

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Pavenstädt

Weiterentwicklung und Prozessoptimierung eines Multianalyt-Zytokin-
Microarray-Immunoassays zur klinischen Anwendung

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Balzer, Gereon

aus Münster

2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gert Gabriëls

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
- Direktor: Professor Dr. med. Hermann Pavenstädt -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang
Koreferent: Prof. Dr. med. Gert Gabriëls

Zusammenfassung

Weiterentwicklung und Prozessoptimierung eines Multianalyt-Zytokin-
Microarray-Immunoassays zur klinischen Anwendung

Gereon Balzer

In der vorliegenden Arbeit wird ein Zytokin-Mikroarray-Chip auf Fluoreszenzbasis zur parallelisierten Konzentrationsbestimmung verschiedener Interleukine und Chemokine in humanem Probenmaterial optimiert.

Neben der Evaluation von apparenten Faktoren wie Microarray-Scanner, -Spotter, und -Substraten auf die Qualität des Microarrays, werden - im Hinblick auf eine Verwendung dieses Assayformats als in-vitro-Diagnostikum (IVD) - biologisch-systemische Parameter der einzelnen Sandwich-Assays im multiplexen Microarrayformat untersucht.

Eine systematische Analyse prozessualer Parameter – von der Herstellung des Microarrays über die Methoden der Inkubation bis zur Analyse und Auswertung von Realproben aus Plasma und Serum an ausgewählten Analyten - ergibt hierbei einen detaillierten Überblick über die Leistungsfähigkeit des Messsystems.

Es kann gezeigt werden, dass mit dem System der Nachweis von zugespikten Interleukinen in humanem Plasma und Vollblut prinzipiell möglich ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2009

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung eines Microarrays zur klinischen Anwendung bei nierentransplantierten Patienten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene z. T. kritische Prozessschritte intensiv auf Umgebungseinflüsse hin untersucht und eine mögliche Verwendung als In-Vitro-Device (IVD) überprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die zur Projektdurchführung zur Verfügung stehenden Geräte noch nicht optimal für die Herstellung und Auswertung von Microarray-Substraten geeignet sind. Beim fluoreszenzbasierten Auslesegerät (Scanner) kam es zu keinen signifikanten Problemen. Beim so genannten Spotter kam es zum Teil zu schweren, die Reproduzierbarkeit des Systems erheblich einschränkenden Problemen. Der Spotter arbeitete oft unsauber und verursachte deshalb eine schlechte Qualität der Slides. Es konnte außerdem eine kaum beeinflussbare, von Spottingdurchgang zu Spottingdurchgang schwankende Verschleppung von Material über benachbarte Wells der Mikrotiterplatte nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die benutzten polyklonalen, fluoreszenzmarkierten Detektorantikörper variable Affinitäten zu den jeweils kongruierenden Analyten im Sandwichassay aufweisen. Basierend auf Vorversuchen konnten die Sensitivitätsunterschiede für Einzelanalyten reproduziert werden. Die Detektionsbereiche für einige Einzelanalyten lagen jedoch z. T. über ein bis zwei Dekaden auseinander, was maßgeblich auf die verwendeten Biokomponenten zurückzuführen war. Uta Heckhoff konnte in ihrer Arbeit bereits nachweisen, dass die Sensitivität der Antikörper oft unter den vom Hersteller angegebenen Werten liegt.

Der als Fluoreszenzlabel für die Antikörper eingesetzte Farbstoff Oyster 550P zeigte eine sehr hohe Photostabilität, was sich im Inkubations- und Auswerteprozess als sehr positiv herausstellte, da Microarrays auch nach einer längeren Lagerung auslesbar blieben und dokumentiert werden konnten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der eingesetzte Farbstoff so stabil ist, dass ein strenger Schutz vor Lichtexposition nicht notwendig ist und so eine unkomplizierte Versuchsdurchführung möglich ist.

In Bezug auf die verwendeten C-Hydrogelslides[®] konnte gezeigt werden, dass diese, trotz einer höheren Fluoreszenz, bei der Verwendung unter den üblichen Bedingungen nicht für die Versuche eingesetzt werden können, da sie zu viele unspezifische Wechselwirkungen mit den Plasmaproteinen eingehen. Als Substrat für weitere Versuche sind also die ursprünglich verwendeten HC-Hydrogelslides[®] zu bevorzugen, da diese nur sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen mit den Realproben zeigten.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem System der Nachweis von zugespikten Interleukinen in humanem Plasma und Vollblut prinzipiell möglich ist.

Ebenso erscheint eine Messung von Interleukinen in humanem Plasma von Patienten möglich.

Das System insgesamt ist als funktionsfähig anzusehen. Allerdings sind ausreichend genaue Messungen bisher nicht reproduzierbar möglich gewesen. Dies ist zum großen Teil vermutlich auf die Problematik mit dem Spotter zurückzuführen.

1 Inhaltsverzeichnis

2 GRUNDLAGEN	1
2.1 ENTWICKLUNGSGESCHICHTE VON MICROARRAYS	1
2.2 IMMUNOASSAY	2
2.3 BEISPIELE FÜR SANDWICH-IMMUNOASSAYS	4
2.3.1 <i>Multianalyt-Microarray-Assay</i>	4
2.3.2 <i>Bead-Assays</i>	6
2.4 ARRAYTECHNOLOGIEN	6
2.4.1 <i>Oberflächen von Microarrays</i>	6
2.4.2 <i>Anwendungen von Mikroarrays</i>	7
2.5 ZYTOKINE	9
3 MATERIAL UND METHODEN	10
3.1 REAGENZIEN	10
3.2 ANTIKÖRPER UND ANTIGENE	10
3.2.1 <i>Auflistung</i>	10
3.2.2 <i>Rekonstituierung der Antikörper und Antigene</i>	11
3.2.3 <i>Labeln der polyklonalen Ak</i>	11
3.3 GERÄTE	11
3.3.1 <i>Microarray-Spotter</i>	12
3.3.2 <i>Microarray-Scanner</i>	13
3.4 STANDARDPROTOKOLLE (SOPs) ZUR HERSTELLUNG VON MA-SLIDES	15
3.4.1 <i>Spotten</i>	15
3.4.2 <i>Fluoreszenzlöschung (Quenchen)</i>	17
3.4.3 <i>Präparation der Inkubationskammern</i>	17
3.4.4 <i>Inkubation</i>	18
3.4.5 <i>Scannen der Microarray-Slides</i>	19
3.4.6 <i>Auswertung von Scanbildern</i>	19
3.5 ABWEICHUNGEN VOM STANDARDPROTOKOLL	20
3.5.1 <i>Untersuchung zur Markerverschleppung</i>	20
3.5.2 <i>Verwendung von Silikonkammern zur Inkubation</i>	22
3.5.3 <i>Versuche zum Vergleich verschiedener Hydrogel-Typen</i>	23
4 ERGEBNISSE	25
4.1 VERSUCHE ZUM MICROARRAY-SCANNER	26
4.2 VERSUCHE ZUM SPOTTEN	30
4.3 VERSUCHE ZU VERSCHIEDENEN MICROARRAYSLIDE-BESCHICHTUNGEN	33

4.4 PHOTOSTABILITÄT DER VERWENDETEN FLUORESZENZFARBSTOFFE	37
4.5 BIOLOGISCHE KOMPONENTEN IM INTERLEUKIN-MICROARRAYSYSTEM	38
4.6 SYSTEMATISCHE WEITERENTWICKLUNG DES ZYTOKINCHIPS	41
4.6.1 <i>Versuche mit IL-Mix</i>	41
4.7 ENTWICKLUNG EINES NEUEN INKUBATIONSSYSTEMS	47
5 DISKUSSION	49
5.1 VERWENDUNG VON SPOTTER UND SCANNER ZUR HERSTELLUNG VON PROTEINMICROARRAYS	49
5.2 MICROARRAY-SUBSTRATE UND FLUOROPHORE	54
5.3 BESTÄNDIGKEIT DER FARBSTOFFE	56
5.4 BIOLOGISCHE KOMPONENTEN IM INTERLEUKIN-MICROARRAY-SYSTEM	57
5.5 WEITERGEHENDE UNTERSUCHUNG DES ZYTOKINCHIPS	59
5.6 MÖGLICHKEIT ZUR PARALLELBESTIMMUNG VON MEHREREN PROBEN AUF EINEM MICROARRAY	60
6 BEURTEILUNG	63
7 AUSBLICK	64
8 ABBILDUNGEN	66
9 GRAPHEN / DIAGRAMME	67
10 ABKÜRZUNGEN	68
11 LITERATURVERZEICHNIS	69
12 LEBENSLAUF	76
13 DANKSAGUNGEN	77

2 Grundlagen

2.1 Entwicklungsgeschichte von Microarrays

Die Entwicklung von Arraysystemen begann in den 50er Jahren durch die Arbeiten von Ekins, Yalow und Berson (11;67). Es wurden die ersten Assays entwickelt, die über einen kompetitiven Ansatz mittels radioaktiv markierter Antikörper Analyte in humanen Proben nachweisen konnten. Diese Verfahren waren bezogen auf Sensitivität, Praktikabilität und Prozessgeschwindigkeit den damals üblichen Nachweismethoden deutlich überlegen.

Anfang der 70er Jahre führten Engvall und Perlman den ELISA ein (15). Die Funktionsweise (Sandwich-Prinzip) ähnelt der der späteren Microarrays; der Vorteil einer erhöhten Sensitivität war allerdings aufgrund der nicht vorhandenen Miniaturisierung nicht gegeben.

Diesen erreichte man Ende der 80er Jahre durch die weitere Verkleinerung der Systeme, die eine noch schnellere und sensitivere zeitgleiche Vermessung von Hunderten von Analyten in kleinsten Probevolumen ermöglichten (12-14;57).

Bis zu diesem Zeitpunkt hatte die Microarray bzw. die Assay-Technologie allgemein weder bei Forschern noch bei kommerziellen Unternehmen weitreichende Beachtung gefunden. Dies änderte sich auch nicht, als Köhler und Milstein Mitte der 70er Jahre ein Verfahren entwickelten, um monoklonale Antikörper in vitro herzustellen (31), wodurch das Problem der Verfügbarkeit der bis dahin teuren und schwer zu produzierenden Antikörper deutlich reduziert wurde.

Silzel und Moody waren die ersten, die in den 90er Jahren die Durchführbarkeit von Microarrayexperimenten zeigten (43;56).

Zunächst standen die technisch und biologisch weitaus weniger anspruchsvollen DNA-Microarrays im Vordergrund. Erst später erweiterten sich die Anwendungsmöglichkeiten auch auf RNA und schließlich Proteine (siehe 2.4.2).

2.2 Immunoassay

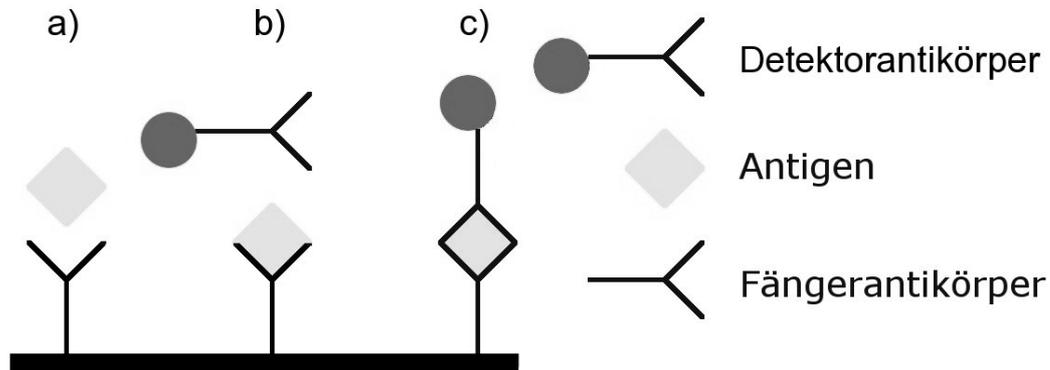


Abbildung 1: schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Sandwich-Immuno-Assays: a) Der an eine Oberfläche gebundene Antikörper bindet als Fänger den frei in der Lösung befindlichen Analyten (Antigen). b) Nach dem Entfernen der zu untersuchenden Lösung wird ein markierter polyklonaler Antikörper (Detektorantikörper) hinzugefügt. c) Dieser bindet an den am Fängerantikörper gebundenen Analyten. Anschließend erfolgt die Auswertung über die Stärke des Fluoreszenzsignals. Dieses verhält sich proportional zur Menge der gebundenen markierten Antikörper, die wiederum proportional zur Konzentration des Analyten in der zu untersuchenden Lösung ist.

Neben den Sandwich-Immunoassays gibt es so genannte Direct-Label-Immunoassays: Die Lösung mit dem in unbekannter Konzentration enthaltenen Antigen wird mit einer bekannten Menge markierten Antigens vermischt. Nach Inkubation dieser Lösung mit dem monoklonalen Fängerantikörper kann die Menge zugefügten markierten Antigens gemessen und daraus Rückschlüsse auf die Konzentration des ursprünglich in der Probe vorhandenen unmarkierten Analyten gezogen werden. Die Markierung der Proben kann radioaktiv oder über Enzyme erfolgen (5;35).

Beide Verfahren verfügen über Vor- und Nachteile. Bei den Direct-Label-Immunoassays entfällt der Inkubationsschritt mit Detektorantikörpern, wodurch sich die Versuchsdauer verkürzt. Ein Vorteil des Sandwich-Assays ist das Wegfallen einer direkten Markierung des Antigens(37). Hinzu kommt, dass durch den polyklonalen Antikörper, der mehrfach gelabelt wird, eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals erreicht werden kann. Dies war wohl auch einer der Gründe dafür, dass in der Arbeit von Li et al (66) Sandwich-

Immunoassays den Direct-Label-Immunoassays überlegen waren. Anzumerken ist noch, dass es bei beiden Formen der Assays zu einer Beeinflussung der Antikörperbindung durch den Fluoreszenzfarbstoff kommen kann (37;66).

Die generelle Durchführbarkeit von Microarrayversuchen sowohl nach dem Direct-Label- wie auch dem Sandwich-Ansatz wurde unter anderem von Arenkov et al. gezeigt (2).

Es sind einige ergänzende Methoden entwickelt worden, die die Durchführung des Assays abwandeln und dadurch ein stärkeres Fluoreszenzlevel erreichen, was eine Erhöhung der Sensitivität bedeutet.

Eine dieser Verstärkungsmethoden ist die Rolling Circle Amplification (RCA). Die ersten Schritte entsprechen dabei denen des oben beschriebenen Microarray Immunoassays. Es wird allerdings ein mit einem DNA-Primer „markierter“ Detektionsantikörper verwendet. In Gegenwart von DNA-Polymerase, Nukleotiden und circuliären DNA-Molekülen (mit denen der Assay inkubiert wird) synthetisiert die DNA-Polymerase lange Nucleotidketten, an die die markierten Detektionsantikörper binden. Genauso wie beim Assay ohne RCA können diese Sonden nun mit konventionellen Scannern auf die Stärke der Fluoreszenz untersucht werden. Insgesamt ist das Signal nun jedoch deutlich stärker als ohne Durchführung einer RCA. Damit können Analytkonzentrationen nachgewiesen werden, die mit einem herkömmlichen fluoreszenzbasierten Microarray-Immunoassay bisher nicht nachzuweisen wären. Schweitzer et al. konnten zeigen, dass die Technik der RCA die Sensitivität des Assays verbessert. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich bei dem Assay um einen ELISA oder einen Microarray-Assay handelte (54). Auch andere Arbeiten zeigen die Einsatzfähigkeit der RCA in verschiedenen Variationen und Einsatzbereichen (Proteine, DNA) (36;45;53). Nachteilig sind allerdings die für diese Technik benötigten teuren Reagenzien.

Eine gewisse unspezifische Verstärkung der Fluoreszenz lässt sich auch durch die Nutzung von Slides mit verspiegelten Oberflächen oder die Zugabe von metallischen Partikeln zu den Farbstofflösungen erreichen (1).

2.3 Beispiele für Sandwich-Immunoassays

2.3.1 Multianalyt-Microarray-Assay

Bei dieser Art Assays, die der zentrale Bestandteil dieser Arbeit ist, handelt es sich um eine Variante des oben beschriebenen Sandwich-Immunoassays. Sie kam Ende der 80er Jahre auf (siehe 2.1). Die besonderen Eigenschaften eines solchen Systems können anhand des Namens hergeleitet werden.

„Multianalyt“ beschreibt dabei die Besonderheit dieses Systems, dass im Gegensatz zu herkömmlichen ELISA-Ansätzen (die auch zu den Immuno- aber nicht zu den Microarray-Assays gehören) eine große Anzahl Substanzen parallel bestimmt werden können. Dies wird erst durch die hohe Sensitivität und Spezifität von Antikörpern ermöglicht, die, selbst in kruden Probenmatrices, nur an das gegen sie gerichtete Epitop binden.

„Microarray“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Miniaturisierung des Systems. Inzwischen hat sich als Basis für Arbeiten auf diesem Gebiet der Glasobjektträger, wie man ihn von der Lichtmikroskopie her kennt, durchgesetzt (Im Folgenden auch „Slide“ genannt). Es werden für Microarrayexperimente speziell hergestellte Objektträger eingesetzt, deren Oberflächen sehr plan und mit unterschiedlichen Substanzen beschichtet sind, um z. B. eine kovalente Immobilisierung zu ermöglichen oder den unspezifisch gebundenen Hintergrund aufgebrachtener Lösungen zu reduzieren (siehe 2.4.1). Die Anwendung von Mikroarrays ist allerdings nicht nur auf Glasobjektträger beschränkt. Es sind auch verschiedene andere Möglichkeiten entwickelt worden.

Die aufgetragenen Mengen des Fängerantikörpers sind sehr gering, deshalb reicht auch eine geringe Menge der zu untersuchenden Analytlösung zur Inkubation aus. Damit spart man zum einen Antikörper, was ökonomisch sinnvoll ist, zum anderen ist der geringe Bedarf an Messlösung, die für ein brauchbares Ergebnis benötigt wird, vor allem in Bereichen wichtig, in denen naturgemäß nicht viel Probensubstanz zur Verfügung steht (etwa in der tierexperimentellen Forschung oder der Neonatologie).

Die Sensitivität des Systems nimmt dabei keineswegs mit zunehmender Miniaturisierung ab wie Ekins in seinen Arbeiten zur Theorie des Ambient Analyte Assay darstellte (12;49). Er beschreibt, dass die Miniaturisierung der Arraytechnik im Gegenteil zu einer Steigerung der Sensitivität führt. Dies ist zum einen dadurch zu erklären, dass bei sehr kleinen Spots das Abfangen der Analyten aus der Lösung zu keiner relevanten Abnahme der Analytkonzentration führt. Große Spots dagegen fangen signifikante Mengen von Analyt aus der Lösung ab, wodurch die Konzentration der Probe im Laufe der Messung abnimmt. Zusätzlich verringert sich mit zunehmendem Spotdurchmesser die Dichte des Besatzes der Antigene an den Fängerantikörpern. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung des Verhältnisses von Signalintensität des Spots zur Signalintensität des Hintergrundes. Dieses führt wiederum zu einer schlechteren Sensitivität (58). Mit kleineren Spots kann man dagegen eine hohe Fängerantikörperdichte im Spot erreichen und gleichzeitig die Gesamtkonzentration an Antikörpern im Assay (und damit auch den Anteil des abgefangenen Analyten) gering halten. Auch ist das Signal-Hintergrundverhältnis aufgrund der kleinen aber deutlich stärker fluoreszierenden Spots besser.

Dieses Konzept des Ambient Analyte Assays ist mittlerweile anerkannt (51;58). Allerdings ist die Methodik des Microarrays sehr komplex, und Probleme bei der praktischen Umsetzung der Versuche können leicht eine Umkehr der prinzipiellen Vorteile ins Gegenteil bewirken. Deshalb wird auf diesem Gebiet noch intensiv geforscht, da die Ergebnisse des Microarrays zum Teil noch deutlich hinter dem theoretisch Machbaren zurückliegen. So beschrieben Copeland et al. in ihrer Arbeit eine deutliche Unterlegenheit des von ihnen untersuchten Membran-Microarrays gegenüber des herkömmlichen ELISA (8). Dagegen konnten Knight et al. in ihren Microarray-Experimenten die Sensitivität von herkömmlichen ELISA bei wesentlich geringeren Kosten sowie geringerem Probenvolumen auf Seiten des Microarrays, erreichen. Allerdings schnitt der Microarray-Ansatz tendenziell schlechter ab, was die Reproduzierbarkeit anging (30). Huang et al. entwickelten einen Microarray, der den bisherigen ELISAs an Sensitivität, linearem Messbereich und Intraassayvariabilität

überlegen war (25). Diese Arbeiten zeigen die zurzeit noch unbeständigen Leistungen der entwickelten Microarrays in der praktischen Anwendung, die auch im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit beobachtet wurden.

2.3.2 Bead-Assays

Bead-Assays stellen eine weitere Möglichkeit des parallelen Nachweises von verschiedenen Zytokinen in einer Probe dar. Die Fängerantikörper werden jedoch nicht auf eine plane Glasoberfläche, sondern an viele kleine Kügelchen gebunden. Der Durchmesser der Kugeln ist sehr gering, so dass eine große Oberfläche für die Antikörper zur Verfügung steht. Diese Technologie wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit guten Ergebnissen erprobt (9;47). Khan et al. vermaßen Serumproben, die in bestimmten Zeitabständen nach der Injektion eines Endotoxins gewonnen wurden. Bei der Vermessung der gleichen Probe mit verschiedenen Kits konnten sie deutliche Unterschiede in der gemessenen Interleukinkonzentration nachweisen. Bei der Betrachtung der Veränderungen der Interleukinkonzentration im Laufe der Zeit bei wiederholten Blutuntersuchungen wurden allerdings bei weiterhin abweichenden Absolutwerten zwischen den einzelnen Kits ähnliche Verläufe der Konzentrationen gefunden (28).

Zusammenfassend handelt es sich also bei den Assays im Bead-Design um eine Assayform, die, wie auch die Microarrays auf Glasobjektträgerbasis, im Gegensatz zur herkömmlichen ELISA Vorteile besitzt. Zu diesen gehören ein geringer Verbrauch von Probenmaterial und die Möglichkeit, verschiedene Analyte in einem Arbeitsgang in kurzer Zeit zu vermessen.

2.4 Arraytechnologien

2.4.1 Oberflächen von Microarrays

Die Sensitivität eines Microarrays hängt entscheidend von der Oberfläche des Substrates ab, auf dem die Antikörper immobilisiert werden. Bei unbeschichteten Substraten und einer adsorptiven Immobilisierung werden Antikörper auf der zweidimensionalen Oberfläche denaturiert; die daraus resultierende Sensitivität des Assays ist eher gering. Bei einer gerichteten,

kovalenten Immobilisation auf zweidimensionalen Substraten verringert sich der Anteil der denaturierten Antikörper deutlich, was zu einem Anstieg der Sensitivität führt. Bei biokompatiblen Oberflächen mit dreidimensionaler Nanotexturierung wird sie - aufgrund der weitestgehend ausbleibenden Denaturierung der Antikörper - maximiert. Darüber hinaus bildet die dreidimensionale Struktur auf derselben Fläche, etwa eines Glasslides, mehr Platz für die Bindung von Antikörpern als eine plane Beschichtung der Oberfläche. Dadurch verstärkt sich die Sensitivität (4) über Optimierung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses weiter (51).

Wenngleich eine Fixierung der Antikörper an der Oberfläche des Trägermaterials durchaus ohne nennenswerte Aktivitätsverluste möglich ist (38), wurde auch beschrieben, dass die Antikörper bei der Bindung an die Slideoberfläche denaturieren und dadurch ihre Aktivität ganz oder zu großen Teilen verlieren können (41).

Bei der Durchführung von Microarrayexperimenten ist also die Wahl der Slides entscheidend. Deren Beschichtung hat zum Teil erhebliche Auswirkungen auf erreichbare Spotform, Spotbackground, Sensitivität und Reproduzierbarkeit (1;55;66). Angenendt et al konnten in entsprechenden Versuchen keine eindeutig überlegende Oberfläche bzw. Oberflächenchemie ermitteln. Hierbei bleibt aber unberücksichtigt, dass es sich bei dieser Arbeit ausschließlich um planare Oberflächen gehandelt hat. Je nach im Vordergrund stehendem Ziel muss der Experimentator die für seine Bedürfnisse optimale Oberfläche wählen (1). Arenkov et al wiesen eine Überlegenheit von Hydrazine-aktivierten Microchips gegenüber Glutaraldehyd-aktivierten Microchips nach (2).

Auf die Eigenschaften von Hydrogel-Slides wird unter 5.1 weiter eingegangen. Neben der eigentlichen Oberflächenbeschichtung kann auch eine ungünstige Auswahl verwendeter Puffer und eine insgesamt unsaubere Oberfläche das Ergebnis negativ beeinträchtigen (32).

2.4.2 Anwendungen von Mikroarrays

Mittlerweile gehören DNA- und RNA-Microarrays verschiedener Formate zu etablierten Untersuchungsverfahren (22;26). Bei Proteinmicroarrays (7;25) ist

die Kommerzialisierung noch nicht so weit fortgeschritten, da hier Probleme mit der empfindlichen Tertiärstruktur der Proteine auftreten. Außerdem ist das Angebot für Antikörper gegen Proteine noch begrenzt. Für die Untersuchung von DNA im Microarrayformat stehen dagegen cDNA und synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Verfügung, die jeweils genau passend in der gewünschten Form hergestellt werden können (3;23;58). Dennoch ist gerade die Untersuchung von Proteinen interessant, weil aus der Messung von DNA oder auch mRNA aufgrund von posttranslationalen Modifikationen kein direkter Rückschluss auf die Aktivität von Proteinen möglich ist (6;19;59). Mit Hilfe von Protein-Microarray-Assays können die Proteine direkt untersucht werden.

Die oben genannten Untersuchungen können in verschiedenen Medien durchgeführt werden. Beispiele sind etwa die Bestimmung von Stoffen in Zelllysaten (57) oder der Nachweis von pathologischen Substanzen im Blut zur Diagnostik von Krankheiten (27).

Im Bereich der Nephrologie kann durch die Weiterentwicklung des hier vorgestellten Verfahrens eine Verbesserung bei der Versorgung von nierentransplantierten Patienten erreicht werden. Die heutzutage verwendeten Untersuchungen zur Überwachung der Nierenfunktion (insbesondere die Nierenbiopsie) sind oft invasiv und wenig sensitiv (39;68). Die Vermessung einzelner Zytokine in Patientenmaterial kann hier eine genauere Aussage ermöglichen (24;40). Eine simultane Untersuchung mehrerer Proteine, wie im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt, verspricht die noch sensitivere Diagnose einer drohenden Abstoßungsreaktion. Dadurch wird die Belastung der Patienten vermindert und die Lebensqualität der Transplantierten erhöht, da Therapieregime frühzeitig zur Verbesserung bzw. zum Erhalt der Nierenfunktion umgestellt werden können. Dies ist auch vor dem Hintergrund der zunehmenden Organknappheit wichtig. Wenn es gelingt, die mittlere Lebensdauer einer transplantierten Niere von aktuell etwa acht bis neun Jahren (50) zu verlängern, kann man so den Organbedarf senken. Neben der Steigerung der Zahl der Organspenden ist diese Senkung das zweite wichtige Ziel in der Transplantationsmedizin.

2.5 Zytokine

Zytokine sind, wie auch Hormone, Botenstoffe im menschlichen Organismus. Sie werden von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert und können verschiedene Funktionen wahrnehmen. Sie haben Aufgaben bei der Steuerung der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums. Auch wirken Zytokine an der Modulation der Körperantwort auf bestimmte Reize. So haben sie umfangreiche Funktionen bei der Entzündungsreaktion.

Bei Transplantatabstoßungen spielen vor allem Interleukine eine wichtige Rolle. Es handelt sich hierbei um eine Untergruppe der Zytokine, die an der Immunregulation beteiligt sind.

Allerdings ist die Einordnung der Zytokine zu bestimmten Gruppen schwierig. Viele Zytokine werden von mehreren verschiedenen Zelltypen gebildet und wirken wiederum auf unterschiedliche Zelltypen. Diese Wirkungen können auch gegensätzlicher Natur sein (z.B. pro- und antiinflammatorische Zytokine).

Durch den Nachweis von Zytokinen in menschlichen Proben erhofft man sich einen sensitiven Nachweis einer drohenden Abstoßungsreaktion. Bei der Abstoßung nach der Nierentransplantation ist etwa ein erhöhter IL-8 Spiegel im Urin zu finden (21).

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Oyster 650 P, NHS-aktiviert	Denovo Biolabels GmbH)
Oyster 550 P, NHS-aktiviert	Denovo Biolabels GmbH)
N,-N-dimethylformamid	Fluka, Laborbestand
Thimerosal	Candor Bioscience GmbH
PBS, pH 7,4	Sigma
Ethanolamin	Fluka
Bovines Serum Albumin (BSA)-	Sigma
Schutzlösung	Xantec Bioanalytics GmbH
Spottingpuffer	Xantec Bioanalytics GmbH
Natrium Acetat-Immobilisierungspuffer	Xantec Bioanalytics GmbH
Reagent diluent concentrate 2	R&D Systems
TBS	Laborbestand
Tween 20	Laborbestand
Trehalose	Laborbestand
Salzsäure 6 M	Laborbestand
NaOH 1M	Laborbestand
Ethanol 98 %	Laborbestand
Essigsäure 100%	Laborbestand

3.2 Antikörper und Antigene

3.2.1 Auflistung

Die Antikörper und Antigene werden von R'n'DSystems bezogen

Anti-human IL-1 beta Ab MAB601 AF 201 361-MI-025/CF

Anti-human IL-2 Ab MAB602 AF 202 360-MP-025/CF

Anti-human IL-3 Ab MAB603 AF 203 336-MD-025/CF

Anti-human IL-4 Ab MAB604 AF 204 343-E2-025/CF

Anti-human IL-6 Ab MAB206 AF 206 334-TK-025/CF

Anti-human IL-7 Ab MAB207 AF 207 653-E3-025/CF

Anti-human IL-10 Ab MAB217 AF 217 376-CT-025/CF

Anti-human IL-17 Ab MAB317 AF 317 717-VC-025/CF

Anti-human IL-18 Ab MAB646 AF 646 271-BME-010/CF

Anti-human IL-20 Ab MAB1102 AF 1102 266-IP-050/CF

3.2.2 Rekonstituierung der Antikörper und Antigene

Die liophilisierten Antikörper und Antigene wurden nach Herstellerangaben mit sterilem PBS und 0,005% Thiomersal – in der Funktion eines Antifoulings – rekonstituiert. Als Endkonzentration des Antikörpers wurden 1 mg/mL eingestellt. Zusätzlich befanden sich 10% Trehalose zur Stabilisierung des Antikörpers in der Lösung. Die so hergestellten Stock-Lösungen wurden bei -20°C gelagert und nach Bedarf in Aliquots für den zeitnahen Verbrauch bereitgestellt.

3.2.3. Labeln der polyklonalen Ak

Das Labeln der Antikörper erfolgte mit NHS-aktivierten Fluorophoren der oben angegebenen Wellenlängen. Das Labeln der polyklonalen Antikörper erfolgte in Konzentrationen von 1 mg/mL. Ein Optimum des Labelgrades wurde bestimmt. Abgesehen von den ersten drei Versuchsreihen wurden für alle Experimente polyklonale Antikörper aus dem gleichen Stock verwendet. Variationen zwischen den Ergebnissen durch unterschiedliche Labelgrade konnten so vermieden werden (20).

3.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Microarray-Spotter GMS 417	Genetic Microsystems
Microarray-Scanner GMS 418	Genetic Microsystems
Microarray-Scanner GenePix 4000B	Molecular Device
Biofuge stratos	Heraeus

3.3.1 Microarray-Spotter

Der Spotter dient dazu, die Antikörper auf die jeweilige Trägeroberfläche zu bringen.

Es wird zunächst ein Muster (sog. Pattern) entwickelt, das bestimmt, an welcher Stelle der monoklonale Antikörper auf dem jeweiligen Microarray-Slide aufgebracht wird (siehe Abbildung 5). Diese werden dann entsprechend des gewünschten Patterns in eine Microtiterplatte pipetiert, welche an vorgesehener Stelle im Spotter platziert wird.

Der Vorgang des Spottens selbst kann zum einen mit leicht zu reinigenden, massiven Nadeln erfolgen, die aber den Nachteil haben, dass nur wenige Spots nacheinander erzeugt werden können (62). Eine Weiterentwicklung ist der auch im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit verwandte Pin-Ring-Spotter (44). Bei diesem System wird die Probe mit Hilfe eines Metallringes aufgenommen. Während des Spottingvorgangs wird der innerhalb dieses Ringes entstandene Flüssigkeitsmeniskus von einer Nadel durchstoßen, die anschließend auf die jeweilige Trägeroberfläche trifft und einen kleinen Tropfen der Lösung dort platziert. Durch dieses Verfahren ist das Setzen von deutlich mehr Spots ohne Unterbrechung möglich. Eine Reinigung der Nadeln und Metallringe erfolgt, um Kontaminationen der folgenden Probe zu vermeiden, über das Eintauchen in verschiedene Waschlösungen.

Eine weitere Möglichkeit sind eingeritzte Nadeln, die so Flüssigkeit aufnehmen können. Diese sind allerdings mechanisch empfindlicher und können sich leichter zusetzen.

Daneben gibt es noch andere Möglichkeiten wie etwa die Nutzung eines Nanodispensers zur Microarrayherstellung und – auswertung (34;48).

Andererseits kann man auch berührungslos Proben piezoelektrisch (Tintenstrahldruckerprinzip) auf das Microarray übertragen (18;46). Der Vorteil ist, dass die mechanische Belastung für die zu benetzende Oberfläche geringer ist und diese Spotter in der Regel mehr Substrat auf einmal aufnehmen können; der größte Nachteil ist, dass die Zusammensetzung der Probe einen sehr starken Einfluss auf die Tropfenform und somit auf die Spotform hat. Ein Spotten stark visköser Substanzen ist z.B. nicht möglich. Auch ergeben sich

unter Umständen Probleme mit kleineren Sallelitentropfchen außerhalb des eigentlichen Punktes. Außerdem ist die Auswirkung von dieser Technik (Erzeugen der Flüssigkeitstropfen mit Hitze oder auf piezoelektrischem Wege) auf die Integrität der Probe nicht sicher vorherzusagen. Dies gilt insbesondere für Protein-Microarrays. DNA ist nicht so empfindlich für Konfigurationsänderungen wie Proteine, und es konnten funktionsfähige DNA-Arrays auf diese Weise hergestellt werden(18;46). Die Erstellung von Protein-Microarrays mit Nicht-Kontakt-Verfahren ist noch nicht so weit verbreitet. Zunehmend finden sich aber auch hier Anwendungsmöglichkeiten (18;23).

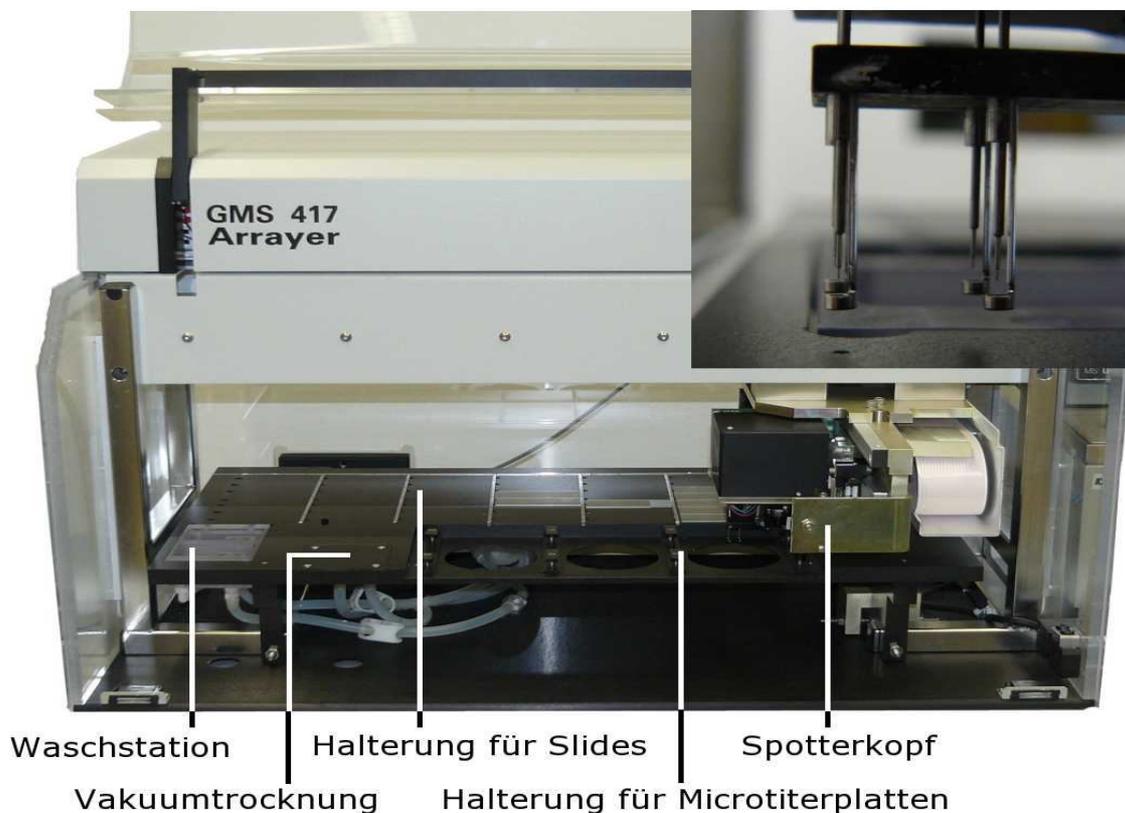


Abbildung 2: GMS 417 Arrayer; Fa. Genetic Microsystems;
kleines Bild: Pin-Ring-System des Spotterkopfes mit den vier Nadeln und jeweils einem zugehörigen Ring

3.3.2 Microarray-Scanner

Das Grundprinzip eines Array Scanners besteht darin, dass von einem Laser monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge (Cy-3-5) ausgestrahlt wird, welches in der Anregungswellenlänge des verwendeten Fluorophors liegt.

Das emittierte Fluoreszenzsignal wird über ein Linsen- und Spiegelsystem zum so genannten Photomultiplier-Tube (PMT) geleitet und dort verstärkt. Bei den verwendeten Scannern besteht zudem die Möglichkeit, weitere Parameter wie z. B. die Stärke des Lasers zu verändern. Diese Einstellungsmöglichkeiten sind notwendig, um einen ausreichend großen dynamischen Bereich abbilden zu können. Die Steuerung des Scanners erfolgt in der Regel üblicherweise mit entsprechender Computersoftware über einen herkömmlichen PC. Bei einigen Modellen sind manuelle Einstellungen am Gerät selbst vorzunehmen. Mit den verwendeten Scannern lässt sich eine Auflösung $10 \times 10 \mu\text{m}$ (GMS 418) bzw. $5 \times 5 \mu\text{m}$ (Genepix 4000 B) erreichen.

Die entstandenen Bilder geben die orts aufgelöste Fluoreszenzintensität des gescannten Microarray-Slides verlustfrei wieder.



Abbildung 3: links: GMS 418 Array Scanner; Fa. Genetic MicroSystes, rechts: Scanner GenePix 4000B; Fa. Molecular Devices

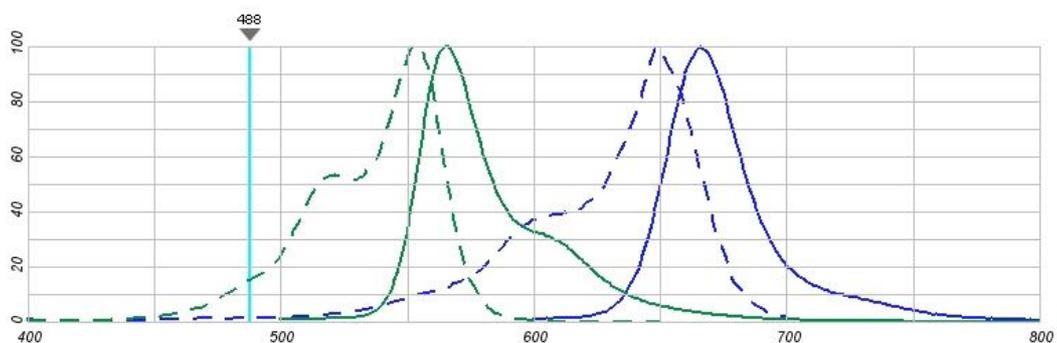


Abbildung 4: Fluoreszenz Excitation von den Farbstoffen Cy3 (grün) und Cy5 (blau)

Eine weitere Möglichkeit Microarray-Slides auszuwerten besteht über die Erfassung des Arrays mittels eines Photochips. Es wird also nicht der Slide mit einem Laser abgetastet, sondern ein Photo des Arrays angefertigt. Von Vorteil ist, dass so der gesamte Slide in einem Bild schnell erfasst werden kann. Nachteilig wirkt sich die geringere Sensitivität und niedrigere Auflösung aus (52).

3.4 Standardprotokolle (SOPs) zur Herstellung von MA-Slides

3.4.1 Spotten

Vorbereitende Arbeiten für den Spotting-Prozess umfassten die Verdünnung der Antikörper und das Beladen der Titerplatten gemäß Spottingpattern.

Für das Spotten der Slides wurde wie folgt vorgegangen. In ein Well wurde jeweils 7µl des entsprechenden mAK (1 mg/mL) bzw. 7µl des entsprechenden Markers (low-label BSA-Oy-550- bzw. BSA-Oy-650-Konjugat) zusammen mit 24,5µl 2 mM Na-Acetatpuffer gegeben. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 31,5µl. Bei geringeren Volumina eingesetzter Antikörperlösung wurde das Verhältnis zwischen Acetatpuffer und Antikörper beibehalten. Das gesamte Volumen pro Well betrug aber stets mehr als 20µl. Bei geringeren Volumina wäre eine sichere Aufnahme der Lösung durch den Spotter nicht mehr gegeben. In einem Durchgang wurden maximal 15 Slides bespottet. Zur Herstellung größerer Mengen wurden mehrere Durchgänge hintereinander durchgeführt, wobei pro Spot auf einem Slide die Nadel dreimal abgesetzt wurde (drei „Hits pro Spot“). In der Regel wurden zwei bis drei Durchgänge durchgeführt, um an einem Tag möglichst viele Slides zu erstellen.

Die Slides wurden dabei gemäß dem unten dargestellten Schema gespottet.

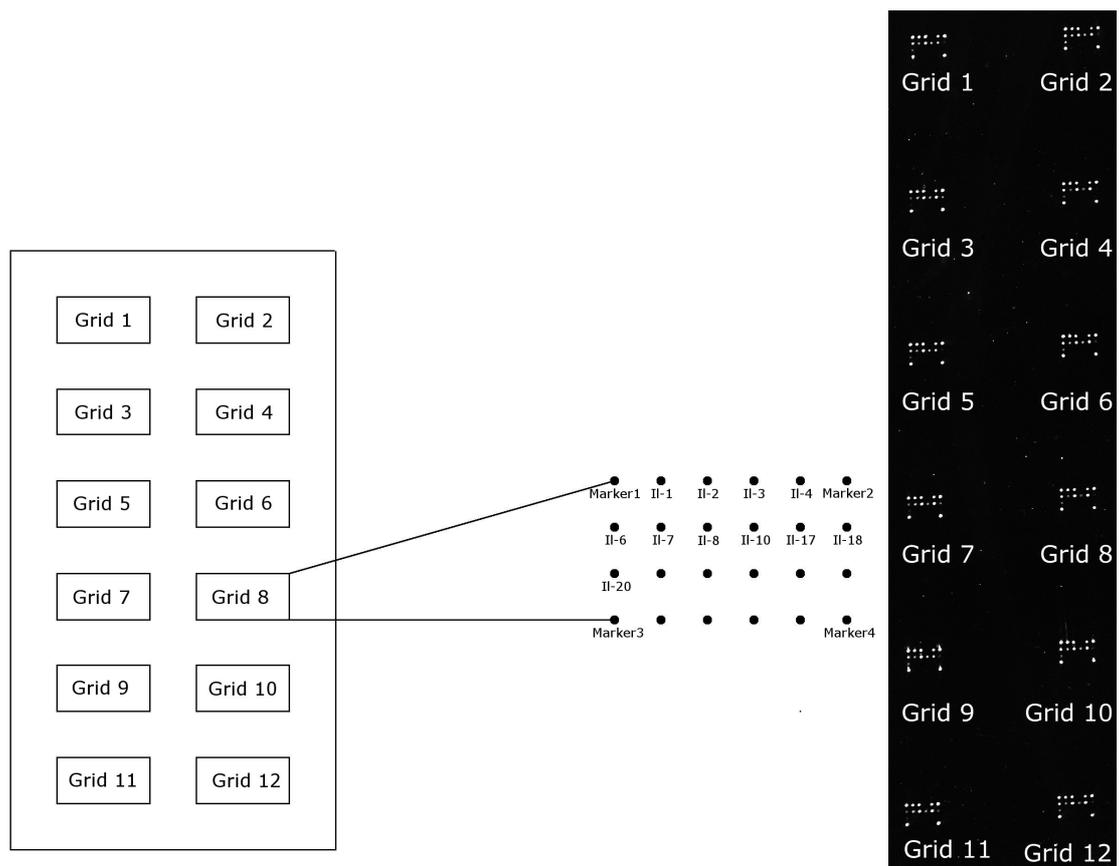


Abbildung 5: links: Schema des Aufbaus eines Slides, die Spots bestehen aus monoklonalem Antikörper gegen das jeweils angegebene Interleukin; rechts: Photo eines Scannerbildes eines nach diesem Schema gespotteten Slides nach Inkubation mit Antigen und Detektorantikörper (Scannereinstellungen: Laserpower: 100; Gain: 100)

Bei den Versuchen wurde durchgängig das in Abbildung 5 dargestellte Spotting-Pattern verwendet. Jeweils vier Grids, wobei jedes Grid 6x4 Spots enthält, werden von den vier Nadeln des Spotters in rechteckiger Anordnung auf dem Slide als sog. Metagrid aufgebracht (s. Abb. 5: Grid 1-4). Die Grids 5-8 (entspricht Metagrid 2) und 9-12 (entspricht Metagrid 3) sind Wiederholungen des gespotteten ersten Metagrids. Wie genau die Interleukine innerhalb des Grids verteilt waren, ist ebenfalls in Abbildung 5 zu sehen. In den Ecken eines Grids befand sich ein Marker in immer gleicher Konzentration. Der Durchmesser eines Spottes beträgt etwa 120 µm.

Zur Kontrolle des Spottingprozesses konnten nach einem vollständigen Durchgang über alle 15 eingesetzten Slides stichprobenartig Slides zur Kontrolle der Spothomogenität dem Scanner zugeführt werden. Da zu diesem

Zeitpunkt (vor der Inkubation mit den markierten polyklonalen Antikörpern) die Spots mit den monoklonalen Antikörpern keine oder nur eine leichte Eigenfluoreszenz zeigten, konnte die Qualität der Markerspots repräsentativ für die übrigen nicht sichtbaren Spots beurteilt werden. Diese Qualitätskontrolle war wichtig, da so vermieden werden konnte, dass mit minderwertigen Slides eine Messung gestartet wurde, die von vornherein zum Scheitern verurteilt gewesen wäre.

Der Spottingprozess wurde vollautomatisch durchgeführt. Als geeignetes Waschprogramm für die verwendeten Lösungen hat sich 15 Sekunden langes Vorreinigen in ddH₂O mit nachfolgender Endreinigung durch ebenfalls 15 Sekunden ddH₂O herausgestellt. Eine Trocknung erfolgte nach dem Vakuum-Luftstrom-Prinzip über 20 Sekunden.

3.4.2 Fluoreszenzlöschung (Quenchen)

Im Anschluss an das Spotten wurden die Slides 30-45 Minuten auf dem Schwenktisch mit Ethanolamin-Lösung, pH 8.5 inkubiert, um vorhandene reaktive Gruppen biokompatibel zu deaktivieren. Hierbei reagierten die reaktiven Succimidylester mit dem EtOHNH₂ zu freien Hydroxygruppen ab. Anschließend wurden die Slides entweder mit Aqua dest. abgespült und direkt verwendet oder in Schutzlösung eingetaucht und unter dem Luftstrom getrocknet. Danach konnten sie lichtgeschützt und luftdicht verpackt bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

3.4.3 Präparation der Inkubationskammern

Wenn Slides benutzt wurden, die nicht mit Schutzlösung überzogen waren, wurden die Kammern mit je zwei Milliliter PBS/BSA Puffer (0,1%) für 15 Minuten geblockt, um eine unspezifische Adsorption von Analyten in den Kammern zu unterbinden. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Kammern mit je zwei Milliliter PBS für je fünf Minuten. Anschließend wurden die Slides in die Kammern gegeben und die Analytlösung hinzugefügt.

Wenn Slides verwendet wurden, die zuvor zur Lagerung mit Schutzlösung überzogen worden waren, wurde statt der Blockung der Kammern eine Spülung der Slides mit PBS durchgeführt, die gleichzeitig zur Blockung der

Kammern diente. Dazu wurden die Slides mit vier Milliliter PBS für fünf Minuten in den einzelnen Kammern gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend konnte die Analytlösung zu den in den Kammern liegenden Slides gegeben werden.

3.4.4 Inkubation

Die gewünschten Konzentrationen der Analytlösungen wurden entsprechend der jeweiligen Versuchsplanung eingestellt. Es wurde humanes Material (Plasma/Vollblut) oder Diluent (Reagent diluent concentrate 2) verwendet. Bei letzterem handelt es sich um eine für die Verwendung in dem ELISA hergestellte Lösung, die als Plasmaersatz dient und für die Stabilisierung der Analyte wichtig ist.

Bei allen Versuchen mit humanem Material wurde nach Zugabe der Antigenlösung und einer sorgfältigen Durchmischung mit der jeweiligen humanen Probe eine einstündige Inkubationspause eingelegt. In dieser Zeit wurden die Proben im Kühlschrank gelagert, bevor sie in die Inkubationskammern zu den Slides gegeben wurden.

Es folgte eine Inkubationsphase von 120 bis 135 Minuten. Dabei wurden alle Spots eines Slides mit der gleichen Antigenkonzentration in Berührung gebracht. In der Regel wird deshalb für jede gewünschte Antigenkonzentration ein Slide benutzt. Anschließend wurden die Slides mehrfach gespült. Wurden die Antigene in Diluent gelöst, wurde dreimal je drei Minuten mit zwei Millilitern PBS gespült; bei der Verwendung von Serum bzw. Plasma viermal je drei Minuten mit zwei Millilitern PBS und bei der Verwendung von Vollblut siebenmal je drei Minuten mit zwei Milliliter PBS. Nach dem letzten Spülvorgang wurde möglichst gründlich die übrige Flüssigkeit aus der Kammer abgesaugt, um eine zu starke Verdünnung der nun verwendeten Lösung mit polyklonalen Antikörpern zu vermeiden.

Es wurde in jede Inkubationskammer zwei Millilitern Lösung mit polyklonalen Antikörpern gegeben, wobei zwei verschiedene Ansätze benutzt wurden. Der eine enthielt mit Oyster 550P markierte polyklonale Antikörper gegen die Interleukine 1,2,3,6,7,8,10,17,18,20; der andere mit Oyster 650P markierte

polyklonale Antikörper gegen die Interleukine 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 17, 18. Man verwendete bei allen Versuchen eine Konzentration von 500ng/ml je Antikörper.

Die Inkubationskammern wurden nach Zugabe der Antikörperlösung für zwei Stunden auf den Schwenktisch gestellt.

Anschließend wurde die Lösung mit den polyklonalen Antikörpern abpipetiert und asserviert. Diese konnten für weitere Experimente genutzt werden, da Uta Heckhoff gezeigt hat, dass die mehrmalige Verwendung einer Lösung polyklonaler Antikörper keinen negativen Effekt auf die Stärke des Fluoreszenzsignals hat [Dissertation Uta Heckhoff]. Es folgten zwei jeweils 20 Minuten dauernde Spülvorgänge mit 0,5% Tween/PBS Lösung, gefolgt von zwei jeweils fünf Minuten dauernden Spülvorgängen mit PBS. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und mit Hilfe einer Druckluftpistole getrocknet. Der Transport bzw. die Lagerung bis zum Scannen erfolgte lichtgeschützt.

Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich die verschiedenen Inkubations- und Spülschritte direkt aneinanderreihen, um ein Austrocknen der Slides während dieses Prozesses zu vermeiden.

Die Inkubationskammern mit den dazugehörigen Plexiglasdeckeln wurden direkt nach jedem Versuch mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in einer geeigneten Spülmaschine bei einer Temperatur von 50°C über 20 Minuten gereinigt.

3.4.5 Scannen der Microarray-Slides

Die Slides wurden mit den unter 3.3 vorgestellten Scannern nach den Vorgaben der jeweiligen Hersteller vermessen. Dabei wurde jeweils in drei verschiedenen Intensitäten gescannt.

3.4.6 Auswertung von Scanbildern

Die Auswertung der vom Scanner erstellten Bilder wurde mit dem Programm ImaGene 5.0 (GMS 418) oder GenePix 6.0 (GenePix 4000B) vorgenommen. Es wurde hierbei zunächst ein virtuelles Auswertungsraaster erstellt. Es handelt sich hierbei quasi um eine Schablone, die der Computer, nach manueller

Platzierung, genauer auf das Bild des Scans legt und dadurch Informationen darüber erhält, wo er welchen Spot zu suchen hat. Die Marker (siehe 3.4.1) ermöglichen durch die starke Fluoreszenz ein manuelles Platzieren des Auswertungsrasters auf dem Bild. Eine vollkommene Kongruenz zwischen diesem und dem eingescannten Bild ist nicht notwendig; der Computer erkennt automatisch die jeweiligen Spots und analysiert die Stärke der Fluoreszenz im jeweiligen Bereich. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt als Textdokument.

Unter den oben angegebenen Bedingungen sind jeweils 12 identische Spots auf dem Slide vorhanden (Abweichungen siehe 3.5). Die hieraus resultierenden zwölf Messwerte können dann einer statistischen Auswertung zugeführt werden.

Wenn mehr als 1% der Bildpunkte eines Spots oberhalb des Sättigungsbereichs liegen, ist eine starke Abnahme der Qualität der Auswertung zu erwarten (52). Deshalb wurde bei Scans, bei denen die Fluoreszenzintensitäten der Spots im Sättigungsbereich lagen, auf einen der beiden anderen simultan durchgeführten Scans mit geringerer Intensität zurückgegriffen.

3.5 Abweichungen vom Standardprotokoll

Im Folgenden sollen die Versuche erläutert werden, in denen wesentlich von dem unter 3.4 beschriebenen Vorgehen abgewichen wurde.

3.5.1 Untersuchung zur Markerverschleppung

Bei diesem Versuch wurde die Mikrotiterplatte anders als üblich gespottet, um anders aufgebaute Grids zu erhalten (Abbildung 6).

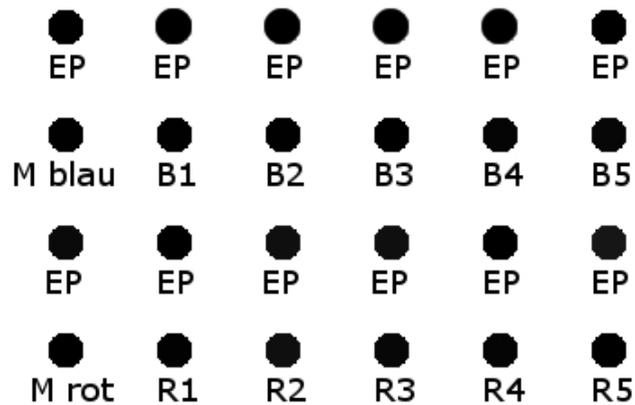


Abbildung 6: Darstellung eines Grids für die Versuche zur Markerverschleppung. Erläuterung der Abkürzungen: EP, B und R: NaAc pH 5,5 ; M blau: Oy550-Marker; M rot: Oy650 Marker.

Es wurden jeweils zunächst sechs Spots nur mit zwei mM NaAc, pH 5.5 (in Abbildung 6 als "EP" bezeichnet) gesetzt, um die Eigenfluoreszenz ermitteln zu können. Um Artefakte, die vor allem randständige Spots betreffen, auszuschließen, wurden für die Auswertung nur die Spots 2-5 der ersten Reihe verwendet.

Anschließend erfolgte das Setzen eines Spots mit Oy650-Marker (M blau), die folgenden fünf Spots nur mit Natriumacetatpuffer wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert (B1-B5). Um sicher zu stellen, dass es bei der folgenden Untersuchung des Oy550-Markers zu keiner Verschleppung des blauen Markers kommt, wurde die dritte Reihe komplett mit NaAc gespottet. Danach erfolgte das Setzen eines Punktes mit rotem Marker (M rot), gefolgt von fünf Essigsäurespots, deren Fluoreszenz ebenfalls vermessen wurde (R1-R5).

Es wurden für diese Versuchsreihe keine speziell beschichteten Slides verwendet, sondern handelsübliche Objektträger, wie sie auch bei der Lichtmikroskopie Anwendung finden. Nach dem Spotten erfolgten keine weiteren Verarbeitungsschritte wie Inkubation oder Spülung. Die Slides wurden stattdessen gleich im Scanner (GMS 418) analysiert.

Der Versuch wurde in drei Varianten durchgeführt: Erstens mit rheologischem Modifizierer und zwei je 15sekündigen Spülvorgängen, gefolgt von 20 Sekunden Trocknung, zweitens mit zwei je 20sekündigen Spülvorgängen mit je

20 Sekunden Trocknung nach jedem Spülvorgang mit rheologischem Modifizierer und drittens mit zwei je 20sekündigen Spülvorgängen mit je 20 Sekunden Trocknung nach jedem Spülvorgang ohne rheologischen Modifizierer.

3.5.2 Verwendung von Silikonkammern zur Inkubation

Es wurde im Laufe der Versuche eine neue Variante des Systems zur Inkubation der Objektträger getestet. Die oben unter 3.4.3 und 3.4.4 genannten Prozessschritte blieben dabei im Prinzip unverändert.

Allerdings wurde nicht wie bisher ein Slide komplett mit einer Analytlösung inkubiert, sondern eine Silikonform aufgepresst, die es ermöglicht, zwölf Einzelanalytlösungen auf dem Slide zu inkubieren. Es wurde eine Silikonform verwendet, die genau auf einen Slide passte und zwölf Inkubationskammern für die zwölf Grids bereitstellt. Jede Kammer enthielt dann also eines der in Abbildung 5 mit Grid1 bis Grid12 bezeichneten Grids. Bei dem neuen System konnte in jede der Kammern eine Lösung unterschiedlicher Antigenkonzentrationen pipetiert und voneinander unabhängig vermessen werden. Dabei wurde im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit immer 100µl Lösung verwandt.

Vor der Versuchsdurchführung wurde die Silikonform in 10% Ethanollösung im Ultraschallbad für 30 Minuten gereinigt. Danach erfolgte nochmals eine Reinigung unter fließendem destilliertem Wasser. Abschließend wurde die Form an der Luft getrocknet und auf einem bespotteten Microarray-Slide fixiert (Abbildung 7). Nach der Inkubation mit den Analytlösungen wurden die noch auf dem Slide fixierten Kammern einmal mit PBS gespült, danach wurde die Silikonform entfernt und der Slide in eine der oben beschriebenen herkömmlichen großen Kammern zur nachfolgenden Inkubation mit der Detektorantikörperlösung gelegt. Alle weiteren Schritte entsprechen dem oben beschriebenen Standardprotokoll.

Für die statistische Auswertung wurden die verwendeten Excel-Makros den Versuchsbedingungen angepasst.

Dieser Versuch wurde in drei unterschiedlichen Variationen durchgeführt; beim ersten Durchgang mit je einer Antigenkonzentration pro Inkubationskammer (das heißt, dass es für jedes Interleukin bei jeder Antigenkonzentration nur einen einzigen Messpunkt gibt), beim zweiten Durchgang wurden nur sechs Interleukinkonzentrationen vermessen, dafür aber jeweils in doppelter Ausführung (d.h. zwei Messpunkte pro Interleukin und Antigenkonzentration), der dritte Durchgang glich dem zweiten Durchgang, nur dass dieses Mal ein Slide verwendet wurde, der nach dem Spotten vor der Verwendung acht Monate bei -20°C gelagert worden war.



Abbildung 7: Die verwendete Flexiperm® Inkubationskammer (links) und das zusammengebaute Inkubationssystem aus dem bespottetem Slide und der mit drei Klammern befestigten Inkubationskammer (rechts)

3.5.3 Versuche zum Vergleich verschiedener Hydrogel-Typen

Bei diesen Versuchen wurde verglichen, ob die HC- oder die C-Matrix eine bessere Performance liefert. Dazu wurden zunächst Slides gemäß Abbildung 8 gespottet:

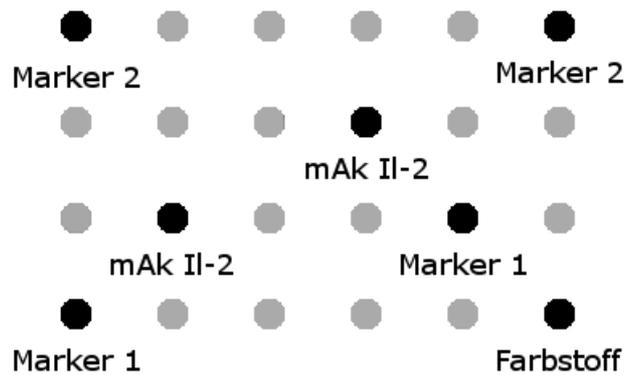


Abbildung 8: Gespottetes Muster bei dieser Versuchsreihe: Marker 2 steht dabei für den leichter fluoreszierenden, Marker 1 für den stärker fluoreszierenden Marker. Die grau dargestellten Punkte wurden nicht gespottet.

Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.4 angegebenen Standardprotokoll. Allerdings wurden keine verschiedenen Konzentrationen vermessen. Es wurde stattdessen immer die gleiche Konzentration von 800 bzw. 1000 pg/ml IL-Mix verwendet. Dafür wurden Slides verschiedener Aktivierungsgrade jeweils mit C- und HC-Matrix verwendet.

4 Ergebnisse

Die Herstellung eines Microarrays bis zu einem IVD ist eine sehr komplexe Prozesskette, in der verschiedene chemische, physikalische und biologische Parameter in der Art optimiert werden müssen, dass ein analytisch sinnvoller Bereich mit der jeweiligen Detektionsmethode erreicht werden kann. Dieser Prozessweg erstreckt sich von der Herstellung der Mikroarray-Slides, deren Aktivierung mit anschließender chemisch-kovalenter Immobilisierung der Fängermoleküle über die Inkubationsmethoden und Waschschriffe bis hin zur Validierung der Ausleseparameter und Datengenerierung.

Folgende Parameter bei der Herstellung des Labormusters eines Mikroarrays konnten als kritisch/fehlerbehaftet identifiziert werden:

Vorgang des Spottens

Antikörperqualität

Letzteres äußerte sich z. B. darin, dass für einige Antigene bei der Vermessung einer Konzentrationsreihe kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Auch gab es in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsmedien, in denen die Antigenlösung auf den Mikroarray-Slide einwirkte, unterschiedliche Ergebnisse.

Als sehr problematisch stellte sich die Verwendung des vorhandenen Mikroarray-Spotters bei größerer Anzahl zu spottender Slides heraus. Es kam schon nach ca. 15 gespotteten Slides zu einem Abriss des Flüssigkeitsfilms in den Ringen. Stabilisierende Zusatzstoffe konnten dieses Problem zwar reduzieren, allerdings wurde dadurch die Reinigungsfunktion der Nadeln negativ beeinträchtigt.

Auf Seiten der Antikörper trat eine komplett fehlende Funktionsfähigkeit ebenso auf wie eine ungenügende Spezifität.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen, die zur Optimierung und qualitativen Einschätzung einzelner Prozessschritte durchgeführt wurden, dargestellt.

4.1 Versuche zum Microarray-Scanner

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die unter 3.3.2 beschriebenen Scanner eingesetzt. Beide wurden zunächst mit mehreren Probescans auf gerätespezifische Abweichungen hin untersucht. Auf zwei Aspekte wurde dabei besonders geachtet: Zum einen wurden die Abweichungen der ermittelten Fluoreszenz eines Spots bei wiederholter Messung analysiert, zum anderen wurde überprüft, inwieweit die Positionen der eingelesenen Spots bei dem wiederholten Scan voneinander abwichen. Dies war insoweit wichtig, da verschiedene Slides mit unterschiedlichen Scannereinstellungen vermessen wurden. Optimalerweise sollten alle Scans eines Slides deckungsgleich sein, bzw. die Abweichungen sollten so gering sein, dass die „Auto Adjust Spots“ Funktion (automatische Anpassung des Auswertungsrasters) diese ausgleichen kann. Ein manuelles Anpassen des Auswertungsrasters vor jedem Scan ist umständlich und bei Scans in geringer Intensität auch nicht möglich. Zum besseren Verständnis der Funktion des „Auto Adjust Spots“ bzw. des Auslesens der gescannten Slides allgemein wird dieser Arbeitsschritt im Folgenden erläutert.

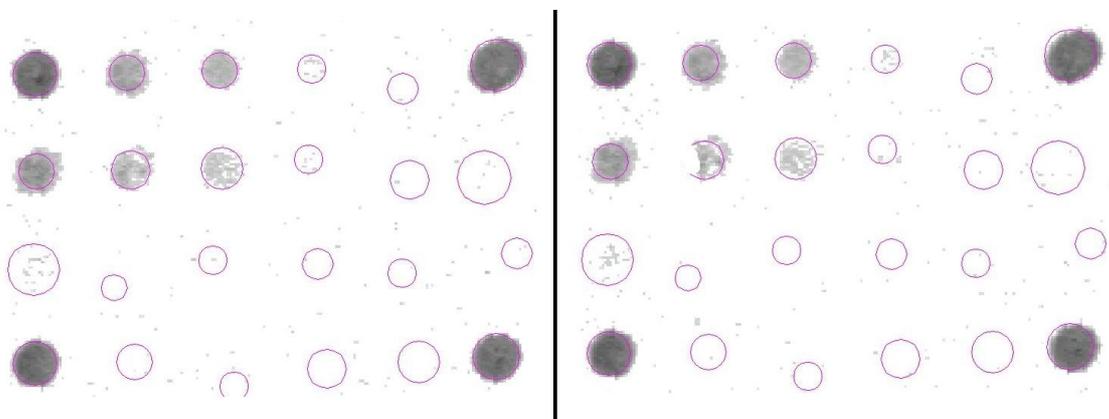


Abbildung 9: Verwendung des gleichen Auswertungsrasters für Scans des gleichen Slides (Scanner: GMS 418 (Einstellungen: Laserpower: 100; Gain: 100; Kontrast für verbesserte Darstellung manuell verstärkt; Auswertung über die Software ImaGene 5.0))
Links: Das linke Grid zeigt das an den ersten Scan eines Slides automatisch angepasste Auswertungsraaster. Die Fläche innerhalb der Kreise ist der vom Programm als Spot erkannte und entsprechend vermessene Bereich.
Rechts: Der Scan wurde durch einen weiteren des gleichen Slides ersetzt. Das Auswertungsraaster wurde in der Position nicht verändert und nicht an das neue Bild

angepasst. Trotzdem ist nur eine minimale Abweichung des zweiten Scans von ca. 20 μm nach rechts zu erkennen. Diese Abweichung kann über die Funktion „Auto Adjust Spots“ ohne Probleme korrigiert werden (Daten nicht dargestellt). Das Auflegen eines neuen Rasters ist nicht erforderlich.

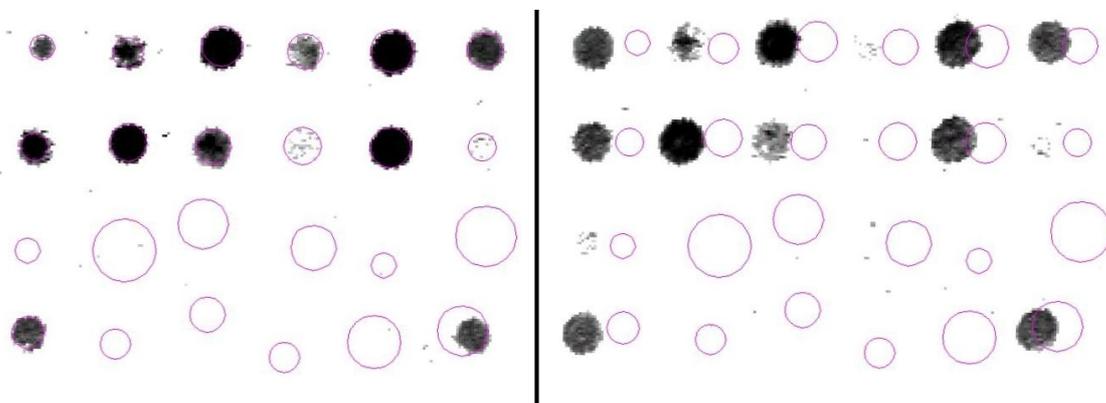


Abbildung 10: Verwendung des gleichen Grids für Scans verschiedener Slides (Scanner: GMS 418 (Einstellungen: Laserpower: 100; Gain: 100; Kontrast für verbesserte Darstellung manuell verstärkt; Auswertung über die Software ImaGene 5.0)

Links: Das linke Grid zeigt das an den ersten Scan eines Slides angepasste Auswertungsgrid.

Rechts: Dieser Scan wurde durch einen weiteren eines anderen Slides ersetzt (rechtes Grid). Das Auswertungsgrid wurde in der Position nicht verändert und nicht an das neue Bild angepasst. Man erkennt eine Verschiebung des zweiten Bildes um ca. 100 μm nach links.

Eine Abweichung von dieser Größe, die fast die Hälfte des Abstandes zwischen zwei Spots beträgt, konnte durch die Funktion „Auto Adjust Spots“ nicht mehr sicher korrigiert werden. Hier bestand die Gefahr, dass das Programm einem Punkt des Auswertungsgriders den falschen Spot des Grids zuordnet (Daten nicht dargestellt). Die Platzierung eines neuen Rasters war daher erforderlich.

Für die Ermittlung der Abweichung in der ermittelten Fluoreszenz bei wiederholtem Scannen wurde ein bereits inkubierter Slide 15-mal hintereinander gescannt (Einstellungen LP50 G50). Als Referenzpunkt wurde in diesem Fall der Spot für IL-1 im Grid 2 (Abbildung 5) gewählt.

Mit dem Programm ImaGene 5.0 wurden für jeden der 15 Scans die ermittelten Signalintensitäten des oben genannten Spots miteinander verglichen.

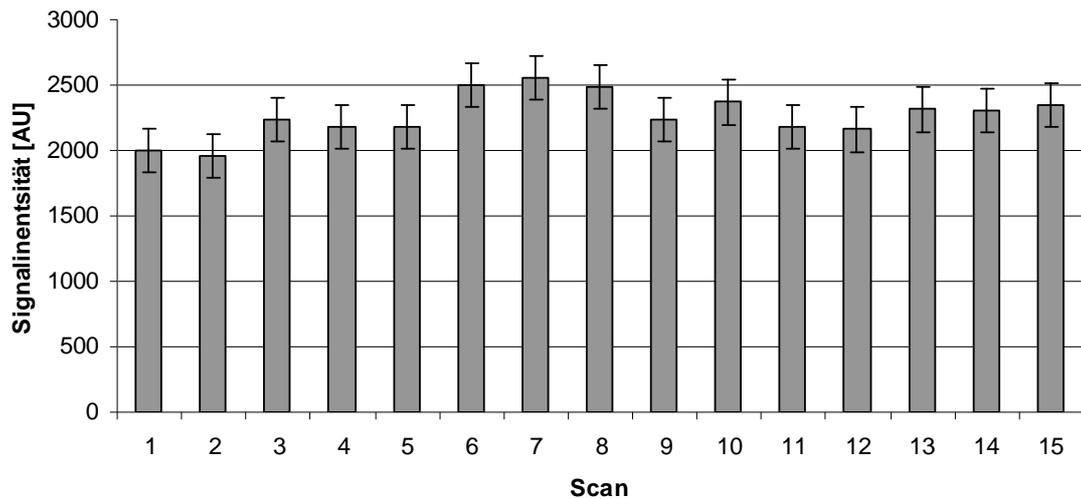


Diagramm 1: mehrfacher Scan des gleichen Slides (Scanner: GMS 418; Einstellungen: Laserpower: 50 Gain: 50; Farbstoff: Oyster 650P) mit automatischer Anpassung des Auswertungsrasters („Auto Adjust Spots“). Es zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots beim wiederholten Scannen. Ein photoinduziertes „Bleaching“, also eine Abnahme der Signalintensität bei wiederholtem Scannen, kann nicht abgeleitet werden.

Die intra-systemische Standardabweichung beträgt 7,5%. Die absolute Abweichung beträgt bis zu 23%.

Legte man bei der Auswertung auf jedes Bild ein neues Auswertungsraster, statt das alte - wie in Diagramm 1 - nur neu anzupassen, ergaben sich keine anderen Ergebnisse (Daten nicht dargestellt). Verzichtete man auf die automatische Anpassung des Auswertungsrasters, verschlechterten sich die Ergebnisse deutlich. Diese Daten gelten nur, wenn der gleiche Slide mehrfach gescannt wurde und dabei nicht zwischendurch manuell bewegt wurde. Wurde dieser Slide zwischenzeitlich aus dem Gerät entfernt oder wurde ein anderer Slide untersucht, war bei der Auswertung ein neues Auswertungsraster zu verwenden. (Daten nicht dargestellt).

Ein anderes Bild ergab sich für die Arbeit mit dem Scanner von MD. Das Vorgehen ist im Prinzip genauso wie für den GMS 418. Als Messpunkt wurde der Punkt IL-8 im Grid 1 (Abbildung 5) gewählt.

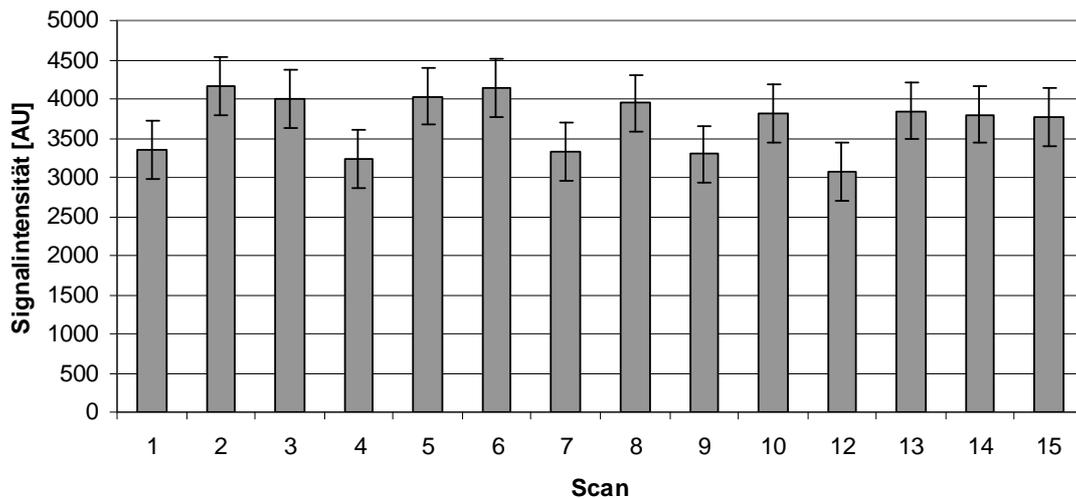


Diagramm 2: mehrfacher Scan des gleichen Slides (Scanner: GenePix 4000B; Einstellungen: PMT-Power: 900, Laserpower: 100; Farbstoff: Oyster 650P). mit automatischer Anpassung des Auswertungsrasters

Die intra-systemische Standardabweichung beträgt etwa 10%. Die absolute Abweichung beträgt bis zu 26%.

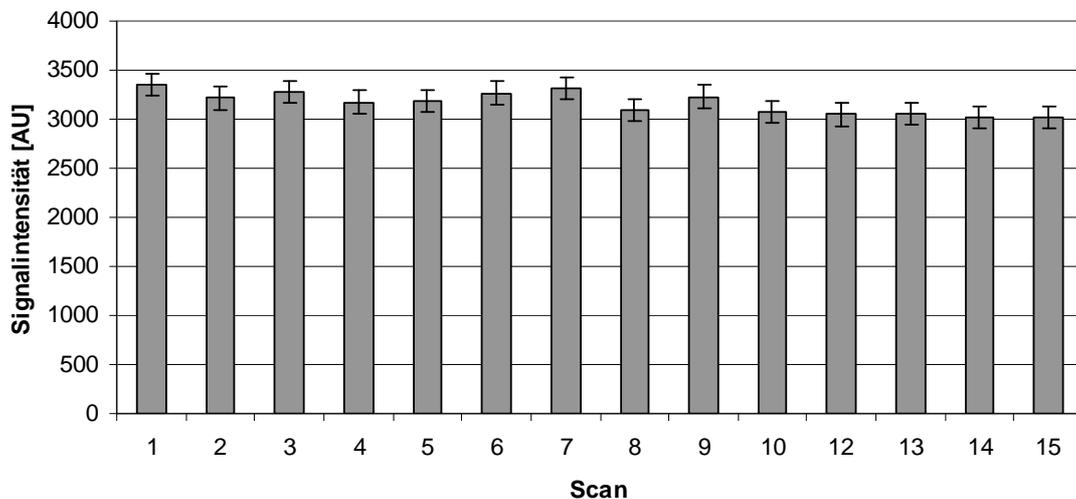


Diagramm 3: mehrfacher Scan des gleichen Slides (Scanner: GenePix 4000B; Einstellungen: PMT-Power: 900, Laserpower: 100; Farbstoff: Oyster 650P). ohne automatische Anpassung des Auswertungsrasters

Die intra-systemische Standardabweichung beträgt etwa 3,6%. Die absolute Abweichung beträgt bis zu 10%.

Bei dem Scanner GenePix 4000B zeigte sich also, dass die Abweichungen in der gemessenen Intensität zwischen den Scans zunahmten, wenn man das Auswertungsraster automatisch anpasste. Dies entspricht der umgekehrten Situation im Vergleich zum Scanner GMS 418. Verzichtete man auf die Anpassung, ließ sich die Standardabweichung zwischen den Scans beim GenePix 4000B deutlich unter die des GMS 418-Scanners senken.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Diagramme sind, sofern keine anderen Angaben gemacht werden, aus Messungen des Genetic Microsystems GMS 418 Scanners hervorgegangen. Der GenePix4000B-Scanner stand zu Beginn der Arbeit noch nicht zur Verfügung. Während der Arbeit durchgeführte Messungen zeigten, dass er präziser arbeitet. Allerdings wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit folgende Versuchsreihen weiter mit dem GMS 418 durchgeführt. Für weiterführende Versuche ist aber der GenePix 4000B geeigneter.

Beachtenswert ist auch, dass es weder beim GMS 418 Scanner noch beim MD 4000B Scanner zu einem nennenswerten Photobleaching-Effekt kam. Hierfür war in erster Linie die sehr gute Stabilität der hier verwendeten Farbstoffe verantwortlich (siehe auch 5.3).

4.2 Versuche zum Spotten

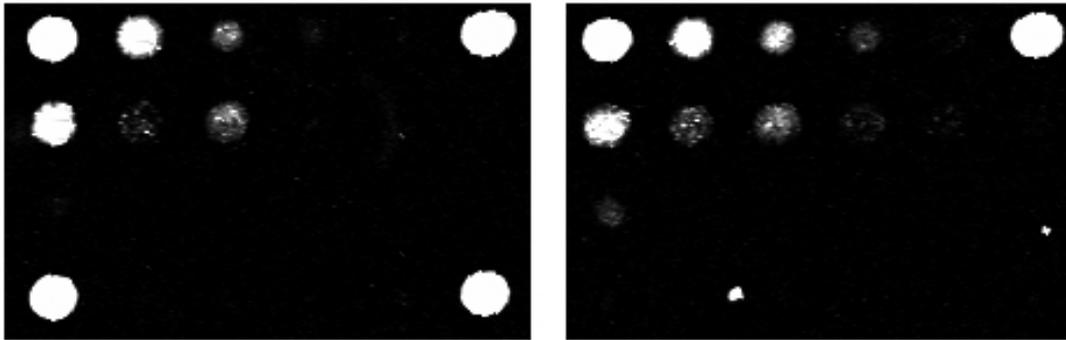
Als Grundproblematik für das Microarray-Projekt zeigte sich die Verwendung des Spotters. Dieses ist ursächlich auf die mechanische Probenapplikation durch das Pin-Ring-System zurückzuführen.

Zwei Effekte führten zu erheblichen Problemen in der Produktion von Microarrays:

der frühzeitige Verlust des Flüssigkeitsmeniskus im Metallring der Pin-Ring-Einheit,

die unzureichende Reproduzierbarkeit des applizierten Probenvolumens pro Pin-Kontakt.

Ersteres hat zur Folge, dass Spots nach einem Miniskusabriss auf allen folgenden Slides fehlen. Abbildung 11 zeigt exemplarisch Ausschnitte von zwei Slides eines Spot-Durchgangs.



1. Slide

14. Slide

Abbildung 11: Folgen eines Miniskusabrisses bei einem Spottingdurchgang von 14 Slides (Scans nach Inkubation mit Antigen und polyklonalen Antikörpern);

links: vollständig gespotteter Slide (Slide 1), in den Ecken jeweils Marker; andere Spots diverse Antikörper

rechts: unvollständig gespotteter Slide (Slide 14), in den Ecken jeweils Marker; andere Spots diverse Antikörper

Deutlich sind hier die Fehlstellen unten links und unten rechts zu erkennen.

Um das Problem des Meniskenabrisses zu minimieren, wurde dem Spottingpuffer ein rheologischer Modifizierer zugesetzt, der a) leicht die Oberflächenspannung herabsetzt und b) die Verdunstungsrate senkt. Hierbei kam es jedoch zu der in Abbildung 12 dargestellten Beobachtung:

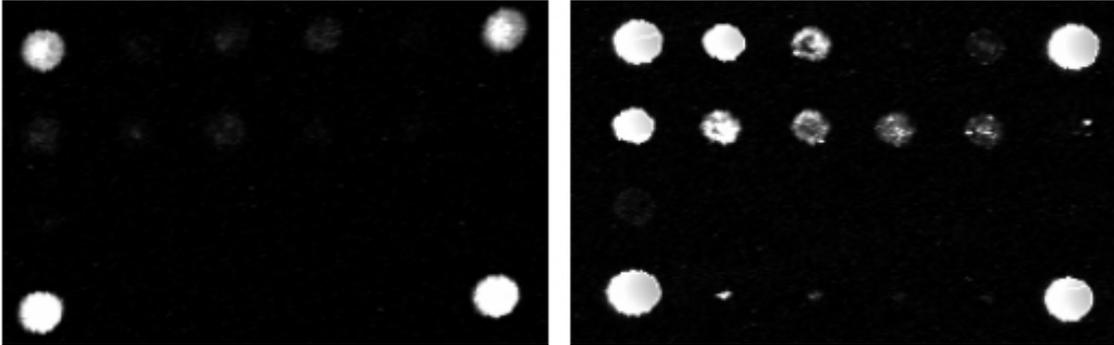
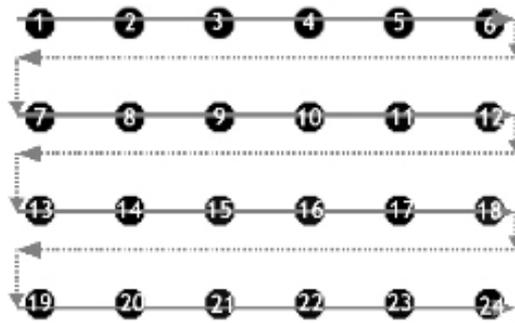


Abbildung 12: Darstellung der Verschleppung von Markersubstanz

oben: schematische Darstellung der Reihenfolge der Spots bei der Erstellung des Grids

links: Bild eines Grids von einem regelrecht gespotteten Slide vor der Inkubation mit Antigen und polyklonalen Antikörpern: Die Markerspots (BSA-Oy550, 500 µg/mL in 2 mM NaAc, pH 4.5) in den Ecken eines Grids fluoreszieren stark, die Antikörperspots sind, bedingt durch eine geringe Eigenfluoreszenz des Proteins, kaum zu erkennen.

rechts: Bild eines Grids von einem anderen Slide ebenfalls vor der Inkubation mit Antigen und polyklonalen Antikörpern. Es ist eine deutliche Fluoreszenz der Antikörperspots zu erkennen, die nicht mehr durch die Eigenfluoreszenz der Proteine erklärbar ist.

Um diese Problematik näher zu untersuchen, wurde der unter 3.5.1 erläuterte Versuch durchgeführt.

Das Ergebnis für BSA-Oyster650-Marker zeigt Diagramm 4:

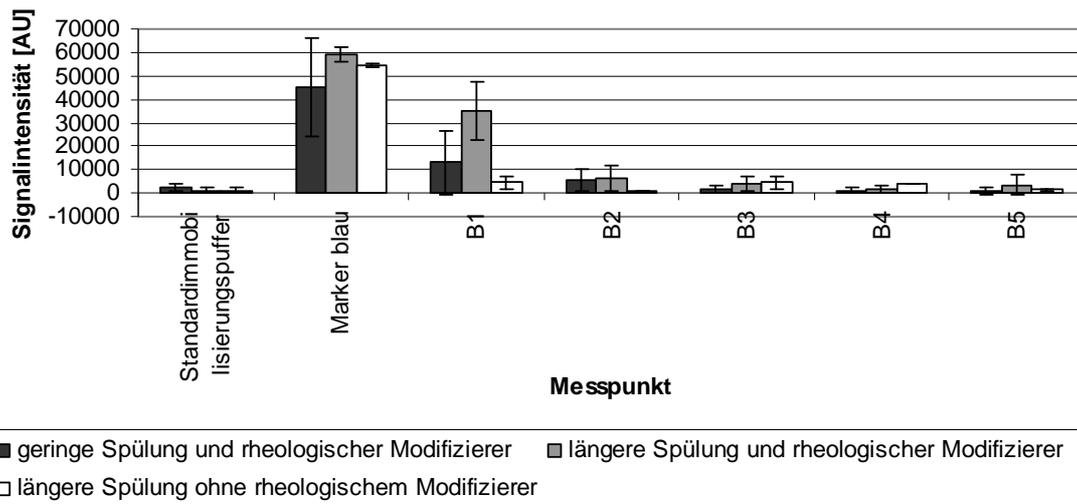


Diagramm 4: Vergleich der Fluoreszenzen der in Abbildung 6 dargestellten Spots (Lasereinstellungen 100/100)

Es wurde die Fluoreszenz des jeweiligen Markerspots mit den Fluoreszenzen der darauf folgenden Essigsäurespots/“Blindspots“ (B1 - B5) verglichen. Zum Vergleich ist zusätzlich die Grundfluoreszenz des normalen Immobilisierungspuffers (2 mM NaAc, pH 4.75) vergleichend aufgetragen. Erwartungsgemäß zeigt der Markerspot eine starke Fluoreszenz. Die Punkte, die direkt nach dem Marker gespottet wurden, zeigen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität. Eine Intensivierung der Spülvorgänge des Spotters wie unter 3.5.1 beschrieben zeigt keinen Effekt. Bei Verzicht auf den rheologischen Modifizierer bessert sich das Ergebnis.

Für die Übertragung der Ergebnisse auf eine mögliche Verschleppung - nicht nur der Marker, sondern auch der Antikörperlösungen - ist wichtig zu wissen, dass die Spottinglösungen für Marker und Antikörper identisch in der Proteinkonzentration waren.

4.3 Versuche zu verschiedenen Microarrayslide-Beschichtungen

Neben dem Vorgang des Spottens und des Scannens selbst ist die Qualität des erhaltenen Signals auch von der Qualität bzw. der Oberflächenbeschichtung der Slides abhängig. Aus diesem Grund wurden verschiedene Messungen durchgeführt. Ziel war es zu ermitteln, welche Beschichtungen und welcher Aktivierungsgrad des Slides eine möglichst hohe Antikörperbindung und damit eine Maximierung der Fluoreszenz ermöglichen.

Der Versuchsaufbau ist unter 3.5.3 beschrieben.

Hierbei wurden zwei verschiedene Typen Slides von XanTec mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen zur Verfügung gestellt:

HC → lineares, biokompatibles Polycarboxylat

C → Maleinsäure-PEG-Copolymer

Bei der Messung der Eigenfluoreszenz des Slides nach der Inkubation ergab sich ein Wert von 394,6 AU für den Slide mit der C-, bzw. 249,7 AU für den mit der HC-Oberfläche. Dieser setzt sich aus der Fluoreszenz der verwendeten Oberflächenmatrix und anderer Substanzen, die sich nach der Inkubation auf dem Slide befanden (Antigen, Antikörper, andere Partikel/Fremdkörper) zusammen. Der Anteil der letztgenannten Substanzen ist allerdings klein, da durch die Waschschritte außerhalb der regulären Spots haftende Substanzen größtenteils entfernt wurden. Die Fluoreszenzintensität war demnach auf eine geringere Eigenfluoreszenz des verwendeten Polymers zurückzuführen

Im Hinblick auf die Spotqualität (Uniformität, Homogenität und Schärfe der Begrenzung der Spots) war die HC-Oberfläche der des Maleinsäure-PEG-Copolymers überlegen (Daten nicht dargestellt). Die Punkte waren deutlich schärfer begrenzt.

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine hohe Nachweisempfindlichkeit und Sensitivität auch bei weniger affinen antikörperbasierten Detektionssystemen ist die Immobilisierungskapazität. Um diese bei den zur Verfügung stehenden Slides zu untersuchen, wurde das unter 3.4 dargestellte experimentelle Vorgehen modifiziert. Es wurden weniger Spots gesetzt. Aufgetragen wurden drei verschiedene Marker (unterschiedlicher Intensität) und Antikörper gegen IL-2. Es wurde mit einer Antigenkonzentration von 800 pg/ml (Diagramm 5) bzw. 1000 pg/ml (Diagramm 6) inkubiert. Ansonsten entsprach das Vorgehen dem unter 3.4 genannten Protokoll. Zur Ermittlung des Fluoreszenzwertes, der in den folgenden beiden Diagrammen dargestellt ist, wurde jeweils der erste IL-2 Spot aus jedem Grid berücksichtigt und für den jeweiligen Slide der Mittelwert von allen dieser Spots gebildet.

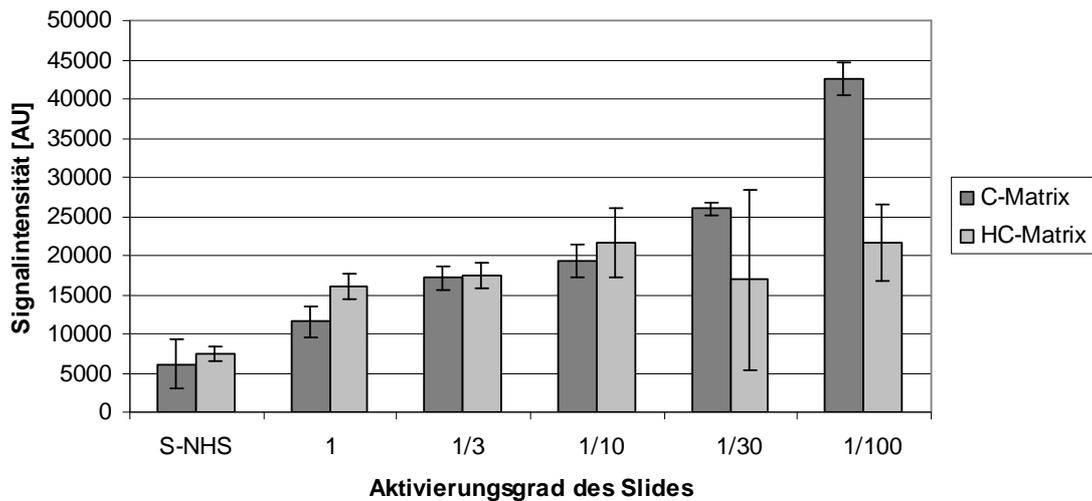


Diagramm 5: Vergleich der C- mit den HC-Matrix-Slides bei verschiedenen Aktivierungsgraden (Scannereinstellungen: Laserpower: 100; Gain: 100)

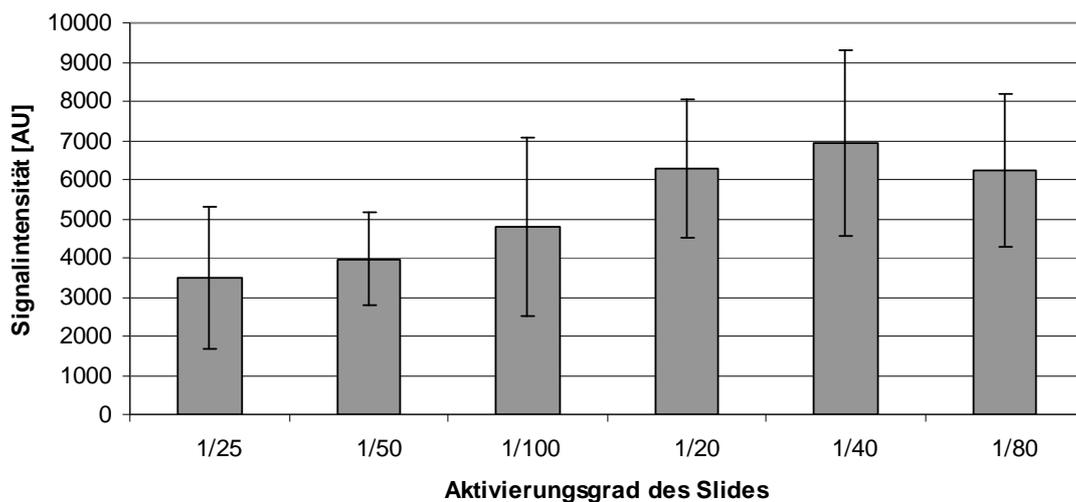


Diagramm 6: Darstellung der Fluoreszenz eines C-Matrix-Slides bei verschiedenen Aktivierungsgraden (Scannereinstellungen 60/40). In Ergänzung zu Diagramm 5 wurden bei dieser Versuchseihe weitere Aktivierungsgrade untersucht. Es zeigt sich ein Maximum der Signalintensität bei 1/400.

Der HC-Matrix Slide zeigte eine maximale Signalstärke bei einem Aktivierungsgrad von 1/10, der C-Matrix Slide zeigte eine maximale Signalstärke bei einem Aktivierungsgrad von 1/400.

Zusammenfassend stimmten die Ergebnisse der beiden zu diesem Thema durchgeführten Versuchsreihen überein. Es konnte eine höhere Signalintensität des C-Matrix-Slides festgestellt werden. Bei niedrigen Aktivierungsstufen betrug der Unterschied zwischen 53% und 97%.

Da die bisher aufgeführten Messungen jeweils in Diluent mit zugespiktem Interleukin-Mix durchgeführt wurden, die Slides in der klinischen Anwendung aber mit Plasma inkubiert werden sollen, wurden Messungen zum Verhalten der beiden verschiedenen Matrices bei Inkubation mit humanem Plasma durchgeführt.

Dazu wurden 100 Mikroliter des Farbstoffes Oyster 650 in einer Konzentration von 1mg/ml in zehn Milliliter Plasma gegeben. Jeweils zwei Slides eines Typs wurden über zwei Stunden mit je zwei Milliliter dieser Lösung inkubiert. Nachfolgend entsprechend dem Standardprotokoll (siehe 3.4) über zweimal 20 Minuten mit PBS/Tween 0,05%, dann zweimal fünf Minuten in PBS inkubiert und anschließend mit ddH₂O abgespült und im Druckluftstrom getrocknet. Anschließend wurde bei jeweils zwei Slides mit C- bzw. HC-Matrix die durchschnittliche Fluoreszenz über eine Fläche von 430 mm² ermittelt. Aus dieser Messung ergaben sich für jede Beschichtung folglich zwei Werte. Der daraus gebildete Mittelwert ist in Diagramm 7 dargestellt.

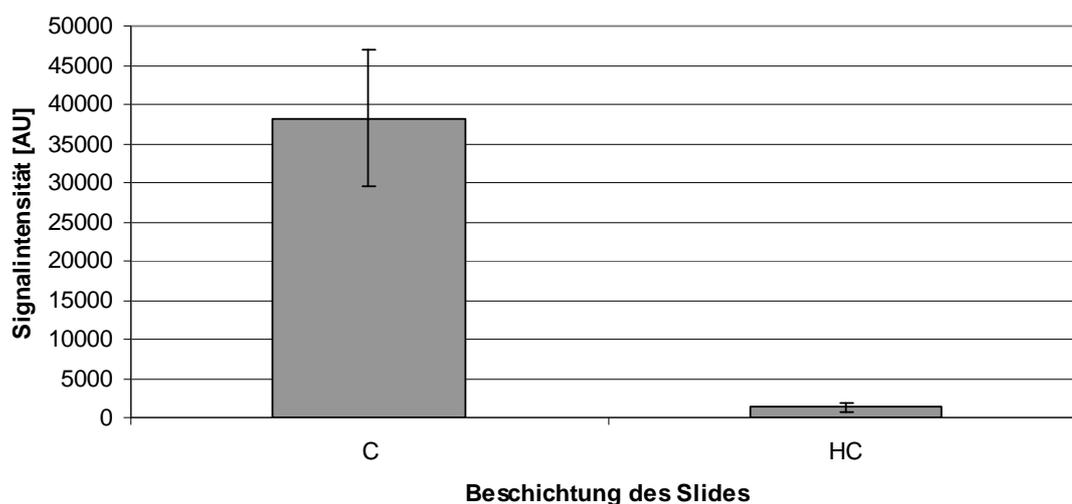


Diagramm 7: Vergleich der über den gesamten Slide gemittelten Fluoreszenz nach der Inkubation mit Fluoreszenz-Plasma (Scannereinstellungen 50/50).

Der C-Matrix-Slide zeigte deutlich mehr Interaktionen (hydrophobe Wechselwirkungen / ionische Wechselwirkungen) mit den Bestandteilen des Blutes, die durch die Anfärbung vor allem der positiv geladenen Proteine und der negativen Polymermatrix des Plasmas sichtbar gemacht wurden.

4.4 Photostabilität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Beurteilung der Beständigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes Oyster 550P gegenüber Photobleaching wurden aus der ersten Versuchsreihe fünf Slides für einen Lagerversuch entnommen. Diese Slides waren zuvor mit 1pg/ml bzw. 1000pg/ml Antigenkonzentration und anschließend mit polyklonalen Antikörpern (siehe Protokoll unter 3.4) inkubiert worden. Wie üblich wurde auch hier nicht nur ein Spot berücksichtigt, sondern jeweils der Mittelwert aller zwölf Spots eines Slides zu Grunde gelegt. 41 Tage lang wurden alle Slides unter Lichtausschluss gelagert. Anschließend wurden zwei Slides entnommen und einer für Innenräume typischen Lichtexposition ausgesetzt. Beide Chargen wurden unter gleichen Bedingungen in variablen Zeitabständen wiederholt gescannt, so dass eventuelle Photobleaching-Effekte durch Laserexposition bei beiden Chargen identisch waren.

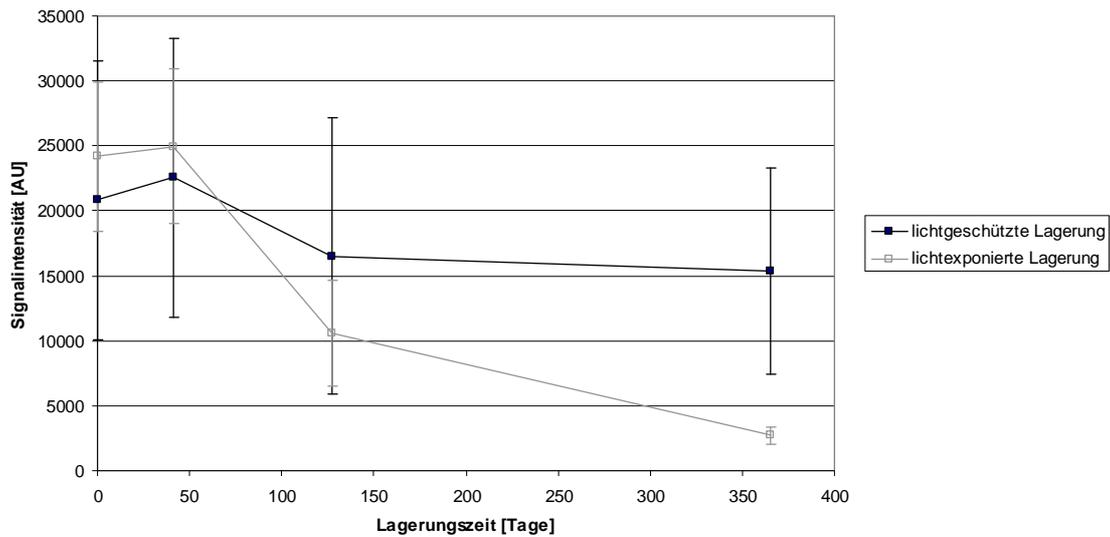


Diagramm 8: Photostabilität des Farbstoffes. Es ist jeweils der Mittelwert aller IL-18-Spots eines Slides angegeben (Scannereinstellungen: Laserpower 100; Gain 100).

Bei Lagerung unter Lichtausschluss sinkt in den ersten 41 Tagen bei beiden Slides die Signalintensität nicht ab. Anschließend fällt diese beim lichtexponierten Slide deutlich schneller ab als beim weiterhin lichtgeschützt gelagerten Slide.

Die Ergebnisse für die anderen Slides und Interleukin-Spots werden hier nicht dargestellt, zeigten aber ein ähnliches Verhalten.

4.5 Biologische Komponenten im Interleukin-Microarraysystem

Nach den Untersuchungen zu den gerätebedingten und substratabhängigen Faktoren, die die Qualität des IVDs beeinflussen, ist das weitaus wichtigste Kriterium – gerade im Bereich der multiplexen quantitativen Bestimmung verschiedener Analyte – die Spezifität der verwendeten Antikörper zum jeweiligen Antigen. So genannte Kreuzreaktivitäten können für eine Verfälschung von Messwerten in allen Messbereichen eines Einzelassays verantwortlich sein.

Um die Spezifität zu testen, wurde das in Kapitel 3.4 aufgeführte Protokoll leicht modifiziert. Im Gegensatz zu der dort beschriebenen Vorgehensweise wurden alle Slides mit der gleichen Antigenkonzentration (2000pg/ml) inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation für zwei Stunden in einer Lösung, die nur polyklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Interleukin (IL-

1beta,2,3,4,6,7,10,17, oder 18) enthielt. Bei allen Proben entsprach die Konzentration des betrachteten Antikörpers der Konzentration des Antikörpers im sonst verwendeten Antikörper-Mix. Zwei weitere Slides wurden zum einen mit dem auch sonst verwendeten Interleukin-Mix, zum anderen mit einer antikörperfreien Diluentmischung als Negativkontrolle inkubiert.

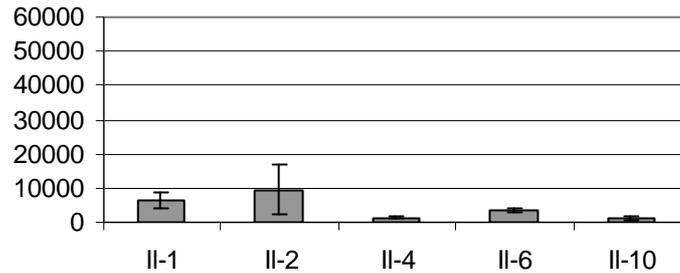


Diagramm 9: Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides mit Diluent ohne pAK (Negativkontrolle) (Scannereinstellungen: 100/100; x-Achse: Interleukin; y-Achse: Signalintensität [AU])

Es zeigt sich vor allem für IL-1 und IL-2 eine gesteigerte Signalintensität.

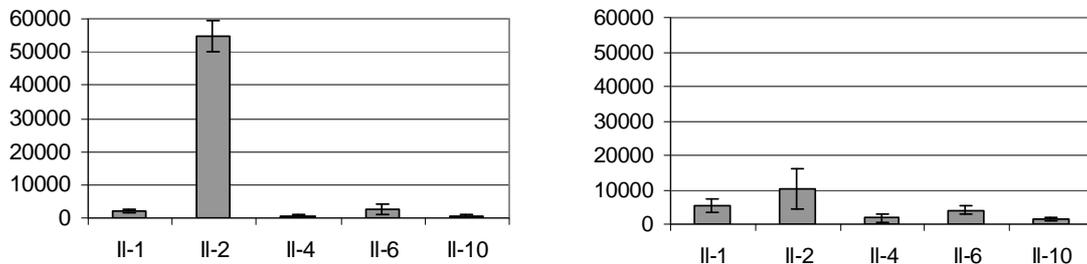


Diagramm 10:

links: Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides pAK gegen IL-2 (Scannereinstellungen: 100/100; x-Achse: Interleukin; y-Achse: Signalintensität [AU]) Es zeigte sich eine gute Spezifität des polyklonalen Antikörpers. Ähnlich eindeutige Ergebnisse zeigten sich für pAK gegen IL-6.

rechts: Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides pAK gegen IL-10 (Scannereinstellungen: 100/100; x-Achse: Interleukin; y-Achse: Signalintensität [AU]) Die Antikörper scheinen keine Affinität zu IL-10 zu haben. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zur Negativkontrolle nur um etwa 14 % gesteigert. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch pAK gegen IL-3 und IL-18

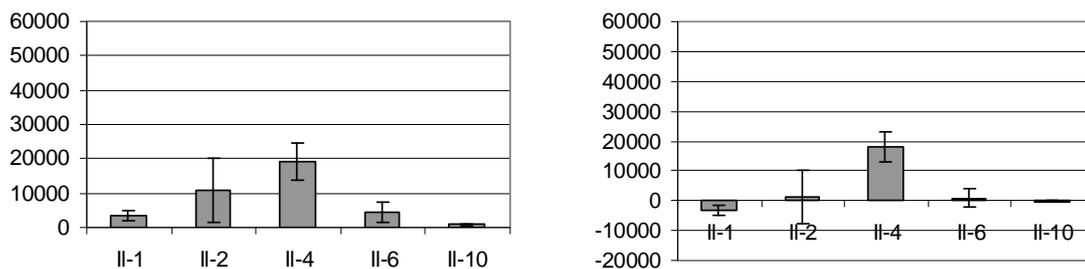


Diagramm 11:

links: Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides pAK gegen IL-4 (Scannereinstellungen: 100/100; x-Achse: Interleukin; y-Achse: Signalintensität [AU]) Die Affinität des Antikörpers zu IL-4 scheint geringer als die Affinität des IL-2 Antikörpers zu IL-2. Entsprechende Ergebnisse lieferten auch die pAK gegen IL-7 und IL-17.

rechts: Ergebnis für die Inkubation mit pAK gegen IL-4 bei Berücksichtigung der über die Negativkontrolle ermittelte Hintergrundaktivität der jeweiligen Interleukinspots (Scannereinstellungen: 100/100; x-Achse: Interleukin; y-Achse: Signalintensität [AU]): Nach Abzug der bereits nach Inkubation mit antikörperfreier Lösung vorhandenen Fluoreszenz zeigt sich eine deutlich bessere Erkennbarkeit der Selektivität des Antikörpers für IL-4. Diese Methode brachte auch gute Ergebnisse für IL-7 und IL-17.

Insgesamt zeigte sich bei den Versuchen zur Spezifität, respektive Kreuzreaktivität der hier betrachteten „Einzelassays“ im Zusammenspiel im multiplexen Microarrayformat ein überaus inhomogenes Bild.

Es gab polyklonale Antikörper, die eine hohe Spezifität aufwiesen (pAKs gegen IL-2 und IL-6). Zusätzlich konnte man bei vielen Interleukinspots von verwendeten polyklonalen Antikörpern ein im Vergleich zu den nicht verwendeten Antikörpern mäßig erhöhtes Fluoreszenzniveau feststellen (pAKs gegen IL-4, IL-7 und IL-17). Des Weiteren stellte man bei einigen Interleukinen bei Verwendung der passenden polyklonalen Antikörper keinen relevanten Anstieg der Aktivität gegenüber der Negativkontrolle fest (pAKs gegen IL-3, IL-10 und IL-18). In der Regel bewirkten diese Antikörper dann auch bei der Erstellung von Konzentrationsreihen keinerlei Aktivität bei steigender Interleukinkonzentration. Eine geringe Basisfluoreszenz war meist durch unspezifische Wechselwirkungen bedingt.

Die Untersuchung auf Kreuzreaktivitäten gestaltete sich schwierig. Es gab zwar Auffälligkeiten, diese waren aber in der Regel nicht reproduzierbar und konnten

darüber hinaus in einem Teil der Fälle eindeutig auf andere Ursachen (Verunreinigungen, Undichtheiten des neuen Inkubationssystems) zurückgeführt werden. Insbesondere fand sich - wie in Diagramm 9 zu erkennen - auch eine deutliche Erhöhung von Fluoreszenzwerten der Negativkontrolle. Diese konnte nicht durch Kreuzreaktivität (es wurde nicht mit polyklonalen Antikörpern inkubiert) erklärt werden. Deshalb war auch hier eine Entstehung dieser Fluoreszenz durch eine Verschleppung von Stoffen von einem Well in das andere oder durch unspezifische Wechselwirkungen wahrscheinlich.

Es fanden sich allerdings auch Hinweise auf eine bestehende Kreuzreaktivität: Die Signalintensität der IL-1- und IL-2-Spots war bei allen Wiederholungen des oben dargestellten Versuches erhöht. In dem in Diagramm 9 dargestellten Fall fand sich diese erhöhte Signalintensität der Spots von IL-1 und IL-2 auch in der Negativkontrolle, so dass hier wie gerade beschrieben, eine Kreuzreaktivität unwahrscheinlich war. Bei zwei weiteren Wiederholungen zeigten die Negativkontrollen aber kein erhöhtes Fluoreszenzniveau bei IL-1 und IL-2, während bei der Inkubation mit verschiedenen polyklonalen Antikörpern dieses anstieg. Hier wäre eine Kreuzreaktivität von anderen Antikörpern eine mögliche Erklärung. Vor allem vor dem Hintergrund, dass Uta Heckhoff in ihrer Arbeit Kreuzreaktivitäten bei den gleichen Antikörpern nachweisen konnte, ist zu vermuten, dass auch in dem hier vorgestellten Microarray diese eine Rolle spielten.

4.6 Systematische Weiterentwicklung des Zytokinchips

Wegen teilweise starker Diskrepanzen zwischen denen im Datenblatt der Einzel-Assays (Matched-Pair RⁿD – Systems) angegebenen Sensitivitätsbereiche und Spezifitäten wurden weiterführende Untersuchungen der Einzelkomponenten im Multiplexverfahren durchgeführt.

4.6.1 Versuche mit IL-Mix

Es wurden zu Beginn der Versuche mit Verdünnungsreihen einige Ansätze zur Erstellung von Konzentrationsreihen mit in Diluent gelösten Interleukinen unterschiedlicher Konzentration durchgeführt. Das allgemeine experimentelle

Vorgehen ist in 3.4 beschrieben. In diesem Fall wurden sechs Slides mit Interleukinkonzentrationen von 0 pg/ml, 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml inkubiert.

Da bei hoher Scannerverstärkung (Laserpower 100; Gain 100) die gemessenen Fluoreszenzwerte sich dem Sättigungsbereich näherten (Daten nicht dargestellt), wurde mit geringeren Scannereinstellungen gemessen (Laserpower 25; Gain 50).

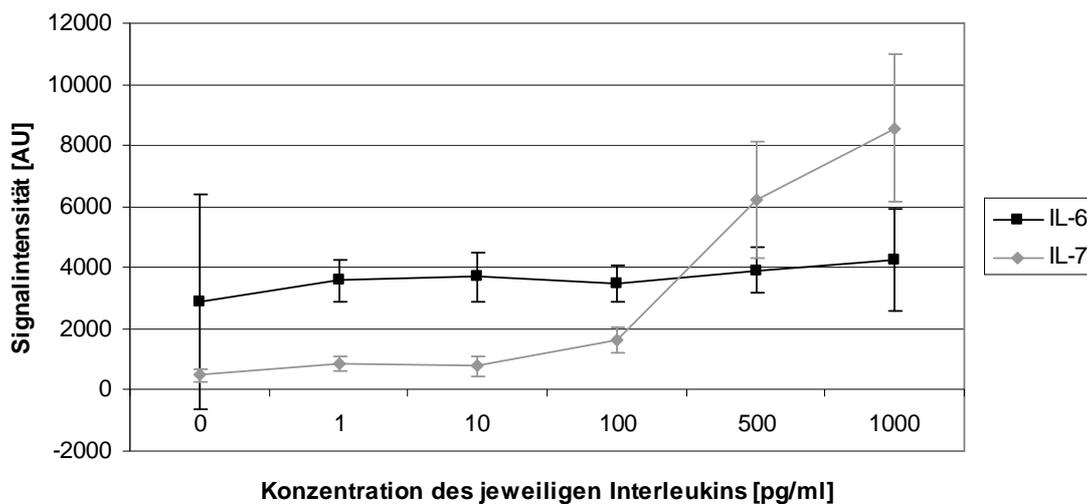


Diagramm 12: Darstellung der Signalintensitäten für unterschiedliche Konzentrationen von Interleukin 6 und 7 in Diluent-Lösung (Scannereinstellungen: Laserpower 25 Gain 50).

Bei IL-7 zeigt einen deutlichen Anstieg der Signalintensität, der allerdings erst bei einer Konzentration von ca. 100 pg/ml beginnt.

Bei IL-6 zeigt dagegen keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz mit zunehmender Antigenkonzentration. Es fällt eine deutlich erhöhte Signalintensität bereits bei der Negativkontrolle (Interleukinkonzentration von 0 pg/ml) auf.

Insgesamt sind die Standardabweichungen der Signalintensitäten relativ hoch. Dies ist am ehesten auf die unter 4.2 beschriebenen Probleme beim Spotten zurückzuführen.

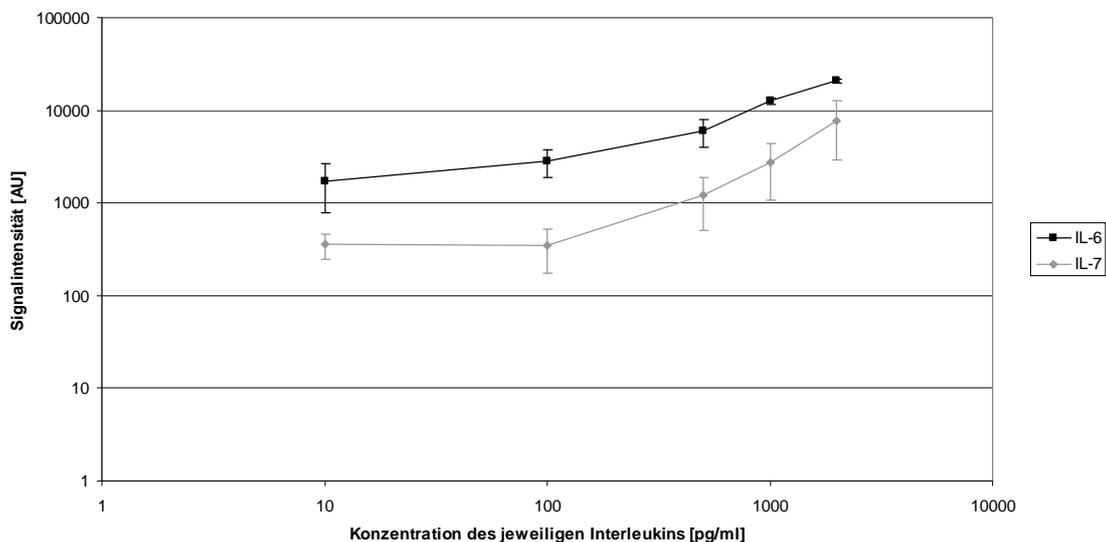
Durch diesen Versuch, der in verschiedenen Variationen mit ähnlichem Ergebnis wiederholt wurde (Daten nicht dargestellt), wurde die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Systems bestätigt.

Bei weiteren Versuchsreihen fiel auf, dass es für einige Interleukine nie gelang, eine Zunahme der Signalintensität mit steigender Konzentration des

betreffenden Interleukins in der Probenmatrix zu beobachten. Für IL-18 wurde gezeigt, dass dies auch gilt, wenn man isoliert nur monoklonale Antikörper gegen IL-18 spottet und - gemäß dem Standardprotokoll - mit dem Interleukin-Mix und allen polyklonalen Antikörpern inkubiert (Daten nicht dargestellt).

In einem weiteren Schritt wurde nun das Diluent als Lösungsmittel für die Interleukine durch humanes Plasma und Vollblut ersetzt. Die übrige Versuchsdurchführung blieb unverändert. Die unterschiedliche und inhomogene Zusammensetzung menschlichen Plasmas stellten dabei an das System deutlich höhere Anforderungen als dies durch das bisher verwendete Diluent der Fall war.

Es wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Die Interleukine wurden dabei in fetalem Kälberserum, humanem Plasma und Vollblut gelöst. In den ersten beiden Versuchen zeigte sich nur ein geringer Anstieg der Signalintensität bei zunehmender Konzentration der Interleukine (fetales Kälberserum und humanes Plasma; Daten nicht dargestellt). Bei weiteren Versuchen konnten aber ähnlich gute Ergebnisse wie bei Verwendung von Interleukinen in Diluent erzielt werden (Diagramm 13).



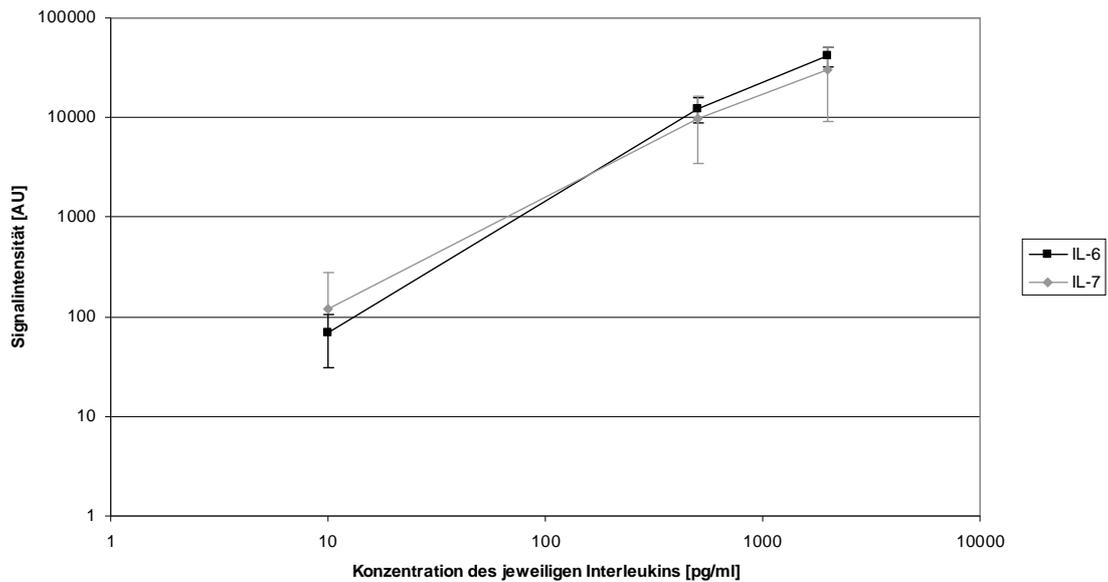


Diagramm 13: Darstellung der Signalintensitäten für unterschiedliche Konzentrationen von Interleukin 6 und 7 in humanem Plasma (oben; Scannereinstellungen des GMS 418: LP100 G100) und Vollblut (unten; Scannereinstellungen PMT1000; Power 100). Es zeigt sich sowohl für die Versuchsreihe im Plasma, wie auch für die Versuchsreihe im Vollblut eine deutliche Steigerung der Signalintensität mit steigender Interleukinkonzentration. Ebenso wie bei der oben vorgestellten Versuchsreihe (Diagramm 10) ist hier erneut zu beobachten, dass die Signalintensität erst ab einer Antigenkonzentration von ca. 100 pg/ml ansteigt.

Aus Gründen der Übersicht werden hier nur zwei Interleukine dargestellt. Eine ebenfalls gute Steigerung der Signalintensität mit zunehmender Konzentration der Antigene ergab sich außerdem für die Interleukine 1,2 und 17.

Durch diese Versuche konnte die Funktionsfähigkeit des Systems auch bei Verwendung von Vollblut und humanem Plasma gezeigt werden. Als nächster Schritt wurde beispielhaft untersucht, inwieweit sich mit dem System die Konzentration von Interleukin-6 in humanem Plasma von Patienten bestimmen lässt.

Das Vorgehen war dabei zunächst identisch mit der Vermessung der Verdünnungsreihen (Diagramme 12 und 13): Es wurde eine 7er-Reihe verschiedener Antigenkonzentrationen vermessen (0 pg/ml, 1 pg/ml; 10 pg/ml, 50 pg/ml, 100pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml) und grafisch dargestellt. Darüber hinaus wurde dieses Mal jedoch mit Hilfe von Excel ein linearer Bereich des

Graphen definiert. Für diesen Bereich wurde eine Ausgleichsgerade ermittelt (Diagramm 14).

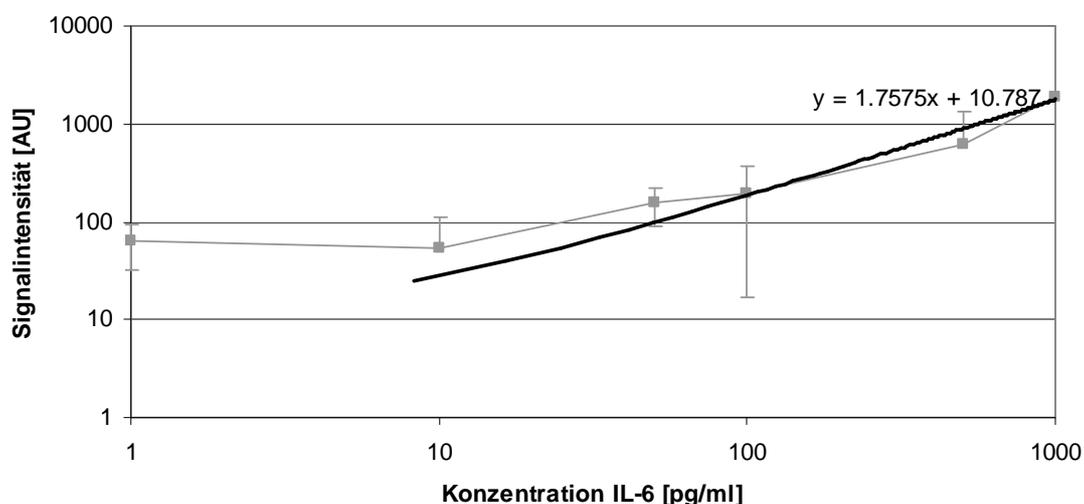


Diagramm 14: Kalibrationskurve für IL-6 mit eingezeichneter Ausgleichsgeraden (log. Darstellung; Scannereinstellungen: Laserpower 50, Gain 50; die bei der Negativkontrolle gemessene Signalintensität wurde als null gesetzt.)

Das LOD als Konzentration bei, der die dreifache Signalintensität der Nullkontrolle erreicht wird, wurde mit etwa 100pg/ml bestimmt. Aufgrund mangelnder Analytmenge war eine höhere Anzahl von Messwerten - insbesondere im Hochkonzentrationsbereich - nicht möglich. Somit ergibt sich keine Möglichkeit, den linearen Bereich dieses Assays exakt zu bestimmen, da die verwendeten Konzentrationen nicht hoch genug sind, um eine Abflachung des Kurvenverlaufs erkennbar zu machen. Deshalb kann die Ausgleichsgerade nicht optimal angepasst werden. Sie sollte aber auch in der hier dargestellten Form gute Näherungswerte liefern.

Simultan zu den Slides der Konzentrationsreihe wurde ein weiterer Slide mit dem zu untersuchenden Plasma inkubiert. Bei diesem wurde der Mittelwert der über allen IL-6-Spots gemessenen Signalintensität in den y-Wert der Gleichung der Ausgleichsgeraden eingesetzt und daraus der entsprechende x-Wert (= Konzentration IL-6 im Plasma [pg/ml]) berechnet. Der so berechnete Wert ergab eine IL-6 Konzentration von 108 pg/ml. Nach Rückrechnung der Verdünnung konnte also mit Hilfe des hier vorgestellten Systems ein Wert von 270 pg/ml ermittelt werden. Die hierbei ermittelte Konzentration für IL-6 stimmt also gut mit der durch das vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster

ermittelten Wertes von 286 pg/ml überein. Die Abweichung beträgt etwa 5,9 %. Die schlechte Sensitivität des Systems zeigte sich allerdings dadurch, dass eine Interleukinprobe mit der niedrigen IL-6 Konzentration von 2 pg/ml nicht korrekt vermessen werden konnte (Daten nicht dargestellt).

In einer weiteren Versuchsreihe sollten mögliche Gründe für die Unzuverlässigkeit des Systems gefunden werden. Es wurde das unter 3.4 aufgeführte Standardprotokoll benutzt. Allerdings wurden die Antigene nicht wie dort angegeben in Diluent gelöst sondern, bei einer gleich bleibenden Konzentration von 500 pg/ml in verschiedenen Lösungsmitteln (fetales Kälber Serum (FCS), humanes Plasma, PBS). Es zeigten sich für die verschiedenen Ansätze zum Teil erhebliche Unterschiede (Diagramm 15).

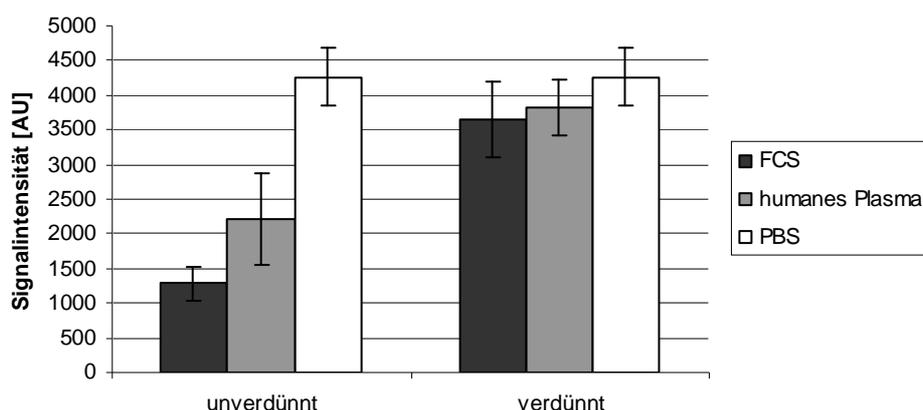


Diagramm 15: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten bei Lösung der Antigene in FCS, humanem Plasma oder PBS (Scannereinstellungen 50/50). Dargestellt ist der Mittelwert der Signalintensität von allen IL-2 Spots auf dem gesamten Slide. Für die anderen Interleukine ergeben sich zum größten Teil ähnliche Werte.

Bei der Nutzung von PBS als Lösungsmittel ergeben sich mit Abstand die höchsten Fluoreszenzwerte. Bei humanem Plasma und FCS als Lösungsmittel liegen niedrigere Signalintensitäten vor. Nach Verdünnung sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln nicht mehr so stark ausgeprägt.

Es ist also eine deutliche Abhängigkeit der Signalintensität von der Probenmatrix festzustellen. Dass nach der Verdünnung die Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien nicht mehr so ausgeprägt sind, ist dadurch zu erklären, dass die spezifischen Eigenschaften der Matrices nach

der Verdünnung nicht mehr so stark ins Gewicht fallen. Beim praktischen Einsatz kann man sich dies dadurch zunutze machen, dass man etwa humane Plasmaproben vor dem Messen verdünnt. Dadurch kann der Einfluss des Plasmas auf die Messung verringert werden. Natürlich ist dabei zu berücksichtigen, dass man auch die Interleukine verdünnt und dadurch die Messung - insbesondere bei Systemen mit geringer Sensitivität - ungenauer werden könnte.

4.7 Entwicklung eines neuen Inkubationssystems

Es sind im Folgenden die Ergebnisse der unter 3.5.2 erläuterten Versuchsreihe dargestellt. Bisher wurde für jede vermessene Interleukinkonzentration ein gespotteter Slide benötigt (siehe 3.4). Bei dem neuen Inkubationssystem wird ein Slide für alle Konzentrationen benutzt, wobei jedes Grid des Slides (Abbildung 5) mit einer verschiedenen Interleukinkonzentration inkubiert wird. Es können also gleichzeitig maximal zwölf verschiedene Konzentrationen vermessen werden.

Zunächst wurde der Versuch derart durchgeführt, dass in jede der zwölf Inkubationskammern eine unterschiedliche Konzentration von IL-Mix gebracht wurde. Hierbei zeigte sich nach Auswertung praktisch keine Steigerung der Fluoreszenz bei zunehmender Konzentration (Daten nicht dargestellt). Da bei diesem Versuchsaufbau für jedes Interleukin bei jeder Konzentration nur ein Spot vermessen wurde, wurde anschließend noch einmal der gleiche Versuch durchgeführt, dieses Mal jedoch mit einer Doppelbestimmung von sechs Konzentrationen, was aber kaum zu einer Verbesserung des Ergebnisses beitrug. (Daten nicht dargestellt)

Danach wurde der letzte Versuch mit einem Slide aus einer älteren Charge durchgeführt. Diese war vor der Verwendung acht Monate bei -18°C gelagert worden. Das Ergebnis zeigt Diagramm 16.

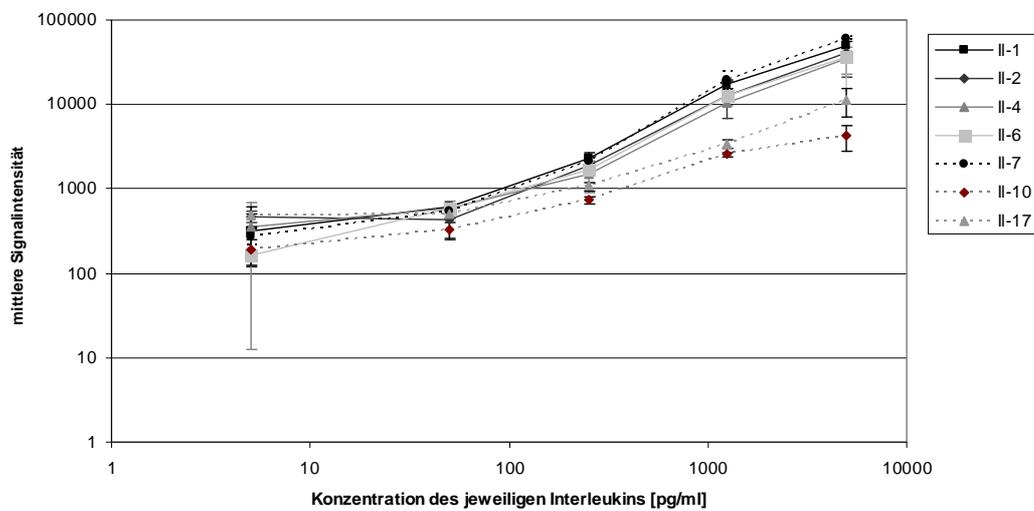


Diagramm 16 Test des neuen Inkubationssystems mit sechs verschiedenen Interleukinkonzentrationen. Es ist eine kontinuierliche Steigerung der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration des jeweiligen Interleukins zu erkennen.

So konnte gezeigt werden, dass mit den neuen Inkubationskammern die Erstellung einer Kalibrationskurve möglich ist.

Zwar wurde dieser Versuch nicht wiederholt, so dass keine generelle Aussage zur Funktion von bei -18°C gelagerten Slides möglich ist. Es kann aber festgestellt werden, dass der hier verwendete Slide nach acht Monaten Lagerung noch gut funktionsfähig war.

5 Diskussion

Das Ziel bei der Entwicklung dieses Zytokinchips ist die parallele Detektion verschiedener Zytokine/Chemokine in menschlichem Plasma. Hierdurch soll in einer Longitudinalstudie geklärt werden, welche Expressionsmuster möglicher, relevanter Proteine (Zytokine/Chemokine) auf Abstoßungsreaktionen transplanteder Organe hindeuten. In einem IVD würden die entsprechenden, identifizierten Markerproteine für eine Abstoßungsreaktion zusammengefasst und durch eine PC-unterstützte Auswertung dieser Microarrays eine schnelle und sichere Methode zur Detektion von Veränderungen im physiologischen Zytokin/Chemokin-Muster schaffen, die Hinweis auf eine beginnende Abstoßungsreaktion sein können.

Spezifisches Ziel dieser Arbeit war die sowohl die Evaluierung relevanter und in Vorarbeiten zum Teil kritisch eingestufte Parameter in der Herstellung der Microarrays, deren Inkubation und Behandlung, als auch die Gewinnung von sicheren Daten bei deren Auswertung.

5.1 Verwendung von Spotter und Scanner zur Herstellung von Proteinmicroarrays

Wie in Kap. 4.1 gezeigt, sind die Abweichungen durch den Scan-Prozess derart schwankungsbehaftet, dass hier ein hohes Risiko für das Auftreten von Problemen bei der Vermessung der Proben besteht. Für diagnostische Analyseverfahren wird in der Regel eine Schwankungsbreite der Ergebnisse von etwa 10% gefordert (29). Es wird also ersichtlich, dass alleine mit der Ungenauigkeit (Standardabweichungen von 3,6-10%) beim Scannen (d.h. ohne überhaupt die Qualität des erstellten Slides oder der Antikörper zu berücksichtigen) ein großer Teil dieser Toleranz aufgebraucht ist.

Bei den hier verwendeten Scannern handelt es sich um so genannte konfokale Scanner. Diese messen die Fluoreszenz in einer genau definierten Schicht. Dadurch wird die Hintergrundfluoreszenz reduziert. Da allerdings bei den verwendeten Slides die eigentliche Schicht mit den Antikörpern sehr dünn ist, könnte es durch Ungenauigkeiten etwa beim Transport des Slides im Scanner

zu minimalen Veränderungen der Lage des Slides gekommen sein, die die unter 4.1 dargestellten Ungenauigkeiten bei wiederholtem Scannen erklären könnten (10).

Des Weiteren wurde ermittelt, wie bei der Platzierung des Auswertungsrasters vorgegangen werden muss, um eine sicher reproduzierbare Auswertung durchführen zu können. Muss für jeden Scan des gleichen Slides ein neues Grid gelegt werden, oder reicht es, wenn man das alte anpasst? Bei den zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuchen ergaben sich Unterschiede zwischen den Scannern:

Beim Genetic Microsystems -Scanner wird am besten, wie oben dargestellt, das gleiche Grid mit der Funktion „auto adjust spots“ auf den neuen Scan des gleichen Slides angepasst.

Beim Molecular Device-Scanner ist dieses Vorgehen ungünstig, weil damit die Ungenauigkeiten in den Messungen nicht ab- sondern zunehmen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Objektträgerzug bei diesem Scanner mit höherer Präzision bzw. Reproduzierbarkeit arbeitet. Die Scans sind untereinander praktisch nicht verschoben; der Versuch einer Korrektur durch die Software verschlechtert die Qualität der Scans, statt sie zu verbessern.

Beim Wechsel auf einen neuen Slide wird (unabhängig vom verwendeten Scanner) ein neues Auswertungsraster gelegt. Dies ist aufgrund der hierbei zu erwartenden starken Verschiebungen der Bilder notwendig. (Abbildung 10 zeigt dies für den Genetic Microsystems-Scanner.)

Durch die Beachtung dieser Maßnahmen kann die Entstehung von weiteren Fehlern bei der Messung verhindert werden. Die oben angegebenen Schwankungen beim Scannen lassen sich allerdings dadurch nicht vermeiden. Wie der Scan-Prozess wurde auch der Spotting-Prozess einer genauen Prüfung unterzogen. Dieser hatte sich schon zu Beginn der Versuche als anfällig gegenüber Störungen durch verschiedene Faktoren erwiesen.

Der Spotter kann prinzipiell 42 Slides aufnehmen. Die Menge der Flüssigkeit in den Metallringen der Pin-Ring-Einheit reicht für mindestens 200 Spots. Das bedeutet, dass bei drei Hits pro Spot und drei Replikaten pro Slide neun Spots

aus einem Ring pro Slide gesetzt werden. Damit sollten hintereinander mindestens 22 Slides verarbeitet werden können. Allerdings fällt schon bei mehr als zehn Slides auf, dass die Qualität der letzten Slides durch fehlerhafte oder ganz fehlende Spots deutlich abnimmt (Abbildung 11). Ursächlich hierfür ist der Verlust des Flüssigkeitsmeniskus im Ring der Ring-Pin-Einheit. Das Risiko für so ein Ereignis nimmt mit der Zahl der Durchstöße der Nadeln durch den Flüssigkeitsfilm zu. Da es günstiger ist, möglichst viele Slides in einem Durchgang zu spotten, statt wenige Slides in mehreren Durchgängen (Zeitersparnis, Vermeidung von unnötigem Verbrauch von Antikörpern, schlechte Vergleichbarkeit von Slides mehrerer Spottingdurchgänge) wird zur Lösung dieses Problems dem Essigsäurespottingpuffer ein rheologischer Modifizierer zugefügt. Daraufhin steigert sich die Stabilität der Flüssigkeitsmeniski. Es tritt allerdings das unter 4.2 beschriebene Problem der erhöhten Fluoreszenz von noch nicht mit gelabelten polyklonalen Antikörpern in Berührung gekommenen Slides auf. Grundsätzlich ist eine sehr geringe Eigenfluoreszenz bei allen Antikörperspots normal. Diese beruht auf proteinspezifischen Emissionen bei Anregung durch die gewählte Laserwellenlänge des Scanners. Ein weiterer Grund für das Auftreten einer Eigenfluoreszenz können auch kristallartige Strukturen auf den Spots sein, die durch das Eintrocknen von Salzen aus dem Spottingpuffer stammen. Für die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete massive Fluoreszenz der Spots (Abbildung 12) kann diese Erklärung aber nicht ausreichend sein. Da auch auffällt, dass vor allem Spots leuchten, die direkt nach einem Marker gespottet wurden, ist davon auszugehen, dass die Nadeln zwischen den einzelnen Wells nicht ausreichend gereinigt werden konnten und es zu einer Verschleppung von Substanz kam. Die hierzu durchgeführte Versuchsreihe (Diagramm 4) bestätigte diese Vermutung.

Eine weitere Frage ist, warum der oben beschriebene Effekt der Verschleppung von Material bei dem einen Spottingdurchgang stark, bei einem anderen kaum auftritt. Ein Erklärungsansatz wäre, dass die Eintauchtiefe der Nadeln bzw. der Metallringe bei der Kalibrierung des Spotters eine Rolle spielen. Durch ein tieferes Eintauchen könnte es zu einer vermehrten Aufnahme von Lösung aus

dem Well kommen, die beim folgenden Spülvorgang nicht vollständig entfernt werden kann. Da die Kalibrierung manuell unter Sichtkontrolle vorgenommen wird, wird es sicherlich bei jedem Spottingdurchgang zu geringfügigen Abweichungen der Eintauchtiefe kommen, die ein unterschiedliches Ausmaß der Verschleppung von Substanz bewirken. Es ist auch bekannt, dass es zwischen Proteinen und verschiedenen Metallen zu nicht-kompetitiven Adsorptionsvorgängen kommen kann (64), diese können das durch die variierende Eintauchtiefe entstandene Problem mit der Spülung noch weiter verstärken.

Als Konsequenz dieser Versuche wird auf den Zusatz eines rheologischen Modifizierers verzichtet, um so eine mögliche Verschleppung von Material in Grenzen zu halten. Dem dadurch entstehenden Problem des frühzeitigen Meniskenabrisses wird begegnet, indem höchstens 15 Slides in einem Durchgang erstellt werden. Dies stellt einen sinnvollen Kompromiss zwischen der Qualität der Slides und des wirtschaftlichen Einsatzes des Spotters dar.

Ein weiteres Problem beim Spotter betrifft die sehr unterschiedliche Qualität der Spots, die sich durch Inhomogenität und eine uneinheitliche Form zeigt. Diese Charakteristika spielen im Hinblick auf ein automatisiertes Auslesen eine besondere Rolle. Zum einen sollte hier der Spot im gesamten Durchmesser eine möglichst gleiche Fluoreszenzintensität zeigen, zum anderen sollte die Form kreisrund sein, um das Bestimmen der mittleren, relativen Fluoreszenzintensität zu vereinfachen. Effekte wie der sog. Donut-Effekt oder sog. Satelliten-Spots erschweren die Auswertung (10).

Prinzipiell kommen für schlechte Qualität von Spots verschiedene Ursachen in Frage. Der Herstellungsprozess der Microarrays ist ein sehr störanfälliger Vorgang, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann. Dazu gehören zum Beispiel Schwankungen der Luftfeuchtigkeit oder Umgebungstemperatur. Selbst ein Einfluss der Ozonkonzentration auf die Slides ist beschrieben (16). Auch die planaren Oberflächen von Slides können unregelmäßige Spots verursachen (10). Im Rahmen dieser Arbeit wird allerdings mit Hydrogelen gearbeitet, die keinen negativen Einfluss auf die Spotform haben. Es ist eher ein positiver Einfluss des Hydrogels auf die

Ebenheit des Spots zu erwarten (10). Deshalb ist die schlechte Qualität der Spots in der hier vorgestellten Arbeit eher durch einen falsch arbeitenden Spotter begründet: Bei der Kalibrierung des Spotters werden die Nadeln so lange herabgesenkt, bis sie die Slideoberfläche berühren. Anschließend senkt man, um einen sicheren Kontakt herzustellen, den Kopf des Spotters um zwei weitere Stufen ab. Hierbei fällt auf, dass die Nadeln nicht alle bei der gleichen Einstellung auf den Slide treffen. Dadurch kommt es dann beim Spotten immer wieder zu Problemen, da entweder noch nicht alle Nadeln richtig aufgesetzt haben, oder, wenn alle Nadeln aufsetzen, der Druck der am weitesten vorstehenden Nadeln zu stark für Spots guter Qualität ist. Aufgrund dieses Umstandes ist es außerordentlich schwer bis unmöglich, gleichmäßige Spots zu erzeugen.

Außerdem kann es bei Spottern, die mit direktem Kontakt zwischen Nadel und Slide arbeiten, zu Verformungen der Nadel mit anschließend schlechterer Qualität der Spots kommen (3).

Die Homogenität der Spots kann auch dadurch vermindert sein, dass ein Spotter nie genau die gleichen Flüssigkeitsmengen auf die Slides aufträgt. Es können Schwankungen bis zu 20% auftreten [Untersuchungen Nico Dankbar]. Gerade bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten dreidimensionalen Hydrogel-Oberflächen kann dies vermehrt Probleme verursachen. Durch die sehr suffiziente Immobilisierungsschemie wird ein großer Teil der gespotteten Antikörperlösung immobilisiert. Eventuell auftretende Unregelmäßigkeiten bei der Menge der aufgetragenen Antikörper fallen dadurch stark ins Gewicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, diesem Problem dadurch Rechnung zu tragen, dass die Nadeln pro Spot dreimal aufgesetzt wurden. Dadurch wird die Menge der gespotteten Antikörper pro Spot gleichmäßiger.

Bei der Verwendung dieses Spotters bei der Verarbeitung von DNA sind gute Ergebnisse beschrieben (44;69). Auch für den Einsatz mit Proteinen finden sich positive Berichte (70). Beim Spotten von Proteinen im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit ist aber - trotz des Versuches der Optimierung der Bedingungen (längeres Spülen, Veränderungen des Spottingpuffers, Austauschen der Pins des Spotters) - nur mit hohem Aufwand eine

ausreichende Qualität der Slides zu erreichen. Sowohl das Problem mit der Verschleppung von Material, als auch die oft ungleichmäßige Spotform führen zu einem hohen Anteil von unbrauchbaren Slides bei der Produktion. Dieses verursacht wiederum hohe Kosten durch unnötigen Antikörperverbrauch und zusätzlichen Zeitaufwand. Außerdem ist es für die Aussagekraft der Messungen absolut notwendig, dass eine gleich bleibend gute Qualität der Slides garantiert ist. Der Spotter ist daher für Einzelanalysen im Rahmen der experimentellen Entwicklung des Arrays als einsetzbar zu beurteilen. Die Qualität der Slides in einer experimentellen Produktion kann relativ gut kontrolliert werden. Für die Massenproduktion sollte ein Spotter dieser Bauart aber nicht eingesetzt werden. Gelangen minderwertige Slides in die klinische Anwendung, bedeutet dies die Notwendigkeit einer Wiederholung der Messung mit den damit verbundenen Kosten und Zeitverlust.

Möglicherweise könnte die Wahl eines anderen Spottertyps, vor allem auch mit einer anderen Funktionsweise (z.B. berührungsloses System nach dem Piezo-Prinzip) eine bessere Qualität erreichen. Dennoch wird der Prozess des Spottens immer komplex und fehleranfällig bleiben. Es kann eine gute Entscheidung sein, das Spotten der Slides an ein externes Unternehmen mit Schwerpunkt in diesem Bereich (z.B. Schleicher & Schuell) auszulagern. Diese Unternehmen konnten über Jahre ihre Prozessabläufe optimieren. Zusammen mit sehr guten Geräten, die sich nur für Firmen rentieren, die Microarrayslides in hoher Stückzahl produzieren, wird so eine gleich bleibend hohe Qualität gesichert. Durch den Bezug von fertig prozessierten Slides entstehen zwar zusätzliche Kosten, dafür entfallen aber die Wartungsausgaben für den Spotter, und man erspart sich den fehleranfälligen, zeit- und damit auch kostenintensiven Prozess des Spottens.

5.2 Microarray-Substrate und Fluorophore

Bei der Analyse eines Mikroarrays sind hohe Signalintensitäten wünschenswert, da sie zum einen eine bessere Abstufung einzelner Signalstärken und damit letztlich eine genauere Differenzierung von

Konzentrationen und zum anderen eine gute Unterscheidung des vom Spot ausgehenden Signals vom Hintergrundrauschen ermöglichen.

Dies ist daher wichtig, da das menschliche Plasma neben den zu messenden Interleukinen noch viele andere Proteine enthält, die Interaktionen mit dem Slide eingehen können. Haab et al. haben in ihren Arbeiten nachgewiesen, dass hohe Gesamtproteinkonzentrationen in der zu analysierenden Lösung zu einem signifikanten Abfall bei der Genauigkeit der Messungen führen können (20). Gründe können hier eine verminderte Fluoreszenz der Spots durch Bindung von Nicht-Analyt-Proteinen an die monoklonalen Antikörper sein, auch kann es zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Oberfläche kommen, die die Hintergrundfluoreszenz anheben.

Die Tatsache, dass beide Slidearten die beste Signalfluoreszenz bei mittelgradiger Aktivierung zeigen, ist dadurch zu erklären, dass mit zunehmender Aktivierung vermehrt negative Gruppen bei Succinimidyl-veresterten Carboxylaten für die Antikörperbindung zur Verfügung stehen. Dies hat zunächst einen positiven Effekt auf die Bindungskapazität des Slides. Bei weiter steigender Aktivierung kommt es dann jedoch über Crosslinking zur Funktionsminderung der immobilisierten Antikörper, die bis zur kompletten Auflösung der Hydrogelstruktur führen kann.

Zusammenfassend ist der HC-Hydrogel-Slide für diese Arbeit am geeignetsten. Er bietet viele Vorteile: Ein Hydrogel-Slide besitzt eine poröse Oberfläche, die eine dreidimensionale, hydrophile Matrix für die aufgetragenen monoklonalen Antikörper zur Verfügung stellt. Neben den angesprochenen geringeren Wechselwirkungen mit humanem Plasma zeichnen sich diese Slides durch eine hohe Lagerbeständigkeit aus. Des Weiteren ermöglicht die Hydrogeloberfläche eine kovalente Immobilisierung von Antikörpern in hoher Dichte, wobei aber deren Funktionalität bestehen bleibt. Es kommt nur selten zur Denaturierungen der aufgetragenen Antikörper. Die weiteren Versuche zur Erstellung von Konzentrationsreihen und Vermessung von Humanplasma werden daher mit HC-Hydrogel-Slides durchgeführt. Gleiches sollte für die klinische Anwendung des Systems gelten. Diese Art der Oberflächen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich für Microarrays zur

Interleukinmessung eingesetzt (60). C-Matrix slides eignen sich aufgrund der starken Interaktionen mit den Blutbestandteilen, trotz des oben beschriebenen höheren Fluoreszenzniveaus, nicht für die Verwendung in dem hier vorgestellten Array.

5.3 Beständigkeit der Farbstoffe

Im Routinebetrieb wird man die Slides in der Regel gleich nach der Inkubation vermessen, um ein zeitnahes Ergebnis der Untersuchung zu bekommen. Auch wenn deshalb eine Lagerung der Slides über 40 Tage zwischen Inkubation und Vermessung in der klinischen Routine selten sein wird, sind diese Ergebnisse dennoch von praktischer Relevanz. Zum einen kann es sein, dass bei Messungen ein Fehler auftritt, der erst bei der Auswertung auffällt. Bei stabilen Farbstoffen ist es dann problemlos möglich, die Slides nochmals zu scannen. Zum anderen zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass es möglich ist, den Slide nach der Inkubation mit polyklonalen Antikörpern für Stunden liegen zu lassen, ohne Fluoreszenz zu verlieren. Auch ein lichtgeschützter Transport erscheint vor dem Hintergrund der Versuchsergebnisse nicht notwendig. Ähnliches gilt für den Umgang mit den gelabelten polyklonalen Antikörpern während der einzelnen Arbeitsschritte. Wie alle Farbstoffe sollten auch diese nicht der prallen Sonne ausgesetzt werden, es konnte aber durch die Versuche gezeigt werden, dass eine strikte Vermeidung von jeglichem Lichteinfall, z.B. durch die Arbeit in verdunkelten Räumen nicht notwendig ist. Dadurch wird die Handhabung des Systems deutlich erleichtert. Andere Arbeitsgruppen veröffentlichten ähnliche Ergebnisse. So konnten Qiang Gu et al. in ihren Untersuchungen zeigen, dass eine Lagerung von inkubierten Slides zu keinem signifikanten Verlust an Signalintensität führt (17). Es muss allerdings angemerkt werden, dass diese Arbeitsgruppe die Slides bei -20°C und luftdicht versiegelt lagerte. Die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit angewandte Lagerung bei Raumtemperatur in luftdurchlässigen Behältern stellt noch höhere Ansprüche an den Farbstoff. Die Qualität der hier verwendeten Farbstoffe ist also als sehr gut zu beurteilen. Sie sind für die Anwendung im hier vorgestellten Microarray sehr gut geeignet.

5.4 Biologische Komponenten im Interleukin-Microarray-System

Gefahren für die Qualität eines Microarrays sind, wenn man sich auf die biologischen Komponenten konzentriert, die Fehlfunktion einzelner Reagenzien (Antikörper, Antigene), die Kreuzreaktivität der Antikörper und unspezifische Wechselwirkungen einzelner Bestandteile der Probenmatrix mit Bestandteilen des Interleukin-Microarray-Systems.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Einflussgrößen ausführlich untersucht.

Bei funktionslosen Antikörpern lassen sich als Ursachen entweder eine massiv verminderte oder sogar ganz fehlende Affinität zu dem jeweiligen Antigen feststellen. Es ist auch möglich, dass der Antikörper, etwa durch Denaturierungsprozesse, vollständig funktionslos geworden ist.

Als Konsequenz muss man bei der weiteren Entwicklung des Zytokinchips die verwendeten Interleukine kritisch überdenken. Antikörper, die in allen Versuchsanordnungen funktionslos bleiben (in der hier vorgestellten Arbeit vor allem IL-3, IL-10 und IL-18) haben keinen diagnostischen Wert, können aber durchaus einen störenden Einfluss auf die Vermessung der anderen Interleukine ausüben. Es müssen andere Sandwichpärchen für dieses Interleukin getestet werden, bis ein passendes Paar gefunden ist, das eine möglichst hohe Spezifität und Sensitivität bietet. Wenn dies nicht möglich ist, sollte der entsprechende Antikörper aus dem Microarray gestrichen werden um störende Einflüsse auf die Messung der anderen Zytokine zu vermeiden. Allerdings kann dadurch die Aussagekraft des Assays abnehmen, da das bei Abstoßungsreaktionen vorhandene Zytokinmuster nun nicht mehr so umfassend dargestellt werden kann.

Während der hier vorgestellten Arbeit wurde auf Veränderungen der gespotteten Antikörper auf dem Slide verzichtet, um die Versuche vergleichbar zu halten und das System durch Modifikationen dieser Art nicht zusätzlich zu beeinflussen.

Wie oben dargestellt ist, bildet die Kreuzaktivität offensichtlich nicht das Hauptproblem bei dem hier vorgestellten Assay. Teilweise finden sich aber

Hinweise auf Kreuzaktivität zwischen den Antikörpern und Interleukinen. Diese zeigen sich immer dann, wenn im Umfeld der Probenmatrix Substanzen auftreten, die den für die Antikörper spezifischen Antigenen stark ähneln. Es kommt dann zur Bindung des Antikörpers an diese Strukturen und damit zu falsch positiven Signalen. Bei der simultanen Analyse einer Vielzahl von Proteinen ist das Risiko für das Auftreten von Kreuzreaktivitäten (42) erhöht, dagegen ist es bei einer geringeren Anzahl zeitgleich analysierter Proteine geringer (30).

Von den Kreuzreaktivitäten werden die unspezifischen Bindungen unterschieden. Hierbei binden sich z.B. eine in hoher Konzentration in der Probe vorkommende Substanz (z.B. ein Protein) unspezifisch an Oberflächen oder Spots aus Antikörpern. Diese Wechselwirkungen müssen nicht immer bei der Verwendung des fraglichen Antikörpers auftreten. Es kann sein, dass sich im Laufe der Evolution nur bei einer bestimmten Spezies Substanzen im Organismus gebildet haben, die der Antikörper als „falsches“ Substrat erkennt. Unter Umständen finden sich solche Substanzen auch nur bei einzelnen Individuen (z.B. so genannte Anti-Animal-Antibodies (65)). Dies stellt insofern ein Problem dar, als dass diese Phänomene aufgrund der großen inter-individuellen Varianz schlecht vorhersehbar sind.

Bei dem hier vorgestellten Assay sind zunächst die Hauptprobleme zu lösen: Dies ist die offensichtliche Verschleppung von Materialien aus den Wells beim Spotten und der insgesamt fehleranfällige Vorgang des Spottens selbst, bei dem es häufig zu fehlenden Spots auf den fertigen Slides kommt. Nach Beseitigung dieser Probleme sollte es möglich sein, evtl. vorhandene Kreuzreaktivitäten und andere unspezifische Wechselwirkungen zu analysieren. Diese könnten dann durch Versuche mit verschiedenen Blockierungen und Puffern beseitigt werden (65). Auf dem Markt gibt es hier eine Vielzahl von kommerziell vertriebenen Produkten, deren Eignung für den jeweiligen Einsatzzweck allerdings überprüft werden muss (65).

5.5 Weitergehende Untersuchung des Zytokinchips

Aus oben genannten Ergebnissen (Diagramm 15) kann der Schluss gezogen werden, dass bei der Analyse einer Probe die Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Kalibrationskurve mit der Probenmatrix durchgeführt werden sollte, zu der auch die zu untersuchende Probe gehört. Dies bedeutet, dass bei der Erstellung der Verdünnungsreihe zur Analyse von humanem Plasma auch dieses als Lösungsmittel für die Interleukine dienen sollte. Alternativ und zur Vereinfachung der Durchführbarkeit kann Diluent der Firma R&D-Systems eingesetzt werden.

Des Weiteren ist auch zu beachten, welches Probenmaterial für die Messung verwendet wird. Wie oben erläutert, sind theoretisch Messungen in Vollblut und Plasma möglich (Diagramm 13). Für die klinische Praxis zu beachten ist aber, dass Interleukine im Vollblut instabil sind und deshalb innerhalb von vier Stunden nach Probenentnahme vermessen werden sollten. Ist eine längere Zeit bis zur Analyse nötig, sollte eine möglichst schnelle Separation der Zellen vom Plasma angestrebt werden. In diesem sind die Zytokine bei -70°C über Jahre haltbar (21).

Auch ist zu berücksichtigen, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Interleukinlösungen mehrere Jahre alt waren und trotz Aliquotbildung teilweise mehrfach aufgetaut und eingefroren wurden. Deshalb kann es sein, dass die Interleukinkonzentrationen in den Versuchen durch eine teilweise Denaturierung der Interleukine niedriger als berechnet waren und die Sensitivität des Systems dadurch unterschätzt wurde.

Die hohe Standardabweichung in Diagramm 12 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die vier Nadeln die Spots unterschiedlich setzen. Zum Beispiel sind die Spots der einen Nadel sehr dick, während die andere Nadel sehr schwache Spots setzt. Dementsprechend fällt auch die Fluoreszenz einmal sehr stark und einmal sehr schwach aus. Da dieses Problem bei allen Slides einer Versuchsreihe in gleichem Maße auftritt, ergeben sich dennoch verhältnismäßig gute Konzentrationskurven. Die ungleichmäßige Spotform und variierende Menge der aufgetragenen Antikörperlösung zeigen sich jedoch in der hohen Standardabweichung.

Die deutlich erhöhten Signalintensitäten bei den Negativkontrollen treten nur in einem Teil der Fälle auf. Der Grund ist hier vermutlich die Verunreinigung des verwendeten Slides mit Marker-Farbstoff (siehe 4.2 und 5.1).

Die Vermessung einer Plasmakonzentration gelingt in einem Fall mit ausreichender Präzision. Bei weiteren Messungen ist die Genauigkeit allerdings nicht ausreichend. Insbesondere ist zu beachten, dass das hier vorgestellte System aus verschiedensten Gründen (fehlende Spezifität der Antikörper/Kreuzreaktivität, fehlerhafte Slides, mangelnde Qualität der Antigenlösung nach langer Lagerzeit) vor allem in niedrigen Konzentrationsbereichen keine ausreichend genauen Messungen ermöglicht. Nach dem Verfahren von Weissenstein et al. (63) ergibt sich ein Detektionslimit von 71,78 pg/ml. Es ist aber davon auszugehen, dass mit sauber gespotteten Slides, neuen Antikörpern und Interleukinen die Sensitivität und damit das Detektionslimit gesenkt werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die gespotteten Slides lange Haltbarkeiten aufweisen. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Michael Hadjisavas stellt fest, dass gespottete Antikörper auch nach zwei Jahren auf dem Array noch funktionsfähig sind (41). Wang et al. geben für ihre gespotteten Slides ebenfalls lange Haltbarkeiten an (61).

5.6 Möglichkeit zur Parallelbestimmung von mehreren Proben auf einem Microarray

Das für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendete, oben ausführlich beschriebene „Standardsystem“ hat einige Nachteile. Es sind relativ große Mengen des zu analysierenden Materials notwendig (mindestens. ca. 1500 µl Plasma). Außerdem müssen mindestens 10,5 ml Diluent/IL-Mix mit dem damit verbundenen Interleukinverbrauch für die Erstellung einer Standardreihe bereitgestellt werden. Ähnliches gilt für den Verbrauch von polyklonalen Antikörpern und für die benötigte Menge an Slides selbst (mindestens sechs für die Erstellung der Kalibrierung und einen für die Vermessung der Probe). In gleichem Maße kann man dementsprechend auch monoklonale Antikörper einsparen, wenn es gelingt, das System zu verkleinern. Die neue unter 3.5.2

beschriebene Modifikation des Systems hat mehrere Vorteile. Es können zwölf verschiedene Interleukinkonzentrationen gleichzeitig mit einem Slide (statt wie bisher mit zwölf Slides) bestimmt werden. Jede der kleinen Kammern wird mit 100µl Antigenlösung gefüllt. Bei einer Konzentrationsreihe mit sieben Konzentrationen und einer zu vermessenden Probe verringert sich demzufolge die benötigte Menge Interleukin-Lösung von 10,5ml auf 0,7ml. Die Menge benötigter pAK-Lösung sinkt für eine Versuchsreihe von 12ml auf 1,5 ml. Am Ende des Versuches muss nur noch ein Slide gescannt werden. Dadurch ergibt sich eine weitere Zeitersparnis.

Die Umsetzung dieses Systems mit der Vermessung von einer Konzentration pro herkömmlichem Grid (Abbildung 5) ist allerdings durch verschiedene Umstände limitiert: Bei der aktuellen Robustheit des Systems ist dies nicht möglich, da zur zuverlässigen Auswertung jeder Messwert mehrfach bestimmt werden muss. Das Grid müsste also so verändert werden, dass für jedes zu messende Interleukin mehrere Spots vorhanden sind. Dies ist mit dem zur Verfügung stehenden Spotter nur sehr begrenzt möglich, was an dessen fehlender Flexibilität liegt. Dieser kann die Spots nicht vollkommen frei auf dem Slide verteilen. Dadurch ist eine optimale Anpassung der Anordnung der Spots an die neuen, runden Inkubationskammern nicht möglich. Eine Alternative wäre es, mehrere benachbarte Wells der Mikrotiterplatte mit Antikörpern gegen das gleiche Interleukin zu versehen. So ließen sich dann innerhalb eines Grids zum Beispiel jeweils vier Spots gegen das gleiche Antigen erzeugen. Allerdings müssten dazu dann 16 Wells der Mikrotiterplatte mit derselben Antikörper-Lösung befüllt werden. Da der Spotter aufgrund der zahlreichen Spülschritte ziemlich viel von der in den Wells befindlichen Lösung verbraucht, wäre der Antikörperverbrauch durch dieses Vorgehen stark erhöht. Außerdem könnten dann, aufgrund der begrenzten Kapazität der Mikrotiterplatte, nur noch fünf Interleukine zeitgleich untersucht werden.

Neben der Möglichkeit, die Slides mit einem anderen Spotter zu produzieren, besteht die Option, durch eine Verbesserung der Robustheit des Systems die Grids in der herkömmlichen Form weiter verwenden zu können.

Ein weiteres Problem der neuen Variation des Inkubationssystems ist, dass die Kammern teilweise Anzeichen einer fehlenden Abgrenzung der einzelnen Kammern zeigten. Offenbar gelangt vereinzelt Interleukinlösung der einen in die andere Inkubationskammer (Daten nicht dargestellt).

Sicherzustellen ist auch die effiziente Inkubation mit dem humanen Probenmaterial. Aufgrund des großen Probenvolumens (ca. 2ml) kann bei den großen Inkubationskammern eine ausreichende Durchmischung sichergestellt werden. Allerdings ist dies bei einem wesentlich kleineren Probenvolumen und visköseren Proben wie Vollblut aufgrund der Adhäsionskräfte der Flüssigkeitsmoleküle an den Wänden der Inkubationskammern fraglich. Da eine ausreichende Durchmischung der Proben während der Inkubation für die Sensitivität wichtig ist (33), würden hier andere Mischverfahren eingesetzt werden müssen.

Aus den oben genannten Gründen wird für die folgenden Versuche zunächst das alte System weiter verwendet. Es ist erprobt und sicher und erscheint deshalb für die weitere experimentelle Entwicklung des Zytokinchips geeigneter. Die gleichzeitige ausführliche Erprobung der neuen Inkubationskammern und gleichzeitige Verbesserung des Arrays insgesamt erscheint nicht sinnvoll.

Die durchgeführten Versuche zeigen aber, dass die kleinere Variante des Inkubationssystems prinzipiell funktionsfähig ist und auf längere Sicht viele Vorteile bietet. Letztendlich ermöglichen nur die kleineren Inkubationskammern die wirtschaftliche und schnelle Analyse der Proben. Die hier dargestellten Probleme sind auch als durchaus lösbar zu beurteilen. So wurden die Inkubationskammern bereits mit Erfolg von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt (33).

6 Beurteilung

Zusammenfassend lässt sich folgende Gesamtbetrachtung abgeben:

Der verwendete Spotter ist zum Erstellen des hier verwendeten Microarrays nicht optimal. Die Zuverlässigkeit und Qualität der erzeugten Slides ist nicht ausreichend.

Beide genutzten Scanner eignen sich zum Erfassen der Microarrays; Der GenePix 4000B ist zu bevorzugen.

Die verwendeten Slides und Farbstoffe sind als gut einsetzbar einzuordnen.

Bei den verwendeten Antikörpern und Interleukinen ergibt sich ein gemischtes Bild. Zum Teil lässt sich, wie auch in Vorarbeiten gezeigt werden konnte [mündliche Mitteilung Nico Dankbar, Promotion Uta Heckhoff], eine gute Funktion feststellen. Viele Antikörper- und Antigenlösungen zeigen aber deutliche Qualitätsmängel, die sowohl produktionsbedingt als auch durch Lagerung verursacht sein können.

Die Methode des Sandwich-Microarrays ist zur Vermessung von Interleukinen in humanem Probenmaterial geeignet. Es können verschiedene Konzentrationen von Interleukinen in behandeltem Diluent, humanem Plasma und humanem Vollblut nachgewiesen werden. Die Vermessung von Realproben ist allerdings nur mit - durch oben genannte Probleme bedingten, starken Einschränkungen möglich.

Insgesamt kann die Vermessung von Interleukinkonzentrationen in humanem Probenmaterial (Plasma, Vollblut) mit dem hier vorgestellten System, unter der Voraussetzung, dass die oben genannten Probleme gelöst werden können, als machbar angesehen werden.

7 Ausblick

Kritischste Parameter bei der Gesamtprojektbetrachtung waren die massiven Schwierigkeiten beim Spotten der Slides. Die Qualität der Ergebnisse war trotz der Durchführung von zeitintensiven Optimierungsschritten unzureichend. Auch die zum Teil schlechte Qualität/Funktion der biologischen Materialien wie Antikörpern und Interleukinen verursachten Probleme. Dies mag dadurch begründet sein, dass im Allgemeinen auch heutzutage noch vor allem DNA-Microarrays erstellt werden. Die Proteomik entwickelt sich zwar rasch weiter, aber die Anwendung angepasster Geräte ist noch nicht ganz so weit fortgeschritten. Die spezifischen Probleme beim Spotten speziell von Proteinen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen erkannt, und es gibt Ansätze für Lösungen dieses Problems(23).

Durch solche Verbesserungen könnte die Leistung des hier vorgestellten Systems deutlich gesteigert werden, indem es an Robustheit im gesamten Herstellungs-, Inkubations- und Auswertungsprozess gewinnt. Dadurch werden noch kleinere, gleichmäßigere Spots möglich bei gleichzeitig steigender Spotdichte. Nach Ekins „ambient-assay“-Theorie (12) wird die Sensitivität des Systems zunehmen.

Es ist hier auch anzumerken, dass selbst kommerzielle Komplettsysteme noch mit Schwierigkeiten bei den Messungen zu kämpfen haben. So wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Analysen von kommerziellen Anbietern durchgeführt. Das System eines Anbieters konnte die in dem zur Verfügung gestellten humanen Plasma vorhandene Interleukinkonzentration nicht sicher bestimmen. Diese bleibenden Unsicherheiten sind der Grund, warum bis heute kein einziges Microarray-System zur simultanen Vermessung mehrerer Interleukine im menschlichen Probenmaterial zur klinischen Anwendung am Menschen zugelassen ist. Die Microarray-Technologie ist insbesondere auf dem Gebiet der Protein-Microarrays noch nicht ausgereift. Es fehlt teilweise immer noch an Lösungen und Methoden, um mit der sehr empfindlichen Substanzgruppe der Proteine sicher umgehen zu können.

Die Microarray-Technologie wird sich aber auch künftig weiter entwickeln, und es ist zu erwarten, dass sie in der klinischen Diagnostik der Zukunft eine große Rolle spielen wird. Die Vorteile der geringeren Probenvolumina, der schnelleren - weil parallelen Analyse - der höheren Sensitivität und des aus allen diesen Punkten folgenden Kostenvorteils werden sich durchsetzen. In weiterer Zukunft sind dann auch Microarray-Systeme in Praxen der niedergelassenen Ärzte im Sinne eines so genannten „Point-of-Care-Testing“ (Analyse von Proben direkt am Ort der Patientenversorgung) denkbar. Dabei verbinden sich die oben genannten Vorteile der Microarray-Analyse mit den Vorteilen der räumlichen Nähe zum Patienten, mit dem die Ergebnisse der Tests sofort besprochen werden können.

8 Abbildungen

Nr	Titel/Beschreibung	Seite
1	Funktionsprinzip eines Sandwich-Assays	2
2	GMS 417 Arrayer	13
3	Microarray-Scanner	14
4	Fluoreszenz Excitation der Farbstoffe Cy3 und Cy5	14
5	Aufbau eines Slides	16
6	Grid für die Versuche zur Markerverschleppung	21
7	Modifizierung des Inkubationssystems	23
8	Grid für die Versuche zum Aktivierungsrad der Slides	24
9	Auswertung von Scans des gleichen Slides	26
10	Auswertung von Scans verschiedener Slides	27
11	Darstellung der Folgen eines Meniskusabrisses	31
12	Darstellung der Verschleppung von Markersubstanz	32

9 Graphen / Diagramme

Nr	Titel/Beschreibung	Seite
1	Scannen mit dem GMS 418 mit Anpassung des Rasters	28
2	Scannen mit dem GenePix 4000B mit Anpassung des Rasters	29
3	Scannen mit dem GenePix 4000B ohne Anpassung des Rasters	29
4	Verschleppung von Marker	33
5	Vergleich der Signalintensitäten zwischen HC- und C-Slides	35
6	Abhängigkeit der Signalintensitäten vom Aktivierungsgrad	35
7	Fluoreszenz nach Inkubation des gesamten Slides mit Plasma	36
8	Photostabilität des Farbstoffes	38
9	Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides mit Diluent ohne pAK	39
10	Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides mit pAK gegen IL-2 und IL-10	39
11	Signalintensitäten nach Inkubation eines Slides mit pAK gegen IL-4	40
12	Verdünnungsreihe in Diluent	42
13	Verdünnungsreihe in humanem Plasma und in Vollblut	44
14	Ermittlung der IL-6 Konzentration in humanem Plasma	45
15	Signalintensitäten bei Lösung der Ag in verschiedenen Medien	46
16	Verdünnungsreihe mit neuer Variante des Inkubationssystems	48

10 Abkürzungen

µl	Mikroliter
Abb	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribunukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fresh Calf Serum
FFP	Fresh Frozen Plasma
IL	Interleukin
IVD	In Vitro Diagnostikum
LOD	Detektionslimit (limit of detection)
MA	Microarray
mAk	monoklonaler Antikörper
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
NaAc	Natriumacetat
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PMT	Photo Multiplier Tube
RCA	Rolling Circle Amplification
RNA	Ribunukleinsäure
S-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
SOP	Standardvorgehensweise

11 Literaturverzeichnis

- (1) Angenendt P, Glokler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials
2. *Anal Biochem* 2002 October 15;309(2):253-60.
- (2) Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions
1. *Anal Biochem* 2000 February 15;278(2):123-31.
- (3) Barbulovic-Nad I, Lucente M, Sun Y, Zhang M, Wheeler AR, Bussmann M. Bio-microarray fabrication techniques--a review
1. *Crit Rev Biotechnol* 2006 October;26(4):237-59.
- (4) Charles PT, Goldman ER, Rangasammy JG, Schauer CL, Chen MS, Taitt CR. Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications
1. *Biosens Bioelectron* 2004 November 1;20(4):753-64.
- (5) Chen F, Jiang X, Chen X, Liu G, Ding J. Effects of Downregulation of Inhibin alpha Gene Expression on Apoptosis and Proliferation of Goose Granulosa Cells
2. *J Genet Genomics* 2007 December;34(12):1106-13.
- (6) Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardias SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas
1. *Mol Cell Proteomics* 2002 April;1(4):304-13.
- (7) Chen GY, Uttamchandani M, Zhu Q, Wang G, Yao SQ. Developing a strategy for activity-based detection of enzymes in a protein microarray
50. *ChemBioChem* 2003 April 4;4(4):336-9.
- (8) Copeland S, Siddiqui J, Remick D. Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines
1. *J Immunol Methods* 2004 January;284(1-2):99-106.
- (9) de JW, te VH, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells
1. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 January;10(1):133-9.

- (10) Derwinska K, Gheber LA, Preininger C. A comparative analysis of polyurethane hydrogel for immobilization of IgG on chips
3. *Anal Chim Acta* 2007 June 5;592(2):132-8.
- (11) Ekins RP. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique
17. *Clin Chim Acta* 1960 July;5:453-9.
- (12) Ekins RP. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays
1. *Clin Chem* 1998 September;44(9):2015-30.
- (13) Ekins RP, Chu FW. Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future
2. *Clin Chem* 1991 November;37(11):1955-67.
- (14) Ekins RP, Chu R, Biggart E. The development of microspot, multi-analyte radiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies. *Anal Chim Acta* , 73-96. 1990.
Ref Type: Magazine Article
- (15) Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G
3. *Immunochemistry* 1971 September;8(9):871-4.
- (16) Fare TL, Coffey EM, Dai H, He YD, Kessler DA, Kilian KA, Koch JE, LeProust E, Marton MJ, Meyer MR, Stoughton RB, Tokiwa GY, Wang Y. Effects of atmospheric ozone on microarray data quality
1. *Anal Chem* 2003 September 1;75(17):4672-5.
- (17) Gu Q, Sivanandam TM, Kim CA. Signal stability of Cy3 and Cy5 on antibody microarrays
1. *Proteome Sci* 2006;4:21.
- (18) Gutmann O, Kuehlewein R, Reinbold S, Niekrawietz R, Steinert CP, De HB, Zengerle R, Daub M. A highly parallel nanoliter dispenser for microarray fabrication. *Biomed Microdevices* 2004 June;6(2):131-7.
- (19) Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast
1. *Mol Cell Biol* 1999 March;19(3):1720-30.
- (20) Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions
1. *Genome Biol* 2001;2(2):RESEARCH0004.
- (21) Hans-Dieter Volk, Gernot Keyßer, Gerd-Rüdiger Burmester. Zytokine und Zytokinrezeptoren. In: Lothar Thomas, editor. *Labor und*

Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 2005. p. 1039-51.

- (22) Hartmann A, Thieme M, Nanduri LK, Stempf T, Moehle C, Kivisild T, Oefner PJ. Validation of microarray-based resequencing of 93 worldwide mitochondrial genomes
1. Hum Mutat 2008 July 11.
- (23) Hartmann M, Sjodahl J, Stjernstrom M, Redeby J, Joos T, Roeraade J. Non-contact protein microarray fabrication using a procedure based on liquid bridge formation
1. Anal Bioanal Chem 2008 November 21.
- (24) Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawy MM, Knechtle SJ. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction
4. Am J Transplant 2004 March;4(3):432-7.
- (25) Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system
10. Anal Biochem 2001 July 1;294(1):55-62.
- (26) Imai E, Takenaka M, Nagasawa Y, Kaimori J, Hori M. Application of microarray assay to nephrology
11. Nephrol Dial Transplant 2000;15 Suppl 6:78-80.
- (27) Joos TO, Schrenk M, Hopfl P, Kroger K, Chowdhury U, Stoll D, Schorner D, Durr M, Herick K, Rupp S, Sohn K, Hammerle H. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. Electrophoresis 2000 July;21(13):2641-50.
- (28) Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP, Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. Cytometry B Clin Cytom 2004 September;61(1):35-9.
- (29) Klaus Dörner, Th.Deufel, Renate Dörner. Allgemeine Klinische Chemie. In: Klaus Dörner, editor. Klinische Chemie und Hämatologie. 5 ed. Thieme; 2001. p. 28-31.
- (30) Knight PR, Sreekumar A, Siddiqui J, Laxman B, Copeland S, Chinnaiyan A, Remick DG. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. Shock 2004 January;21(1):26-30.
- (31) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975
1. J Immunol 2005 March 1;174(5):2453-5.

- (32) Kusnezow W, Hoheisel JD. Solid supports for microarray immunoassays
2. J Mol Recognit 2003 July;16(4):165-76.
- (33) Kusnezow W, Syagailo YV, Ruffer S, Klenin K, Sebald W, Hoheisel JD, Gauer C, Goychuk I. Kinetics of antigen binding to antibody microspots: strong limitation by mass transport to the surface
1. Proteomics 2006 February;6(3):794-803.
- (34) Lee KB, Park SJ, Mirkin CA, Smith JC, Mrksich M. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography
2. Science 2002 March 1;295(5560):1702-5.
- (35) Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB, Curty FH, Passos MC, Moura EG. Neonatal Low-Protein Diet Changes Deiodinase Activities and Pituitary TSH Response to TRH in Adult Rats
1. Exp Biol Med (Maywood) 2008 January;233(1):57-63.
- (36) Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification
1. Nat Genet 1998 July;19(3):225-32.
- (37) MacBeath G. Protein microarrays and proteomics
6. Nat Genet 2002 December;32 Suppl:526-32.
- (38) MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination
7. Science 2000 September 8;289(5485):1760-3.
- (39) Mathias M.Müller, Andrea Griesmacher. Labordiagnostische Überwachung nach Organtransplantation. In: Lothar Thomas, editor. Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 2005. p. 1214-25.
- (40) Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P, Kotsch K. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function
2. Kidney Int 2006 May;69(9):1683-90.
- (41) Melton L. Protein arrays: proteomics in multiplex
6. Nature 2004 May 6;429(6987):101-7.
- (42) Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays
2. Nat Biotechnol 2003 December;21(12):1509-12.

- (43) Moody MD, Van Arsdell SW, Murphy KP, Orencole SF, Burns C. Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines
16. *Biotechniques* 2001 July;31(1):186-4.
- (44) Myles L.Mace Jr., Jean Montagu, Stanley D.Rose, Greg McGuinness. Novel Microarray Printing and Detection Technologies. In: Mark Schena, editor. *Microarray Biochip Technology*. Eaton Publishing; 2000. p. 39-64.
- (45) Nallur G, Luo C, Fang L, Cooley S, Dave V, Lambert J, Kukanskis K, Kingsmore S, Lasken R, Schweitzer B. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays
1. *Nucleic Acids Res* 2001 December 1;29(23):E118.
- (46) Okamoto T, Suzuki T, Yamamoto N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology
1. *Nat Biotechnol* 2000 April;18(4):438-41.
- (47) Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for a quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and *Haemophilus influenzae* Type b
8. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 July;9(4):872-6.
- (48) Piner RD, Zhu J, Xu F, Hong S, Mirkin CA. "Dip-Pen" nanolithography
1. *Science* 1999 January 29;283(5402):661-3.
- (49) R.P.Ekins, F.W.Chu. Multianalyte microspot immunoassay - Microanalytical "Compact Disk" of the future. *Clin.Chem.* 37, 1955-1967. 1991.
Ref Type: Magazine Article
- (50) Richard Hautmann, Hartwig Hulan. *Nierentransplantation*. Urologie. Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 467-76.
- (51) Saviranta P, Okon R, Brinker A, Warashina M, Eppinger J, Geierstanger BH. Evaluating sandwich immunoassays in microarray format in terms of the ambient analyte regime
1. *Clin Chem* 2004 October;50(10):1907-20.
- (52) Schaferling M, Nagl S. Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Anal Bioanal Chem* 2006 June;385(3):500-17.
- (53) 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. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification
1. *Nat Biotechnol* 2002 April;20(4):359-65.

- (54) Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, O'Malley S, Kukanskis K, Zhu Z, Kingsmore SF, Lizardi PM, Ward DC. Inaugural article: immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection
1. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 August 29;97(18):10113-9.
- (55) Seuryneck-Servoss SL, White AM, Baird CL, Rodland KD, Zangar RC. Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays
2. Anal Biochem 2007 December 1;371(1):105-15.
- (56) Silzel JW, Cercek B, Dodson C, Tsay T, Obremski RJ. Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection
1. Clin Chem 1998 September;44(9):2036-43.
- (57) Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins
2. Cancer Res 2001 October 15;61(20):7585-93.
- (58) Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO. Protein microarray technology
10. Trends Biotechnol 2002 April;20(4):160-6.
- (59) Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells
10. Mol Cell Proteomics 2004 October;3(10):960-9.
- (60) Wang CC. Protein array-based multiplexed cytokine assays
4. Methods Mol Biol 2007;385:177-92.
- (61) Wang D, Liu S, Trummer BJ, Deng C, Wang A. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells
3. Nat Biotechnol 2002 March;20(3):275-81.
- (62) Weibel C. The Spotting Accelerator, customizable head assembly for advanced microarraying. Journal of the Association for Laboratory Automation 2002 June;91-6.
- (63) Weissenstein U, Schneider MJ, Pawlak M, Cicenias J, Eppenberger-Castori S, Oroszlan P, Ehret S, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Eppenberger U. Protein chip based miniaturized assay for the simultaneous quantitative monitoring of cancer biomarkers in tissue extracts
1. Proteomics 2006 March;6(5):1427-36.

- (64) Williams DF, Askill IN, Smith R. Protein absorption and desorption phenomena on clean metal surfaces
1. J Biomed Mater Res 1985 March;19(3):313-20.
- (65) Wolfram H.Marx, Wiesmann, Susanne Siewert, Nico Dankbar, Peter Rauch, Christoph Specht. Immunoassay - Die Crux mit den Kreuzaktivitäten. labor&more . 2006.
Ref Type: Magazine Article
- (66) Y.Li NNaWMR. Parallel comparison of sandwich and direct label assay protocols on cytokine detection protein arrays. Anal.Chem. 21-10-2003.
Ref Type: Magazine Article
- (67) Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
4. J Clin Invest 1960 July;39:1157-75.
- (68) Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, Blasick TM, Potdar S, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury
1. Kidney Int 2007 December 26.
- (69) Zhou SP, Wang XR, Qin SY, Lin ZX, Liu JH. [Preparation and application of gel chip]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2003 September;19(5):577-80.
- (70) Zhu H, Stybayeva G, Macal M, Ramanculov E, George MD, Dandekar S, Revzin A. A microdevice for multiplexed detection of T-cell-secreted cytokines
1. Lab Chip 2008 December;8(12):2197-205.

12 Lebenslauf

13 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang, der mir diese Arbeit ermöglichte und mir bei Fragen oder Problemen immer sofort helfend zur Seite stand.

Mein Dank gilt ebenso meinem Betreuer Herrn Dipl.-Chemiker Nico Dankbar, dem ich insbesondere wichtige Ratschläge zur praktischen Durchführung der Versuche verdanke und der auch für weitergehende Erklärungen stets zur Stelle war.

Frau Dr. med. dent. Uta Heckhoff danke ich für die Einarbeitung in das Projekt und wichtige Ratschläge.

Den Mitarbeitern der experimentellen Nephrologie des Universitätsklinikums Münster danke ich für die Unterstützung, die mir vor allem in der Startphase der experimentellen Tätigkeit eine große Hilfe war.

Herrn Professor Dr. med Hermann Pavenstädt, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik D, danke ich für die Bereitstellung der Laborräumlichkeiten und Materialien

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglichten und die mich während der letzten Jahre jederzeit unterstützten.