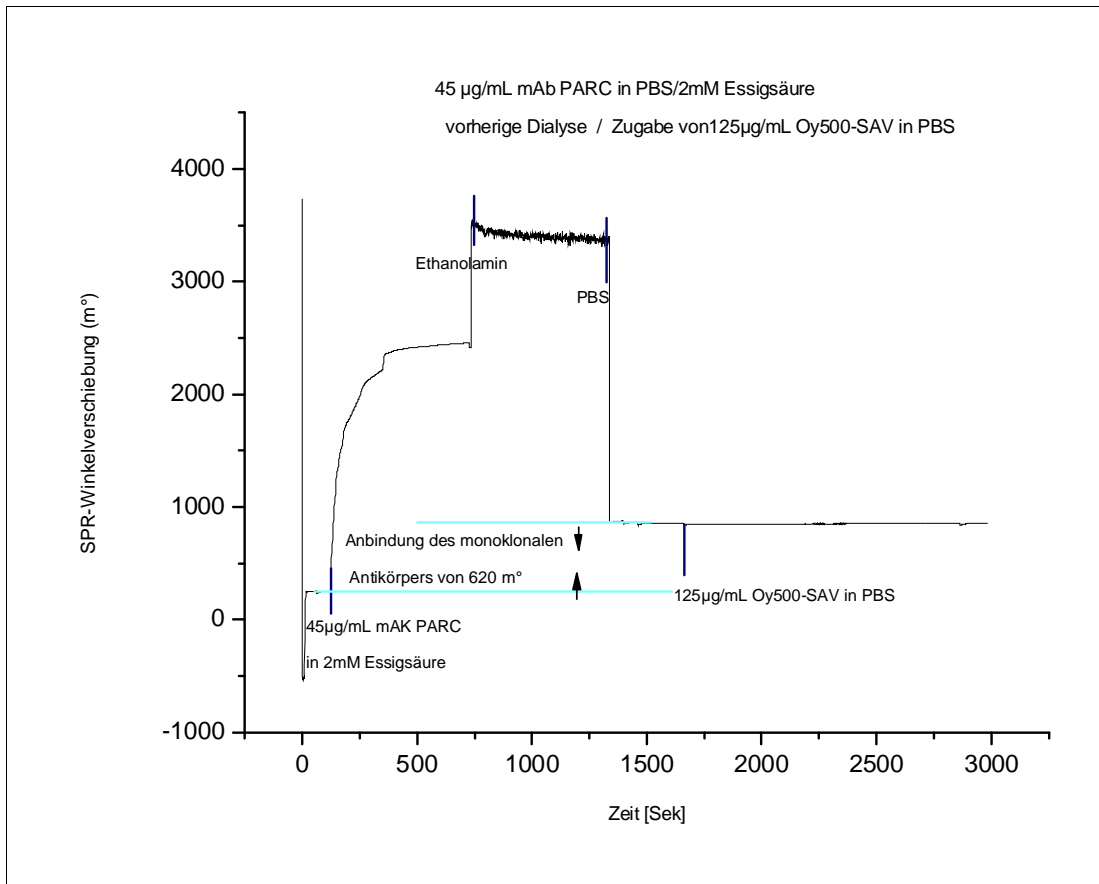
4.2.3 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers nach erfolgter Dialyse und Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers

Zusätzlich zu den Testungen in Kapitel 4.2.2 wurde überprüft, ob die verwendeten monoklonalen Antikörper biotinyliert vorliegen. Um den monoklonalen Antikörper, der in PBS/BSA 0,1% gelöst wurde, auf die gleiche Bindungskapazität zu bringen, die im Duoset erreicht wurde, wird dieser zuvor dialysiert und das Bindungsverhalten wird erneut zu der Anbindung des

monoklonalen Antikörpers, der im Duoset verwendet wird, in Bezug gesetzt. Folgende Sensorgramme werden beobachtet. In beiden Fällen kann bei Beaufschlagung mit SAV-Oyster-Konjugat keine Anbindung beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Antikörper nicht biotinyliert sind.



Darstellung 11 Anbindung des monoklonalen Antikörpers im Duoset und Zugabe von Oy-500-SAV in PBS



Darstellung 12 Anbindung des monoklonalen Antikörpers im HcX-PARC-Assay PBS/BSA 0,1% und Zugabe von Oy-500-SAV in PBS

Durch die Dialyse des monoklonalen Antikörpers CCL18/PARC des eigenen Systems konnte eine bessere Anbindung erzielt werden (Darstellung 12) als mit dem im Duoset verwendeten monoklonalen Antikörper.

4.2.4 SPR-Messung von IL-20

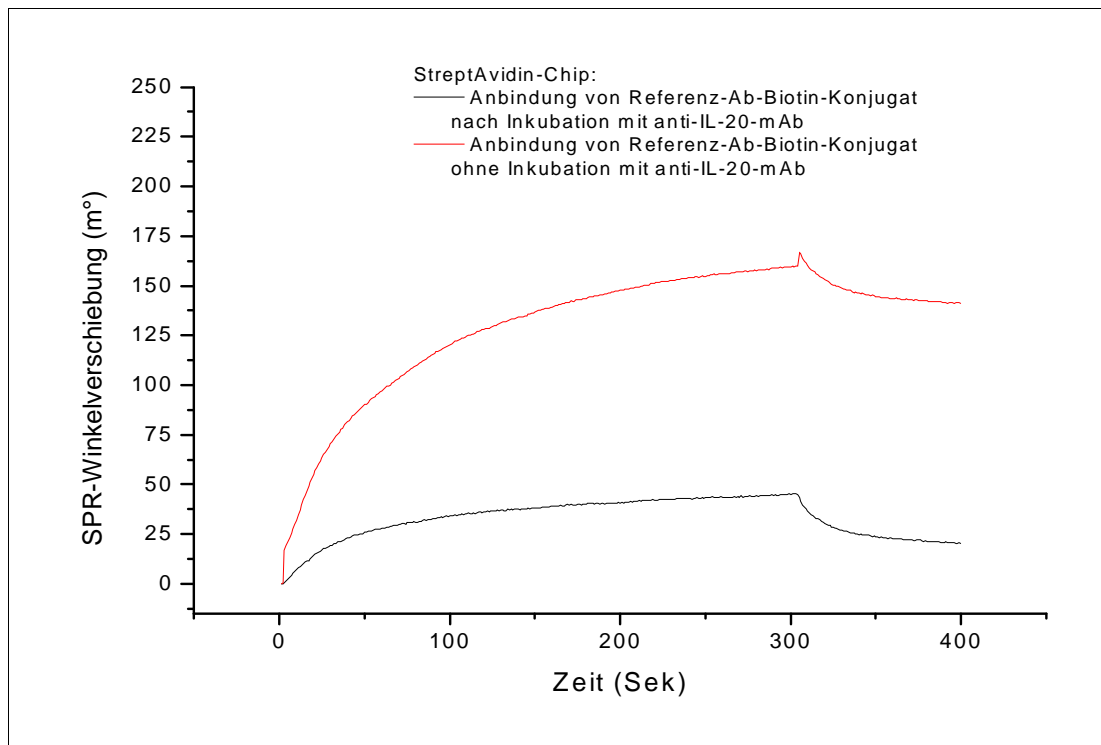
Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) kann Fehler erkennen, die sich schlecht im Microarray-Immunoassay nachweisen lassen. Es handelt sich nämlich um eine labelfreie Echtzeitmethode, die die Analyse jedes einzelnen Schrittes ermöglicht. Aus diesem Grunde wurde Interleukin-20 hiermit untersucht. In der Entwicklung des Zytokinchips sind direkt nach dem Spotten und bei Negativkontrollen Fluoreszenzintensitäten für Interleukin-20 beobachtet worden, die anhand der Eigenfluoreszenz des Antikörpers normalerweise nicht hätten auftreten dürfen (vgl. Kapitel 4.1.1.2). Es wird vermutet, dass diese Antikörperpräparation erheblich kontaminiert war, jedoch lässt sich dieses im Microarrayformat nicht prüfen. Eine weitere Beobachtung ist, dass auch ohne Zugabe von Antigen und ohne Zugabe des Detektorantikörpers nach Inkubation mit SAV-Oyster-Konjugat eine erhebliche Fluoreszenz der Anti-IL20-monoklonalen Antikörper-Spots gemessen wurde. Dies lässt sich nur durch eine Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers erklären.

Da ein SPR-Test auf Biotinylierung (Analog zum vorigen Kapitel 4.2.3) ein negatives Ergebnis brachte, wurde vermutet, dass der Antikörper auf dem Chip während des Spotprozesses biotinyliert wurde. Eine derartige Reaktion kann durch sogenannte Transesterifizierung aktiver NHS-Gruppen von der aktivierten Hydrogeloberfläche zu kontaminierendem freiem Biotin erfolgen und würde in der Folge zu einer Biotinylierung des gespotteten monoklonalen Antikörpers führen. Eine derartige Migration der NHS-Gruppen wurde in der Vergangenheit bei anderen Systemen bereits beobachtet.

Eine Inkubation mit polyklonalem gelabelten Antikörper ohne die vorherige Zugabe von Antigen lässt deshalb eine Prüfung auf Kontamination dieses Interleukins mit Biotin zu. Die Messung erfolgt in Tris-Puffer+Zucker+Lysin. Streptavidin ist ein Protein, das eine Affinität zu Biotin besitzt. Unspezifische Bindungen werden beim Streptavidin nicht auftauchen, da es nicht glycolysiert ist. Die Dissoziationskonstante beträgt $K=10^{-15M}$, was eine der höchsten

biologischen Bindungskonstanten darstellt. Streptavidin eignet sich aus diesem Grund gut für viele molekularbiologische Experimente [68].

Der Streptavidin-Chip wird mit einem biotinylierten Nachweis-Antikörper, dem Rabbit-anti-goat-rat, inkubiert. Dieser muss aufgrund der Affinität des Streptavidins zu Biotin auf der Chipoberfläche binden und zeigt einen sofort sichtbaren Signalanstieg, weil der Brechungsindex durch die Bindung erhöht wird. Auf einer anderen Stelle des Chips wird zunächst mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert. Sofern dieser freies Biotin enthält, sollte er das Streptavidin auf der Chipoberfläche absättigen. Im darauffolgenden Schritt wird wiederum mit dem biotinylierten Nachweis-Antikörper, dem Rabbit-anti-goat-rat, inkubiert. Falls der monoklonale Antikörper Biotin enthält, sind die Bindungsstellen des Streptavidin-Chips bereits zum Teil abgesättigt, und der Rabbit-anti-goat-rat kann nur noch geringer binden als er ohne die zuvorige Beigabe des monoklonalen Antikörpers hätte binden können. Damit wäre der Nachweis erbracht, dass der monoklonale Antikörper biotinkontaminiert ist. Das Ergebnis ist der Darstellung 13 zu entnehmen.

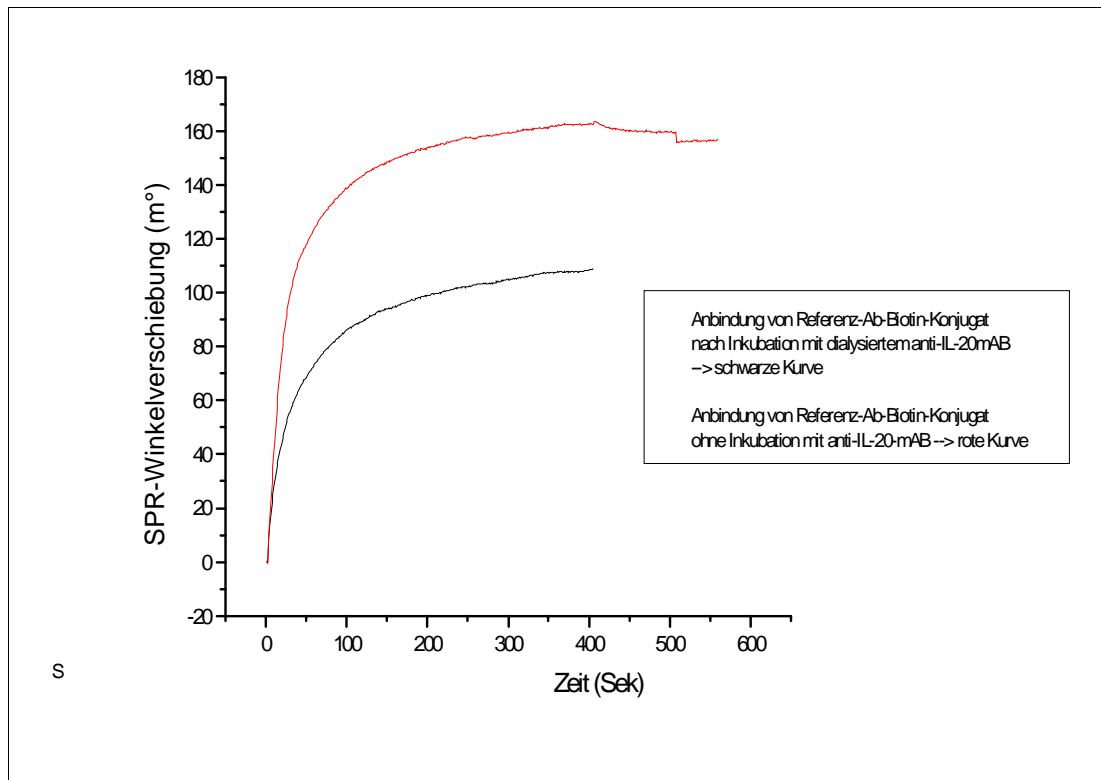


Darstellung 13 SPR-Messung zum Biotinnachweis in IL-20

Die schwarze Kurve zeigt, dass durch die Anbindung von freiem Biotin die darauffolgende Bindung von biotinyliertem Testprotein fast kaum noch möglich ist, weil das freie Biotin die meisten Bindungstaschen bereits besetzt hat. Normalerweise sollte das biotinylierte Testprotein ein Bindungsverhalten zeigen, wie es in der roten Kurve sichtbar wird. Dadurch dass dies nicht der Fall ist, ist der Nachweis erbracht, dass der in unserem Falle verwendete monoklonale Antikörper IL-20 biotinkontaminiert ist. Dieser monoklonale Antikörper würde also in unseren Experimenten wegen seiner Biotin-kontamination falsch positive Ergebnisse liefern, was natürlich vermieden werden sollte. Aus diesem Grund wird die Dialyse in Aktivkohle und PBS durchgeführt, wodurch eine Verringerung des Biotingehaltes, allerdings keine vollständige Entfernung des Biotins gelingt (Darstellung 14). Es muss also ein anderer Antikörper verwendet werden.

Biotinkontaminationen der gelieferten Antikörper sind durchaus möglich, wenn man bedenkt, dass Biotin in tierischen Geweben als Coenzym in vielen

Carboxylierungsreaktionen fungiert, in deren Verlauf es kovalent an einen Lysylrest des Carboxylierungsenzyms gebunden ist. Außerdem ist Biotin in fast allen Lebensmitteln enthalten.



Darstellung 14 SPR-Messung zum Biotinnachweis in IL-20 nach Dialyse

4.3 Verschiedene Puffersysteme

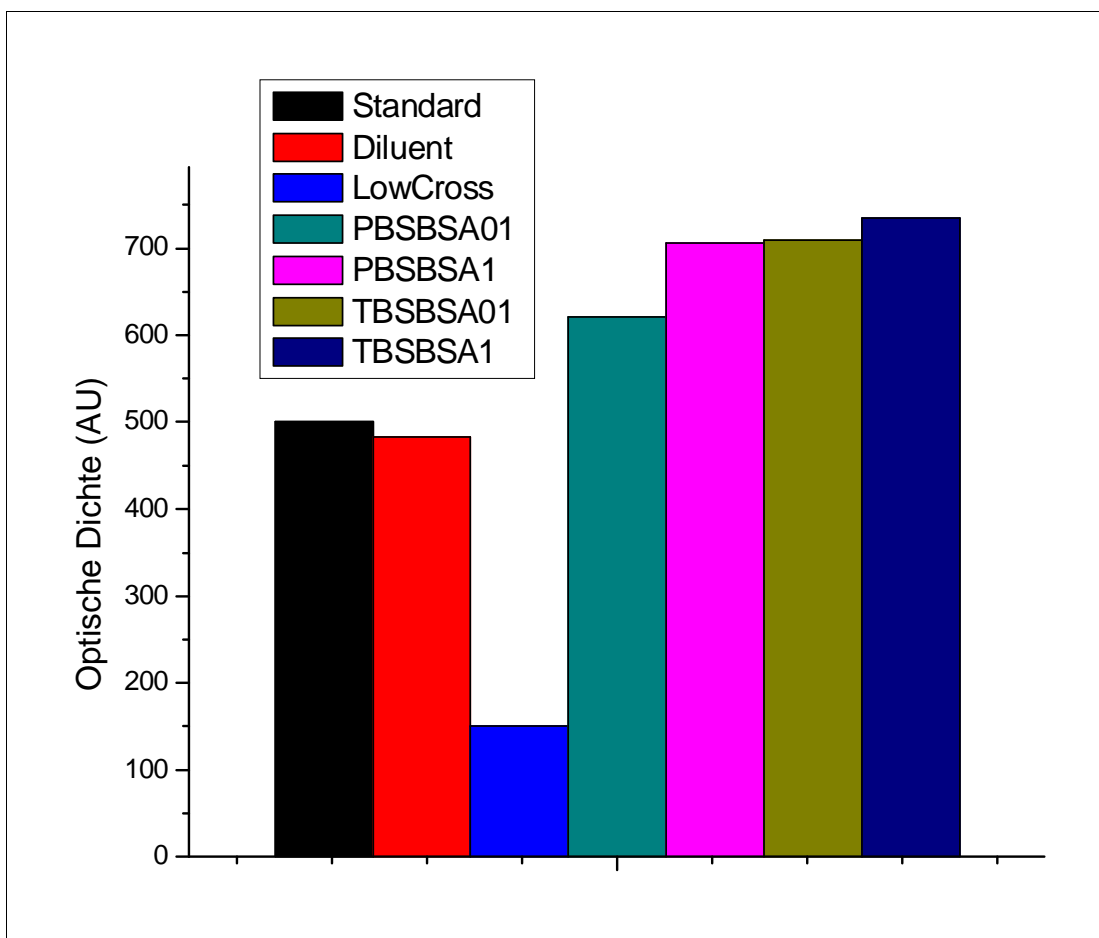
Bei der Inkubation der Antigene wurde, wie in Kapitel 4.1.2 bereits beschrieben, Diluent als Puffer verwendet. Dieser Puffer wurde aufgrund des Vergleiches verschiedener Puffersysteme im ELISA-Verfahren ausgewählt. Diese Vergleiche fanden mit dem Chemokin human CCL18/ PARC statt. Dieses Chemokin wird als DuoSet von der Firma RnD angeboten und innerhalb der Untersuchung zum einen genau nach Herstellerangaben im mitgelieferten

Diluent als Puffer prozessiert. Die anderen zu untersuchenden Puffer sind der Low-Cross-Puffer (Candor GmbH), der gezielt Kreuzreaktionen verhindern soll, sowie die Puffer 0,1% BSA in PBS, 1% BSA in PBS, 0,1% BSA in TBS und 1% BSA in TBS, die selber hergestellt wurden. In einer ersten Versuchsanordnung wird nur das Antigen in verschiedenen Konzentrationen in den zuvor genannten Puffern gelöst, der polyklonale Antikörper reagiert dabei im Diluent-Puffer. In einem zweiten Versuchsansatz werden sowohl das Antigen als auch der polyklonale Antikörper im jeweiligen zu untersuchenden Puffer gelöst. Die Vorgehensweise ist im Kapitel 3.5.4 beschrieben, wird allerdings anhand der Tabelle 11 nochmals verdeutlicht.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Diluent	Diluent	Diluent	Diluent	Low Cross	Low Cross	PBS/BSA 0,1%	PBS/BSA 0,1%
A	Blank	Blank	500Std	500Std	500Std	500Std	500Std	500Std
B	Standard 1000pg	Standard 1000pg	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL
C	Standard 500pg	Standard 500pg	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL
D	Standard 250pg	Standard 250pg	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL
			PBS/BSA 1%	PBS/BSA 1%	TBS/BSA 0,1%	TBS/BSA 0,1%	TBS/BSA 1%	TBS/BSA 1%
E	Standard 125pg	Standard 125pg	500Std	500Std	500Std	500Std	500Std	500Std
F	Standard 62,5pg	Standard 62,5pg	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL
G	Standard 31,25pg	Standard 31,25pg	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL
H	Standard 15,62pg	Standard 15,62pg	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL	100 pg/mL

Tabelle 11 Inkubationsschema im ELISA zur Pufferwahl

Im ersten Versuchsansatz, also bei der Verwendung der verschiedenen Puffer für den Antigeninkubationsschritt, wird für eine Konzentration von 500pg/mL im Standard eine optische Dichte von 0,847 erreicht. Derjenige Wert, der diesem Standard bei Einstellung der gleichen Konzentration am nächsten kommt, ist derjenige für den Diluent-Puffer. Vollständig abweichende Ergebnisse gibt es für den Low-Cross-Puffer, die Ergebnisse weichen nach unten hin ab. Die anderen Puffer zeigen bei gleicher Konzentration erhöhte Messungen der optischen Dichte, was im folgenden Schaubild dargestellt wird.

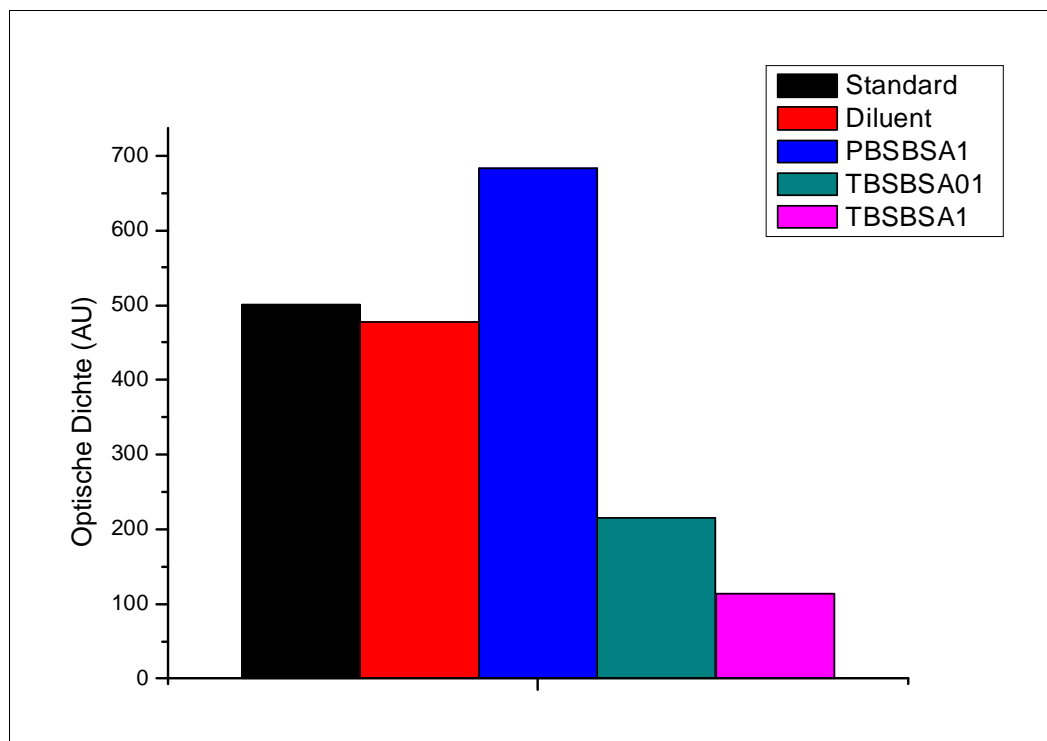


Balkendiagramm 5 Verschiedene Puffer bei der Inkubation des Antigens

Es wird deutlich, dass unter Verwendung des Diluent-Puffers auch genau die Menge Antigen, die in das System eingebracht wird, nachgewiesen werden kann. Die Bindung wird durch Zugabe des polyklonalen Antikörpers und durch

die Konjugation von SAV deutlich. Bei der Verwendung der anderen Puffer ist eine Abweichung der optischen Dichte nach oben ersichtlich. Dies könnte im Grunde auf eine erhöhte Empfindlichkeit der in diesen Puffern stattgefundenen Anbindungen resultieren. Da allerdings nicht bekannt ist, ob diese Bindungen unspezifisch waren, wurde auf Diluent zurückgegriffen, da dieser dem Standard des RND-Systems am nächsten kommt.

Die zweite Untersuchung zeigt ebenso, dass die Verwendung von Diluent sowohl bei der Inkubation des Antigens als auch dieses Mal bei der Inkubation des polyklonalen Antikörpers zu den Konzentrationsergebnissen führt, die annähernd auch im Standard anhand der optischen Dichte messbar sind. 1% BSA in PBS weist sehr hohe Fluoreszenzintensitäten auf. Da allerdings nicht bekannt ist, ob diese aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen entstanden sind, wird weiterhin mit Diluent gearbeitet.

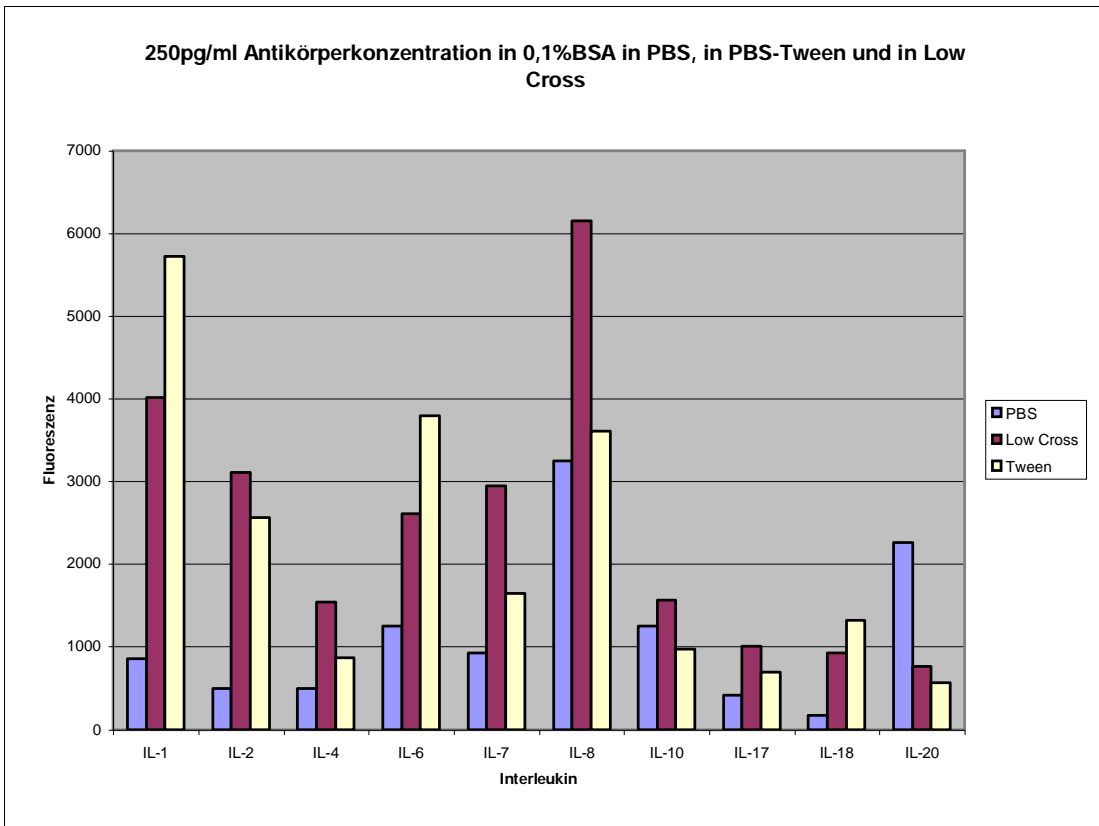


Balkendiagramm 6 Verschiedene Puffer bei der Inkubation des polyklonalen Antikörpers

4.3.1 Einflussnahme anderer Puffer auf die Scanergebnisse bei Negativkontrollen

In einer weiteren Untersuchung zur Pufferwahl soll die Einflussnahme unterschiedlicher Puffer auf die Fluoreszenzintensitäten bei Negativkontrollen eingeschätzt werden. Dazu entfällt im Microarray-Format bei der Erstellung der Kalibrationskurve für das 10-er Panel die Inkubation mit Antigenen. Es erfolgt lediglich die Inkubation der polyklonalen Antikörper. Die polyklonalen Antikörper sind zuvor in 1,5ml Diluent gelöst worden, haben bereits inkubiert und wurden zurückgewonnen, um für die vorliegende Untersuchung mit den Puffern 0,1% BSA in PBS, PBS/Tween und Low Cross auf 2ml aufgefüllt zu werden. Die bespotteten Slides werden mit diesen polyklonalen Antikörpern inkubiert. Es sollte keinerlei Intensitätserhöhung erkennbar sein, da aufgrund der nicht vorhandenen Menge Antigen kein polyklonaler Antikörper an die Oberfläche des Slides oder an den monoklonalen Antikörpern binden kann.

Der Puffer Diluent, der von RnD zur Anwendung des Microarray-Systems sowie des ELISAs vorgeschlagen wird, enthält laut Herstellerangaben PBS und BSA. Aus diesem Grunde entspricht das Ergebnis, dass der selber hergestellte Puffer 0,1% BSA in PBS die geringsten Fluoreszenzen bei den Negativkontrollen zulässt, den Erwartungen. Es ist demzufolge möglich auch PBS/BSA 0,1% für den Zytokinchip als Puffer zu benutzen, sofern man nicht den RnD-Puffer Diluent verwenden möchte, der wie bereits die ELISA-Messungen ergeben haben, die eindeutigsten Ergebnisse liefert. Der Low Cross Puffer und PBS/Tween sollten in diesem System keine Anwendung finden.



Balkendiagramm 7 Verschiedene Puffer bei Negativkontrollen

5 Diskussion

Protein- und Antikörper-Microarrays haben sich in jüngerer Zeit als eine wichtige und sensitive Methode der Proteinanalyse entwickelt [11;24;39;56;57;76;78;86;94;95;99;100]. Protein-Microarrays sind eine zukunftsweisende Technologie [27] und sollen bis zu tausend Proteine gleichzeitig untersuchen können [20;58]. Bei entsprechender Weiterentwicklung werden durch Protein-Microarrays Erkrankungen schon frühzeitig diagnostizierbar und im Verlauf besser beurteilbar [31]. Die Möglichkeit, geringste Unterschiede in der Menge von Proteinen und anderen Biomolekülen zu quantifizieren, ist von größter Wichtigkeit nicht nur für die Proteomforschung sondern auch für diagnostische Zwecke [22]. Die Vorteile der Protein-Microarrays liegen in der multiplexen Detektion einer Vielzahl an Analyten und in der Sensitivität im Picogramm-Bereich [52]. Auf Antikörpern beruhende Immunoassays sind die am weitesten verbreiteten Typen der diagnostischen Assays [5]. Sie haben das Potential, die Proteinexpression ganzheitlich zu erfassen [73] und dienen dazu, Proteininteraktionen untereinander darzustellen, um komplexe Zellprozesse und Gewebeveränderungen verstehen zu können. Dabei werden reproduzierbare, quantitative und sensitive Messungen spezifischer Analyte gewährleistet [30]. Bisher war es lediglich möglich, Proteine einzeln zu bestimmen. Das komplette Proteom, das aus über einer Millionen Proteinen besteht [61], konnte noch nicht entschlüsselt werden. Der zukünftigen Erreichung dieses Zieles dienen Proteinarrays [61], die überhaupt erst die Möglichkeit der Untersuchung vieler verschiedener Proteine gleichzeitig gewährleisten. Diese Proteinarrays haben sich im Laufe der Zeit bezüglich ihrer Sensitivität und Reproduzierbarkeit weiterentwickelt, indem beispielsweise der Prozess des Spottens sowie das

Pinsystem, die Oberflächenchemie und die Pufferzusammensetzung verbessert wurden [81].

Die Diskussion der Ergebnisse wird zunächst durch die Erläuterung der Verwendung des Sandwich-Immunoassay-Formates eingeleitet, wobei ein kurzer Überblick über die bisherigen Entwicklungen gegeben wird und sowohl positive als auch negative Einschätzungen bezüglich des Sandwich-Immunoassays dargestellt werden. Im darauffolgenden Teil wird die Auseinandersetzung mit spezifischen Problemen, die bei der Entwicklung eines Microarray-Immunoassays auftreten, aufgezeigt. Detaillierter wird in diesem Zusammenhang auf die Verwendung der Hydrogeloberfläche eingegangen und auf die bei der gleichzeitigen Verwendung sehr vieler Analyte auftretende Kreuzreaktivität. Überdies werden die Probleme der heterogenen Affinität und die Individualität der Analytpaare herausgestellt. Außerdem wird die Ursache der Verunreinigung monoklonaler Antikörper erwähnt und es werden die Lagerung der gespotteten Slides und die Detektion der Proteinbindung diskutiert sowie die Wiederverwendung bereits inkubierter polyklonaler Antikörper. Im letzten Teil soll die Nutzbarkeit des von uns entwickelten Immunoassays erläutert und die allgemeinen Errungenschaften der Microarrays für die Zukunft diskutiert werden.

5.1 Der Sandwich-Microarray-Immunoassay

Der Sandwich-Immunoassay dient der quantitativen Detektion von Proteinen. Dazu werden Fänger-Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert, an die die entsprechenden Proteine binden, wobei diese Bindung durch gelabelte Detektorantikörper visualisiert wird, die wie ein Sandwich an den gebundenen Analyten binden (Abb.1, Kap.2.2) [56]. Ein Sandwich-Microspot-Assay ist als miniaturisiertes Analog zum ELISA-System zu sehen [51]. Die Entwicklung des Sandwich-Immunoassays und seine Vorteile im Vergleich zu anderen Assays

werden in einem Review von Gavin MacBeath erläutert [56]. Dieser stellt die bisherigen Arbeiten zu Multianalyt-Immunoassays zusammen. Zu erwähnen wären hier die Entwicklungen von Silzel im Jahre 1998 [80], dem es laut MacBeath [56] gelang, den ersten Multianalyt-Microarray-Immunoassay im Sandwichformat herzustellen. Bei Silzel erfolgte das Spotten von monoklonalen Antikörpern gegen die vier menschlichen Immunglobuline auf einen Polystyrenfilm, die dann wiederum Untergruppen-spezifisches Erkennen des menschlichen Myelomproteins zeigten. Die Entwicklung wurde dahingehend fortgeführt, dass Moody et al. [69] Arrays mit sieben verschiedenen Antikörpern im Sandwichformat gegen Zytokine in denjenigen Mikrotiterplatten anfertigten, die ursprünglich im ELISA Verwendung fanden. Die meisten Antikörper-Arrays, die heute verwendet werden, basieren auf der ELISA-Sandwich-Technik [71]. Dabei gelang es der Gruppe von Moody in pg-Konzentrationsbereiche zu gelangen, in denen sich auch unsere Ergebnisse befinden. Auch Nielsen weist auf die Untersuchung multipler Proben durch multiplex Sandwich-ELISA-Assays hin, die mit Microarrays in den Wells von Multi-Well-Platten durchgeführt werden [70]. In Ausführungen von Mendoza [62] wird ebenfalls die Verwendung eines Sandwich-Assays beschrieben, der innerhalb einzelner Wells der ELISA-Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Allerdings ist hier lediglich die Vermessung geringer Antikörpermengen gleichzeitig möglich. Laut Kusnezow könnten die Gründe dafür die Überlappungen der Signale sein [46]. Aufgrund des nur geringen Bereiches, der innerhalb eines Wells zum Spotten zur Verfügung steht und aufgrund der hohen Signalstärke nah aneinander liegender Spots, könnte eine nicht mehr zuzuordnende Detektion stattfinden. Diese multiplexen ELISA-Sandwich-Assays entwickelten sich stetig weiter und Saviranta bezeichnet die Entwicklung des Antikörper-Microarrays im Sandwich-Format heutzutage sogar als den vielleicht „relevantesten ersten Schritt für die klinische Diagnostik“ [76]. Von Huang et al. wird die Entwicklung von handgespotteten Sandwich-Assays beschrieben [35]. Bei diesen gelingt die gleichzeitige Detektion von bis zu 24 verschiedenen Zytokinen im pg-

Konzentrationsbereich. Auch Schweitzer et al. arbeiten mit dem Sandwich-Assay-Format zur gleichzeitigen Detektion von 75 Antikörpern. Um eine Signalverstärkung zu erreichen und die Sensitivität des entwickelten Assays steigern zu können, bedient sich diese Forschungsgruppe der Rolling-Circle-Amplifizierung. Schweitzer et al. beschreiben den Sandwich-Assay als einfach, skalierbar und reproduzierbar [79]. Auch Kodadek stellt in seinem Artikel die überaus gute Durchführbarkeit eines Sandwich-Assays heraus [45]. Aus diesem Grund ist der Sandwich-Immunoassay auch gut einsetzbar für vergleichende Untersuchungen, die wie bei Knight [44] das Vermessen von Proteinen mittels ELISAs und Microarray-Immunoassays in Relation zueinander setzen. Diese Einschätzungen der einzelnen Forschungsgruppen lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Sandwich-Format in der Entwicklung des Microarray-Immunoassays eine gängige Methode ist, die laut Kodadek [45] und MacBeath [56] als die am besten durchzuführende eingeschätzt wird. Durch die Anlehnung des Sandwich-Immunoassays an den Aufbau des ELISAs, der eine etablierte Technik für die quantitative Messung von Proteinen [69] darstellt, scheint die Gewährleistung der überaus guten Qualität eines Sandwich-Immunoassays schon alleine durch das derartig lange Bestehen des ELISAs gegeben zu sein, der bereits im Jahre 1971 von Engvall und Perlman entwickelt wurde [21]. Aus diesem Grund erscheint der Sandwich-Immunoassay für andere Forschungsgruppen [4;98] und genauso auch für uns als Assay der Wahl für die Versuchsansätze im Microarray-Assay-Format.

5.2 Probleme bei der Entwicklung des Microarray-Immunoassays

Bei der Etablierung eines neuen, für die klinische Anwendung einsetzbaren Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays ergeben sich verschiedene Hindernisse, die es zu überwinden gilt. Die Entwicklung eines antikörperbasierten Microarray-Immunoassays lässt den Forscher auf viele technische Probleme stoßen [72]. Aber die Entwicklung der Multianalyt-Immunoassay-Technologie kann von vitaler Bedeutung sein und die Etablierung solcher Assays ist lediglich eine Frage der Zeit [15]. Sowohl die schnelle und effektive Immobilisierung als auch die Detektion stellen sich als große Herausforderungen für Proteomikforscher [82] dar. So gibt es eine Anzahl an Voraussetzungen, die erfüllt werden sollten. Um einen bestmöglichen Protein- und Antikörper-Microarray zu entwickeln beschreibt Angenendt [2] drei Schlüsselkriterien. Erstens: Optimale Immobilisierungsbedingungen und hohe Bindungskapazitäten. Zweitens: Eine schnelle nicht zu teure Produktion mit hoher Qualität. Diese wird von Copeland et al. dem Array-system zugesprochen [8]. Drittens: Hohe Fluoreszenzintensitäten mit geringer Eigenfluoreszenz. Im Handling mit den Antikörpern und Antigenen sind weiterhin einfache Präparationstechniken wichtig und das System sollte reproduzierbar sein. Die Umgebung der Proteine sollte selbige stabilisieren, weil die Antikörper, die auf eine Oberfläche gebracht werden, leicht denaturieren können [61]. Was die Denaturierungstendenz angeht, unterstreicht auch Lesacherre, dass Proteine dazu neigen, auf Glasslides zu denaturieren [50]. Dies wird untermauert durch die Aussage Butlers, dass die meisten auf Polystyren oder Silikon adsorbierten Proteine teilweise oder größtenteils denaturiert sind [6]. Es ist bekannt, dass über 90% der Proteine auf Kunststoff oder Glas (Nunc, Produktinformation) denaturieren.

Zu weiteren Entwicklungsproblemen zählen beispielsweise - um auf die Entwicklung unseres für die klinische Anwendung einsetzbaren Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays zurückzukommen - dass in den durch-

geführten Versuchen bei einigen Analyten eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität nicht erkennbar war, während wiederum der Großteil der anderen Analyte erwartungsgemäß reagierte. In den Fällen, in denen es zu unerwarteten Ergebnissen kam, müssen die verwendeten Antikörper genauer untersucht werden, um ihre Funktionstüchtigkeit beurteilen zu können und den Grund für das Fehlverhalten herauszufinden. Dies erfolgte beispielsweise mit dem ELISA, welchen Huang [33] auch anwandte, und dem SPR-System, also mit etablierten Referenzmethoden. In diesen Messungen konnte die Bindungsweise der Zytokine überprüft und Unregelmäßigkeiten aufgedeckt werden. Zum einen wurde im ELISA-Verfahren an den Microarray-Sandwich-Assay angelehnt, indem allerdings im Gegensatz zum Assaysystem jeder Analyt nur einzeln vermessen werden konnte. Zum anderen wurde in der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie-Messung die Bindungsfähigkeit eines einzelnen Analyt-Paares in Echtzeit wiedergegeben, was einen detaillierten Überblick über das Bindungsverhalten jedes einzelnen Schrittes des Sandwich-Assays eröffnete. Aufgrund dieser Verfahren, mit deren Hilfe die Fehlersuche durchgeführt wurde, sind nur noch diejenigen Interleukine in die konzentrationsabhängigen Versuche integriert worden, die ein normales Bindungspotential aufwiesen. Die Versuche wurden aufgrund dessen mit einem 10er-Panel durchgeführt, dessen Interleukine ein Bindungsverhalten im Picogramm-Bereich zeigten. Verbliebene Unregelmäßigkeiten wurden durch weitere Messungen nachvollzogen und eliminiert. Im Folgenden werden einzelne Voraussetzungen für einen funktionierenden Immunoassay diskutiert, wobei Errungenschaften einiger zuvor beschriebener Zytokin-chips zu unseren Entwicklungen in Bezug gesetzt werden.

5.2.1 Slideoberfläche

Die Oberflächenbeschaffenheit des Slides, auf dem die Proteine binden sollen, ist von großer Bedeutung. Die Proteine sollen ihre biologische Funktion beibehalten und müssen in ihrer nativen Struktur immobilisiert werden [10]. In unserem Microarray-Immunoassay findet eine hydrogelartige Oberfläche Anwendung, die NHS-aktiviert ist. In Angenendts Abhandlung werden elf verschiedene Oberflächen verglichen, Hydrogel-beschichtete mit unbeschichteten Slides, wobei in der Studie gezeigt werden konnte, dass kein Microarray-Coating alle Vorteile in sich vereint [2]. Silanisierte Oberflächen besaßen Vorteile in Uniformität und Reproduzierbarkeit, wohingegen Gel-beschichtete eine erhöhte Sensitivität aufwiesen. Datwani et al. weisen auf die Stabilität, die Reproduzierbarkeit und die homogene Oberflächenbeschaffenheit der Oberfläche hin, die aus selber assemblierenden Einzelschichten gemischter Alkanthiolmoleküle besteht [12]. Steinhauer et al. beschreiben Nitrozellulose-beschichtete Oberflächen als diejenigen, die die höchsten Sensitivitäten erreichen [84], jedoch zeigt Nitrozellulose eine ausgesprochen hohe Hintergrundfluoreszenz und eignet sich deshalb kaum für die Detektion niedrigster Konzentrationen. Kusnezow verfolgt in seinem Review die Oberflächenvergleiche einiger Forschungs-gruppen und weist in diesem Zusammenhang auf das sehr viel höhere Signal-Rausch-Verhältnis [46] eines Hydrogel-beschichteten Slides gegenüber silanisierten Slides hin. Auch Fesenko et al. verwenden hydrogelbeschichtete Microchips [23]. Arenkov, Vasiliskov, Guschin und Wang stellen in ihren Abhandlungen ebenfalls die Vorteile von Hydrogel-Oberflächen heraus [3;28;87;88]. Zu Epoxy-silanisierten Slides wird von Kusnezow [46] berichtet, dass diese die höchste Sensitivität für diese Art der Oberflächenmodifikation besitzen. Ein Problem der silanisierten Oberflächen sei allerdings die Proteindenaturierung, die der Oberflächenhydrophobie zuzuschreiben sei. Eine Denaturierung von Proteinen ist für Gel-beschichtete Slides nicht zu erwarten. Was die NHS-Aktivierung

betrifft beschreibt Mendoza, dass die NHS-aktivierte Oberfläche imstande ist, Protein-basierende Antigene effizient zu immobilisieren [62]. Diese Slideoberfläche wird in allen wichtigen Untersuchungen als optimale Voraussetzung für Microarray-Versuche auf Proteinebene beschrieben. Sie kann sehr viele Proteine gleichzeitig binden, hat also eine hohe Immobilisierungskapazität und weist einen extrem niedrigen Hintergrund auf. Daher ist in der Entwicklung eines Protein Arrays, die in dieser Arbeit beschrieben wird, nur diese besondere Oberfläche zur Anwendung gekommen.

5.2.2 Kreuzreaktivität

Die gleichzeitige Anbindung von 45 verschiedenen Analyten auf einem Slide ist aus dem weiter oben beschriebenen Grunde leider fehlgeschlagen. Die Probleme bei der Untersuchung mehrerer Proteine gleichzeitig sind insbesondere die Kreuzreaktivität und die unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper. Michaud et al. haben in ihren Untersuchungen elf polyklonale und monoklonale Antikörper gegen ca. 5000 verschiedene Hefeproteine angesetzt, wobei die Antikörper mit anderen Hefeproteinen kreuzreagierten als mit denjenigen, mit denen sie eigentlich hätten Bindungen eingehen müssen. Michaud et al. erläutern, dass diese Interaktionen nicht im Vorhinein voraussagbar sind [63]. Die schlechte Anbindung der Analyten in dem von uns durchgeführten Versuchsansatz konnte ebenso im Voraus nicht erahnt werden, so dass erst nach der Durchführung des Ansatzes mit 45 Analyten die Schwierigkeit der korrekten Anbindung ersichtlich wurde. Wegen des Scheiterns dieses Ansatzes wurden weitere Experimente zur Fehleranalyse und Optimierung durchgeführt. So wurde immerhin die Entwicklung des Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays mit 10 Analyten möglich. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wurde das jeweilige Anbindungsverhalten der einzelnen Interleukine untersucht, wobei die

Anbindung des Antigens an seinen spezifischen monoklonalen Antikörper und daraufhin die Anbindung des polyklonalen Antikörpers dargestellt und durch die SPR-Sensorgramme die am besten interagierenden Interleukine für den Microarray-Assay ausgewählt wurden. Die ausgewählten Zytokine wurden mit verschiedenen anderen Zytokinen auf einem Slide prozessiert. So konnten die bestmöglich kombinierbaren Interleukine, die sich nicht gegenseitig beeinflussen, für die Untersuchung auf einer Hydrogeloberfläche ausgewählt und auf einem Slide zusammengebracht werden.

5.2.3 Heterogenität der einzelnen Antigen-Antikörper-Paare

Nicht nur die Kreuzreaktivität der Analyte untereinander, sondern auch die individuelle Affinität jedes einzelnen Antigens zu seinem spezifischen Antikörper lassen die gleichzeitige Vermessung sehr vieler Analyte gleichzeitig schwierig erscheinen. Im Microarray-Assay-Format ist die Anpassung an die Individualität jedes einzelnen Antigen-Antikörper-Paares nicht möglich. Alle Analyte werden gleichzeitig unter den selben Bedingungen untersucht. Dabei sind die Analyte sehr verschieden, so dass bei dem von uns ausgewählten 10er-Panel auch nur diejenigen Interleukine ausgesucht wurden, die sich in ihren Eigenschaften ähneln und die gleichzeitig auf die selbe Weise prozessiert werden können. Im enzym-gebundenen Immunosorbent Assay (ELISA von engl. enzyme linked immunosorbent assay) ist es hingegen möglich das Verfahren auf jedes einzelne Analytpaar abzustimmen, um Antigenmengen unter den besten Bedingungen bestimmen zu können. Der dynamische Bereich ist individuell veränderbar, allerdings kann innerhalb eines Versuchsansatzes auch nur ein Antigen bestimmt werden.

5.2.4 Verunreinigung der monoklonalen Antikörper

Bei dem in Kapitel 4.2.2 dargestellten Vergleich der Anbindung des im Duoets gelieferten und des in 0,1% BSA in PBS gelösten monoklonalen Antikörpers an die Hydrogeloberfläche ist eine bessere Bindung des im Duoet gelieferten monoklonalen Antikörpers zu erkennen. Erst nach erfolgter Dialyse wurde eine ähnliche Anbindung des in 0,1% BSA in PBS gelösten monoklonalen Antikörpers beobachtet. Eine mögliche Ursache für die vor der Dialyse schlechtere Anbindung wäre eine Kontamination proteinähnlicher Substanzen, die in signifikantem Ausmaß neben dem Antikörper immobilisiert worden sind und bei der Dialyse entfernt werden konnten. Eine Möglichkeit für eine derartige Kontamination wären Serumalbumine, welche häufig für die Stabilisierung von Protein-präparationen verwendet werden.

5.2.5 Lagerung der gespotteten Slides

Das Spotten der Slides erfolgt, wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, jeweils mit einer frisch angesetzten Titerplatte, so dass sich intensivere Fluoreszenzintensitäten beobachten lassen. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse mit einer bis zu drei Monaten bei -20°C eingefrorenen Titerplatte. Mit dieser werden die Slides erneut gespottet, generieren allerdings nur geringe Fluoreszenzintensitäten.

Die Aufbewahrung der gespotteten Slides erfolgt nach dem Quenchen mit Ethanolamin und nach der Verwendung einer Schutzlösung in trockenen Slidebehältern bei 4°C für ca. zwei Monate. Bei der durch Kader et al. durchgeführten Untersuchung von Zytokinen, die durch aktivierte Immunzellen bei entzündlichen Darmerkrankung möglicherweise vermehrt exprimiert werden, ist die Lagerung der gespotteten Slides ebenso bei 4°C durchgeführt worden [40]. Je nach Bedarf werden die fertig gespotteten Slides entnommen. In

unseren Versuchen konnte keinerlei Intensitäts-einbuße der Fluoreszenz durch die Lagerung der gespotteten Slides beobachtet werden. Die monoklonalen Antikörper sowie die Markerproteine zeigten dieselben Ergebnisse wie bei der direkten Untersuchung der Slides nach dem Spotten. In Angenendts Untersuchungen zur Oberflächenauswahl eines Arrays wird unter anderem auch die Lagerstabilität von Gel-beschichteten Slides nach 8 Wochen beobachtet, wobei bei Trocken-lagerung bei -4°C bessere Ergebnisse erzielt werden als bei der Lagerung im Blockingpuffer. Dies ist laut Angenendt auf die Diffusion der Antikörper in die Blockinglösung [2] zurückzuführen. Erstaunlich ist das Ergebnis, dass die trocken gelagerten Slides nach zwei Wochen einen unerwarteten Anstieg der Performance [2] zeigten. Auch Wang et al. beschreiben, dass die bespotteten Microarrays bei Raumtemperatur für eine lange Zeit stabil aufbewahrt werden können [89]. Im Allgemeinen zeigen also diese Untersuchungen, so wie wir es ebenfalls zeigen konnten, dass die Lagerung der bespotteten Slides grundsätzlich möglich ist. Somit wird eine Produktion mit hoher Qualität unter einfacher Lagerung ermöglicht, was wiederum der Forderung Angenendts [2] nach einfacher Präparationstechnik entspricht.

5.2.6 Detektion der Proteinbindung

Zur Darstellung der Unterschiede zwischen der Proteinmenge, die in einer Probe im Gegensatz zur Referenzprobe enthalten ist, können zweifarbig chemisch gelabelte Lysate für die Fang-Antikörper-Arrays verwendet werden [29;43;65;66]. Die Analyse mehrerer Fluoreszenzdetektoren, die Wiese vollzogen hat, hat keine Detektoren besonders hervorstechen lassen [93]. In dem von Delehanty entwickelten Microarray-Immunoassay zur gleichzeitigen sehr schnellen Detektion von Proteinen und Bakterien wird die Detektion der

erfolgten Bindung mit fluoreszenzgelabelten Nachweisantikörpern [14] durchgeführt.

Normalerweise ist wegen der geringen Signalstärke, die von dem absolut gebundenen Detektionsantikörper ausgeht, eine Verstärkung nötig. Es ist also bis heute nicht möglich, auf normalen Oberflächen amplifizierungsfrei zu arbeiten. In unserem System werden die polyklonalen Antikörper zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oyster-650 gelabelt und stellen die Anbindung an das Antigen durch im Scanner ersichtliche Leuchtsignale dar. Oyster-Farbstoffe weisen eine günstige Kopplungschemie und eine hohe Quanten-ausbeute bei geringem Photobleaching auf. Sie sind sehr hydrophil. Diese Faktoren führen dazu, dass unspezifische Protein-Farbstoff-Wechselwirkungen reduziert werden, insgesamt die Fluoreszenz steigt und die Fluoreszenz auch bei wiederholtem Scannen nicht signifikant abnimmt. Durch die Hydrogeloberfläche ist es möglich, die indirekte Detektion mit SAV-Oyster ohne Verstärkung sichtbar zu machen. Dies ist der Tatsache zu verdanken, dass auf der Hydrogel-Oberfläche sehr viele Proteine immobilisiert werden können. Im Gegensatz zu herkömmlichen Assays kann so ein in seiner Prozessierung wesentlich einfacherer Assay entwickelt werden.

5.2.7 Wiederverwendung bereits inkubierter polyklonaler Antikörper

Die in Kapitel 4.1.3.1 beschriebene höhere Bindungsfähigkeit der bereits verwendeten polyklonalen Antikörper im Gegensatz zu der 5 % niedrigeren Detektion der zum ersten Mal verwendeten polyklonalen Antikörpern lässt folgende Erklärung zu: Bei dem Labeln der Antikörper wurde ein geringer Teil nicht gelabelt, der in seiner natürlichen Konsistenz vorliegt. Aufgrund dessen kommt es bei Zugabe der polyklonalen Antikörper zu einem Konkurrenzverhalten zwischen den gelabelten und den ungelabelten Antikörpern. Die natürlich verwendeten Antikörper, also die ungelabelten Antikörper, weisen eine bessere

Bindungsfähigkeit auf als Antikörper, die chemischen Veränderung unterzogen wurden. Aufgrund der höheren Bindungskapazität der ungelabelten polyklonalen Antikörper, wird eine Fluoreszenz sichtbar, die den stattgefundenen Bindungen nicht vollends entspricht. Bei der wiederholten Verwendung der polyklonalen Antikörper verringert sich die Menge ungelabelter Antikörper, so dass die gelabelten Antikörper an ihr spezifisches Antigen binden können und eine erhöhte Fluoreszenz generieren.

5.3 Verwendung des Microarray-Immunoassays

Der von uns entwickelte Microarray Immunoassay beschäftigt sich mit der Untersuchung der Interaktionen zwischen Antikörpern und Antigenen, er ist in der Kategorie der Quantitativen Proteomik anzusiedeln [56]. In der Quantitativen Proteomik werden ausgewählte Antikörper auf einen Slide gespottet, welche die Fähigkeit haben, die ihnen entsprechenden Antigene zu binden. Wird also eine Serum- oder eine Urinprobe auf den entwickelten Zytokinchip gegeben, können nur diejenigen enthaltenen Antigene an die Fang-Antikörper binden, die auch auf dem Slide immobilisiert wurden. Über eine Kalibrationskurve kann auf die enthaltene Menge des jeweiligen Antigens innerhalb der Probe geschlossen werden. Es gibt viele Fragestellungen in der klinischen Medizin, für die eine entsprechende Quantifizierung von größter Wichtigkeit wäre. Beispielsweise kann sie der Voraussage der Abstoßungsreaktion einer transplantierten Niere dienen. Eine Abstoßungsreaktion manifestiert sich durch ein verändertes Expressionsmuster einiger Zytokine im Serum oder im Urin eines transplantierten Patienten [32;67;91]. Heutzutage müssen zur definitiven Klärung der Erkrankung fast immer noch Biopsien der transplantierten Organe erfolgen. Diesem invasiven Verfahren könnte man durch die schnelle und nicht risikobehaftete Entnahme von Blut oder durch die noch einfachere Verwendung von Urin aus dem Wege gehen. Die Entwicklung einer neuen nichtinvasiven

Diagnostikstrategie nach Nierentransplantationen ist immer noch essentiell für eine individualisierte Therapie, um das Verhältnis zwischen Risiko und Nutzen zu optimieren [60]. Nach der definitiven Feststellung einer bevorstehenden Transplantatabstoßung könnte man durch eine möglichst schnelle Gabe von Immunsuppressiva eben dieser Abstoßung entgegenwirken. Hierbei ist allerdings auf die Balance zu achten, die zwischen einer ausreichenden Immunsuppression zur Vermeidung einer Gewebeabstoßung und der Aufrechterhaltung des Immunsystems für die Immunabwehr gewahrt bleiben muss [41]. Imai et al. beschreiben die Anwendung des Microarray-Assays in der Nephrologie, wobei Informationen nicht nur zu Nierenerkrankungen sondern auch zu der allgemeinen Nierenfunktion gegeben werden. Die Mechanismen des Fortschreitens von Nierenerkrankungen blieben allerdings bislang ungelöst [36]. Bereits 1991 beschreibt Ekins, dass die Fähigkeit, biologische Flüssigkeiten für ein weites Spektrum von Analyten zu analysieren, die Immundiagnostik im nächsten Jahrzehnt voraussichtlich verändern wird [19]. So stellt Kodadek fest, dass es nicht überraschend wäre, wenn in zehn bis zwanzig Jahren proteindetektierende Arrays das Rückgrat der medizinischen Diagnostik bilden würden [45;47]. Mit dieser Meinung steht Kodadek nicht alleine. Auch Kusnezow et al. und Wingren et al. sind von der Bedeutung des Microarrays in der zukünftigen Krankheitsdiagnostik überzeugt [47;90;95]. In fast jeder Untersuchung wird auf die Zukunftsorientierung des Microarray-Assayformats für die Diagnostik von Erkrankungen [34;54;59], wie Allergien [49], für die Untersuchung der Wirksamkeit von Arzneimitteln sowie für die Abklärung von toxikologischen Nebenwirkungen oder die Diagnostik des Immunstatus im Zusammenhang mit infektiösen Krankheiten wie Hepatitis C beispielsweise hingewiesen [97]. Außerdem werden Microarrays für das Erkennen von Autoimmunerkrankungen herangezogen, was durch die Detektion von Autoantikörpern erfolgt [38;75]. Darüber hinaus werden zum Beispiel, wie von Sreekumar et al. beschrieben, durch Protein-Microarrays bei Colon-Karzinom-Zellen Veränderungen des Proteinlevels durch Behandlung mit ionisierender

Strahlung erkannt [83]. Zudem dienen beispielsweise Multiplex-Zytokin-Arrays der Diagnose und dem Krankheitsmanagement des Sjögren Syndroms und könnten in der individuellen Antizytokintherapie eingesetzt werden [85]. Speichel, Blutplasma sowie Urin enthalten Proteine, deren Expressionsmuster überprüft werden muss, um physiologische Abläufe und in erster Linie Erkrankungen erkennen zu können [37]. Antikörper-Arrays werden hierzu genutzt werden und die Diagnostik sowie therapeutische Optionen revolutionieren [13].

Der Einsatz eines Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays erleichtert das klinische Arbeiten. Er verringert den zeitlichen Aufwand bei der Diagnostik und beschleunigt somit den Beginn der Therapie. Der Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassay stellt also für den Behandler eine Verbesserung der Arbeit dar. Der Patient kann schneller adäquat und befundbezogen versorgt werden.

Die Etablierung des für die klinische Anwendung einsetzbaren Multianalyt-Zytokin-Microarray-Immunoassays ist eine bedeutsame Entwicklung mit Zukunft, die noch viele neue Perspektiven eröffnen wird.

6 Verwendete Abkürzungen

PBS	Phosphate Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumine
SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonresonanz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, enzymgebundener Immunosorbent Assay
RIA	Radio Immun Assay
TBS	Tris Buffered Saline
MWCO	Molecular weight cut off
IRMA	Immunoradiometric Assay
NHS	N-Hydroxysuccinimid

7 Literaturverzeichnis

1. Angenendt P (2005) Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov Today* 10: 503-511
2. Angenendt P, Glokler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ (2002) Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal Biochem* 309: 253-260
3. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A (2000) Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem* 278: 123-131
4. Bathrellos LM, Lianidou ES, Ioannou PC (1998) A highly sensitive enzyme-amplified lanthanide luminescence immunoassay for interleukin 6. *Clin Chem* 44: 1351-1353
5. Borrebaeck CA (2000) Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol Today* 21: 379-382
6. Butler JE (2004) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods Mol Med* 94: 333-372
7. C.Davies (2001) Introduction to Immunoassay Principles. In: D.Wild (ed) *The Immunoassay Handbook*. pp 3-40
8. Copeland S, Siddiqui J, Remick D (2004) Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines. *J Immunol Methods* 284: 99-106

-
9. Corstjens PL, Chen Z, Zuiderwijk M, Bau HH, Abrams WR, Malamud D, Sam NR, Tanke HJ (2007) Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB). *Ann N Y Acad Sci* 1098: 437-445
 10. Cretich M, Pirri G, Damin F, Solinas I, Chiari M (2004) A new polymeric coating for protein microarrays. *Anal Biochem* 332: 67-74
 11. Cutler P (2003) Protein arrays: the current state-of-the-art. *Proteomics* 3: 3-18
 12. Datwani SS, Vijayendran RA, Johnson E, Biondi SA (2004) Mixed alkanethiol self-assembled monolayers as substrates for microarraying applications. *Langmuir* 20: 4970-4976
 13. de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM (2000) Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol* 18: 989-994
 14. Delehanty JB, Ligler FS (2002) A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria. *Anal Chem* 74: 5681-5687
 15. Ekins R, Chu F (1993) Multianalyte testing. *Clin Chem* 39: 369-370
 16. Ekins R, Chu F, Biggart E (1990) Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin (Paris)* 48: 655-666

-
17. Ekins R, Chu FW (1999) Microarrays: their origins and applications. *Trends Biotechnol* 17: 217-218
 18. Ekins RP (1998) Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* 44: 2015-2030
 19. Ekins RP, Chu FW (1991) Multianalyte microspot immunoassay-- microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem* 37: 1955-1967
 20. Emili AQ, Cagney G (2000) Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol* 18: 393-397
 21. Engvall E, Perlman P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874
 22. Famulok M (2002) Bringing picomolar protein detection into proximity. *Nat Biotechnol* 20: 448-449
 23. Fesenko DO, Nasedkina TV, Prokopenko DV, Mirzabekov AD (2005) Biosensing and monitoring of cell populations using the hydrogel bacterial microchip. *Biosens Bioelectron* 20: 1860-1865
 24. Geho D, Lahar N, Gurnani P, Huebschman M, Herrmann P, Espina V, Shi A, Wulfschuhle J, Garner H, Petricoin E, III, Liotta LA, Rosenblatt KP (2005) Pegylated, streptavidin-conjugated quantum dots are effective detection elements for reverse-phase protein microarrays. *Bioconjug Chem* 16: 559-566

-
25. Gemsa D, Kalden JR, Resch K (2001) Immunologie. Grundlagen-Klinik-Praxis. In: H.-D.Flad und D.Gemsa (ed) Zytokine. Thieme, pp 45-67
 26. Ghedin E, Pumfery A, de la FC, Yao K, Miller N, Lacoste V, Quackenbush J, Jacobson S, Kashanchi F (2004) Use of a multi-virus array for the study of human viral and retroviral pathogens: gene expression studies and ChIP-chip analysis. *Retrovirology* 1: 10
 27. Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, Villiers MB, Livache T (2005) A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal Biochem* 347: 193-200
 28. Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, Gemmell A, Shick V, Proudnikov D, Arenkov P, Mirzabekov A (1997) Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal Biochem* 250: 203-211
 29. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2: RESEARCH0004
 30. Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, Vitzthum F, Forrester S, Okon R, Saviranta P, Brinker A, Sorette M, Perlee L, Suresh S, Drwal G, Adkins JN, Omenn GS (2005) Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics* 5: 3278-3291

-
31. Hanash SM, Bobek MP, Rickman DS, Williams T, Rouillard JM, Kuick R, Puravs E (2002) Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. *Proteomics* 2: 69-75
 32. Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, Gauer S, Sichler O, Scheuermann EH, Ackermann H, Pfeilschifter JM, Geiger H, Grone HJ, Radeke HH (2005) Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol* 16: 1849-1858
 33. Huang JX, Mehrens D, Wiese R, Lee S, Tam SW, Daniel S, Gilmore J, Shi M, Lashkari D (2001) High-throughput genomic and proteomic analysis using microarray technology. *Clin Chem* 47: 1912-1916
 34. Huang R, Lin Y, Shi Q, Flowers L, Ramachandran S, Horowitz IR, Parthasarathy S, Huang RP (2004) Enhanced protein profiling arrays with ELISA-based amplification for high-throughput molecular changes of tumor patients' plasma. *Clin Cancer Res* 10: 598-609
 35. Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y (2001) Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem* 294: 55-62
 36. Imai E, Takenaka M, Nagasawa Y, Kaimori J, Hori M (2000) Application of microarray assay to nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6: 78-80
 37. Jenkins RE, Pennington SR (2001) Arrays for protein expression profiling: towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics* 1: 13-29

-
38. Joos TO, Schrenk M, Hopfl P, Kroger K, Chowdhury U, Stoll D, Schorner D, Durr M, Herick K, Rupp S, Sohn K, Hammerle H (2000) A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 21: 2641-2650
 39. Joos TO, Stoll D, Templin MF (2002) Miniaturised multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol* 6: 76-80
 40. Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF, Patel DD (2005) Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 100: 414-423
 41. Karamehic J, Lorber M, Formica R, Gavrankapetanovic F, Heljic B, Subasic D, Zecevic L (2006) Immunosuppressive therapy protocols in kidney transplantation in adults. *Bosn J Basic Med Sci* 6: 43-47
 42. Kim MG, Shin YB, Jung JM, Ro HS, Chung BH (2005) Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray. *J Immunol Methods* 297: 125-132
 43. Knezevic V, Leethanakul C, Bichsel VE, Worth JM, Prabhu VV, Gutkind JS, Liotta LA, Munson PJ, Petricoin EF, III, Krizman DB (2001) Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. *Proteomics* 1: 1271-1278

-
44. Knight PR, Sreekumar A, Siddiqui J, Laxman B, Copeland S, Chinnaiyan A, Remick DG (2004) Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. *Shock* 21: 26-30
 45. Kodadek T (2001) Protein microarrays: prospects and problems. *Chem Biol* 8: 105-115
 46. Kusnezow W, Hoheisel JD (2003) Solid supports for microarray immunoassays. *J Mol Recognit* 16: 165-176
 47. Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, Diehl F, Hoheisel JD (2003) Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* 3: 254-264
 48. Laufer S, Greim C, Bertsche T (2002) An in-vitro screening assay for the detection of inhibitors of proinflammatory cytokine synthesis: a useful tool for the development of new antiarthritic and disease modifying drugs. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 961-967
 49. Lebrun SJ, Petchpud WN, Hui A, McLaughlin CS (2005) Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. *J Immunol Methods* 300: 24-31
 50. Lesaicherre ML, Lue RY, Chen GY, Zhu Q, Yao SQ (2002) Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *J Am Chem Soc* 124: 8768-8769

-
51. Li Y, Nath N, Reichert WM (2003) Parallel Comparison of Sandwich and Direct Label Assay Protocols on Cytokine Detection Protein Arrays. *Anal Chem* 75: 5274-5281
 52. Li Y, Schutte RJ, Abu-Shakra A, Reichert WM (2005) Protein array method for assessing in vitro biomaterial-induced cytokine expression. *Biomaterials* 26: 1081-1085
 53. Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I (1995) Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started. *Biosens Bioelectron* 10: i-ix
 54. Lin Y, Huang R, Chen LP, Lisoukov H, Lu ZH, Li S, Wang CC, Huang RP (2003) Profiling of cytokine expression by biotin-labeled-based protein arrays. *Proteomics* 3: 1750-1757
 55. Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie. In: Heenrich PC, Schaper F, Timmermann A, Martens AS, Lehmann U (eds) pp 365-1180
 56. MacBeath G (2002) Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32 Suppl: 526-532
 57. MacBeath G, Schreiber SL (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289: 1760-1763
 58. Madoz-Gurpide J, Wang H, Misek DE, Brichory F, Hanash SM (2001) Protein based microarrays: a tool for probing the proteome of cancer cells and tissues. *Proteomics* 1: 1279-1287

-
59. Martins TB, Pasi BM, Litwin CM, Hill HR (2004) Heterophile antibody interference in a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for quantitation of cytokines in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 325-329
 60. Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P, Kotsch K (2006) Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 69: 1683-1690
 61. Melton L (2004) Protein arrays: proteomics in multiplex. *Nature* 429: 101-107
 62. Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M (1999) High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* 27: 778-6, 788
 63. Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI (2003) Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* 21: 1509-1512
 64. Miles LE, Hales CN (1968) Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219: 186-189
 65. Miller JC, Butler EB, Teh BS, Haab BB (2001) The application of protein microarrays to serum diagnostics: prostate cancer as a test case. *Dis Markers* 17: 225-234
 66. Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB, Teh BS, Haab BB (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer

sera: antibody screening and identification of potential biomarkers.

Proteomics 3: 56-63

67. Mischak H, Kaiser T, Walden M, Hillmann M, Wittke S, Herrmann A, Knueppel S, Haller H, Fliser D (2004) Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin Sci (Lond)* 107: 485-495
68. Moltmann U, Fallert-Müller A (1999) Teil 1 des Lexikons des Biochemie. In: K.Hiller, U.Lindequist, M.F.Melzig (eds) *Lexikon der Biochemie*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, pp 79-503
69. Moody MD, Van Arsdell SW, Murphy KP, Orencole SF, Burns C (2001) Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines. *Biotechniques* 31: 186-4
70. Nielsen UB, Geierstanger BH (2004) Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J Immunol Methods* 290: 107-120
71. Olle EW, Sreekumar A, Warner RL, McClintock SD, Chinnaiyan AM, Bleavins MR, Anderson TD, Johnson KJ (2005) Development of an internally controlled antibody microarray. *Mol Cell Proteomics* 4: 1664-1672
72. Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846
73. Peluso P, Wilson DS, Do D, Tran H, Venkatasubbaiah M, Quincy D, Heidecker B, Poindexter K, Tolani N, Phelan M, Witte K, Jung LS,

-
- Wagner P, Nock S (2003) Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal Biochem* 312: 113-124
74. Richalet-Secordel PM, Poisson F, Van Regenmortel MH (1996) Uses of biosensor technology in the development of probes for viral diagnosis. *Clin Diagn Virol* 5: 111-119
75. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, Fournel S, Fong D, Genovese MC, de Vegvar HE, Skrinier K, Hirschberg DL, Morris RI, Muller S, Pruijn GJ, Van Venrooij WJ, Smolen JS, Brown PO, Steinman L, Utz PJ (2002) Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8: 295-301
76. Saviranta P, Okon R, Brinker A, Warashina M, Eppinger J, Geierstanger BH (2004) Evaluating sandwich immunoassays in microarray format in terms of the ambient analyte regime. *Clin Chem* 50: 1907-1920
77. Schipper EF, Rauchalles S, Kooyman RP, Hock B, Greve J (1998) The waveguide Mach-Zender interferometer as atrazine sensor. *Anal Chem* 70: 1192-1197
78. Schweitzer B, Kingsmore SF (2002) Measuring proteins on microarrays. *Curr Opin Biotechnol* 13: 14-19
79. Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, Shao W, Wang M, Fu Q, Shu Q, Laroche I, Zhou Z, Tchernev VT, Christiansen J, Velleca M, Kingsmore SF (2002) Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol* 20: 359-365

-
80. Silzel JW, Cercek B, Dodson C, Tsay T, Obremski RJ (1998) Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clin Chem* 44: 2036-2043
 81. Smith JT, Reichert WM (2003) Prediction of Feature Spread for Microarray Printing Using Protein and DNA Solutions. *Langmuir* 19: 3078-3080
 82. Soultani-Vigeron S, Dugas V, Rouillat MH, Fedolliere J, Duclos MC, Vnuk E, Phaner-Goutorbe M, Bulone V, Martin JR, Wallach J, Cloarec JP (2005) Immobilisation of oligo-peptidic probes for microarray implementation: characterisation by FTIR, atomic force microscopy and 2D fluorescence. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 822: 304-310
 83. Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM (2001) Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* 61: 7585-7593
 84. Steinhauer C, Ressine A, Marko-Varga G, Laurell T, Borrebaeck CA, Wingren C (2005) Biocompatibility of surfaces for antibody microarrays: design of macroporous silicon substrates. *Anal Biochem* 341: 204-213
 85. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R (2004) Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* 59: 592-599
 86. Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO (2002) Protein microarray technology. *Drug Discov Today* 7: 815-822

-
87. Vasiliskov AV, Timofeev EN, Surzhikov SA, Drobyshhev AL, Shick VV, Mirzabekov AD (1999) Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization. *Biotechniques* 27: 592-8, 600
 88. Wang CC, Huang RP, Sommer M, Lisoukov H, Huang R, Lin Y, Miller T, Burke J (2002) Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines. *J Proteome Res* 1: 337-343
 89. Wang D, Liu S, Trummer BJ, Deng C, Wang A (2002) Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat Biotechnol* 20: 275-281
 90. Weissenstein U, Schneider MJ, Pawlak M, Cicenas J, Eppenberger-Castori S, Oroszlan P, Ehret S, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Eppenberger U (2006) Protein chip based miniaturized assay for the simultaneous quantitative monitoring of cancer biomarkers in tissue extracts. *Proteomics* 6: 1427-1436
 91. Weissinger EM, Wittke S, Kaiser T, Haller H, Bartel S, Krebs R, Golovko I, Rupprecht HD, Haubitz M, Hecker H, Mischak H, Fliser D (2004) Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes. *Kidney Int* 65: 2426-2434
 92. Wen JK, Zhang XE, Cheng Z, Liu H, Zhou YF, Zhang ZP, Yang JH, Deng JY (2004) A visual DNA chip for simultaneous detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1. *Biosens Bioelectron* 19: 685-692
 93. Wiese R (2003) Analysis of several fluorescent detector molecules for protein microarray use. *Luminescence* 18: 25-30

-
94. Wilson DS, Nock S (2003) Recent developments in protein microarray technology. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 494-500
 95. Wingren C, Steinhauer C, Ingvarsson J, Persson E, Larsson K, Borrebaeck CA (2005) Microarrays based on affinity-tagged single-chain Fv antibodies: sensitive detection of analyte in complex proteomes. *Proteomics* 5: 1281-1291
 96. Yevdokimov Y, Salyanov VI, Lortkipanigze GB, Gedig E, Spener F, Palumbo M (1998) Sensing biological effectors through the response of bridged nucleic acids and polynucleotides fixed in liquid-crystalline dispersions. *Biosens Bioelectron* 13: 279-291
 97. Yuk CS, Lee HK, Kim HT, Choi YK, Lee BC, Chun BH, Chung N (2004) Development and evaluation of a protein microarray chip for diagnosis of hepatitis C virus. *Biotechnol Lett* 26: 1563-1568
 98. Zhang Y, Heller A (2005) Reduction of the nonspecific binding of a target antibody and of its enzyme-labeled detection probe enabling electrochemical immunoassay of an antibody through the 7 pg/ml-100 ng/mL (40 fM-400 pM) range. *Anal Chem* 77: 7758-7762
 99. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105
 100. Zhu H, Snyder M (2001) Protein arrays and microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 5: 40-45

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Uta Heckhoff
Geburtsdatum	14.04.1982
Geburtsort	Duisburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1988-1992	Besuch der Grundschule in Duisburg
1992-2001	Besuch des Albert-Einstein- Gymnasiums in Duisburg
11.06.2001	Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

WS 2001/02	Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster
23.09.2002	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
22.09.2004	Zahnärztliche Vorprüfung
28.11.2007	Zahnärztliche Prüfung
Dezember 2007	Approbation als Zahnärztin

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang für die Überlassung des Themas sowie die freundliche und hilfsbereite Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Für die Bereitstellung von Materialien sowie die wissenschaftliche Unterstützung danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt.

Der Firma XanTec bioanalytics GmbH gilt mein Dankeschön für die Überlassung der Hydrogel-beschichteten Oberflächen sowie die stete Hilfsbereitschaft bei den Versuchsreihen. Insbesondere bedanke ich mich ganz herzlich bei dem Mitarbeiter Nico Dankbar und dem Geschäftsführer Dr. Erk Gedig für die Einarbeitung in das Thema und die geduldige Unterstützung bei den Versuchen sowie für die Korrekturen der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. dent. Peter Robotta, der mir bei der äußeren Form und der Korrektur der Arbeit stets zur Seite stand und mich immer mit aufmunternden Worten zur Fertigstellung der Arbeit motivierte. Vielen Dank für die absolute Unterstützung in jeglicher Lebenssituation und für alle Mühen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, insbesondere bei meiner Mutter, die mehrmalige gewissenhafte Korrekturarbeiten durchgeführt hat und die mir immer in jeder Lebenslage mit Rat und Tat zur Seite steht.

Überdies möchte ich mich bei meinem Vater für die rückhaltlose Unterstützung bedanken.

Ebenfalls danke ich meiner Schwester Lea für die geduldige und genaue Korrektur der Arbeit und einfach dafür, dass sie da ist.