Autoantikörper

Multiparametrische Antikörperdetektion für die Diagnostik

FRANZISKA DINTER¹, CHRISTOPH JURISCHKA¹, ROMANO WEISS¹, STEFAN RÖDIGER^{1, 2}

¹ BTU COTTBUS-SENFTENBERG

² FAKULTÄT FÜR GESUNDHEITSWISSENSCHAFTEN, GEMEINSAME EINRICHTUNG DER UNIVERSITÄT POTSDAM, DER MEDIZINISCHEN HOCHSCHULE BRANDENBURG THEODOR FONTANE UND DER BTU COTTBUS-SENFTENBERG

Antibodies are used in diagnostic tests, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and protein arrays. They serve either as a detection molecule or target (e.g., autoantibodies). For point-of-care diagnostics it is important to develop efficient technologies for multiparametric antibody testing to simplify and accelerate the diagnostics. For the realization of microfluidic systems and low-cost alternatives, for example 3D printing or new polymer networks are used.

DOI: 10.1007/s12268-020-1375-5

© Die Autoren 2020

■ Aufgrund von Versorgungslücken und Mangel an medizinischen Fachkräften in ländlichen Regionen ist es wichtig, effiziente Technologien für die patientennahe Labordiagnostik (*point-of-care testing*, POCT) zu entwickeln. Herkömmliche Diagnoseverfahren beruhen auf der Anamnese und qualitativen sowie quantitativen Messungen von Biomarkern mit immobilisierten Analysegeräten. Durch die Entwicklungen von portablen, vernetzten Analysegeräten und die daraus resultierende Zusammenführung von Labor- und POCT-Methoden (z. B. Mikrofluidiksysteme, *lab-on-a-chip*) kann eine enge Vernetzung zwischen Patienten, medizinischem Personal, Ärzten und der modernen Medizintechnik geschaffen werden [1].

Verschiedene diagnostische Verfahren nutzen Antikörper als Detektionsmoleküle, um Biomarker nachzuweisen, oder als Target (z. B. Autoantikörper). Antikörper sind Glykoproteine, die gegen eindringende Immungene (z. B. Krankheitserreger) schützen. Durch ihre hohe Spezifität und Affinität für das Immunogen binden sie an Antigenbestimmende Substanzen (Epitope). Zu den klassischen Tests gehören unter anderem der *lateral flow assay* (LFA), der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und der Radioimmunoassay (RIA). Sie sind aber auch für weitere Verfahren geeignet.

Mikrofluidische Systeme für die antikörperbasierte *point-of-care* Diagnostik

Durch Mikrofluidik kann man kleine Volumina (Piko- bis Mikroliter) auf engstem Raum (unter einem Mikrometer) bewegen und schnell analysieren. Vorteile gegenüber herkömmlichen Analysemethoden ergeben sich in der Materialreduktion von Patientenproben und der Zeitersparnis durch automatisierte Arbeitsschritte. Gegenüber der Analyse auf der Makroebene ist dies auf das veränderte Verhalten (nicht-turbulent, niedrige Reynolds- bzw. Grashof-Zahl) der Flüssigkeit im Mikrovolumen zurückzuführen. Diese Systeme haben ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, was erhöhte Sensitivität und geringe lokale Temperaturfluktuationen bedingt. Daher ist die Inkubationszeit reduziert (unter 30 Min.) [1, 2]. Wenn mehrere Analyten simultan nachgewiesen werden sollen, müssen Strategien dafür gefunden werden. Ein Ansatz sind Arrays, wie Mikroarrays.

Antikörper im mikrofluidischen System

Seit einigen Jahren wird über die Rolle von Autoantikörpern bei kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert – unabhängig

davon, ob die Person durch eine Autoimmunerkrankung betroffen ist oder nicht. Beispielsweise wurden Autoantikörper gegen den Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und das oxidierte LDL (oxLDL) in der Literatur beschrieben. Beide spielen eine Rolle bei dem systemischen Lupus erythematoses (SLE). CRP-Autoantikörper korrelieren mit dem akuten Koronarsyndrom und legen eine Verbindung zwischen dem systemischen Lupus erythematoses und dem kardiovaskulären Risiko nah. Ein erhöhtes Niveau von Anti-oxLDL weist auf Atherosklerose hin und kann auch als Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen dienen. Um diese Autoantikörper und Entzündungsmarker nachweisen zu können, werden verschiedene diagnostische Verfahren wie ELISA oder Proteinarrays eingesetzt. Für POCT reicht oft ein kleines Panel von Biomarkern aus.

Wir haben ein Modell für die multiparametrische Detektion von Autoantikörpern und DNA-basierten Biomarkern durch die Kombination eines mikrofluidischen Systems (**Abb. 1A**), multiplexen Mikropartikelarrays (**Abb. 1B**) und Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Die Bilddaten wurden mittels *Bioimage informatics* ausgewertet [3]. Wir haben Modellautoantikörper gegen Zielproteine wie CRP, *brain natriuretic peptide* (BNP) und *low-density lipoprotein* (LDL) verwendet. Zusätzlich wurde zellfreie mitochondriale DNA (cfmDNA) mittels sequenzspezifischer DNA-Sonden nachgewiesen. Die Zielproteine und DNA-Sonden wurden an Fluoreszenz- und Größen-codierte Mikropartikel gekoppelt. Dabei sind die Mikropartikel zufällig auf einer Durchflusszelle immobilisiert. Die Proben-, Antikörper- und Sondenlösungen werden mittels Pumpsystem durch die Mikrokanäle gepumpt und über die Mikropartikel geleitet. Anschließend wurden die mikrofluidischen Chips mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Haben Antikörper oder Sonden an einen der jeweiligen Biomarker gebunden, wird dies über eine rote Fluoreszenz um das Mikropartikel herum sichtbar (**Abb. 1C**). Bisher wurden drei verschiedene

Abb. 1: Mikrofluidische Systeme für die antikörperbasierte *point-of-care*-Diagnostik. **A**, Der Mikrofluidikchip (FlowFlex-Kartuschen, BiFlow Systems GmbH) besteht aus sechs Reaktionskammern, einer Abfallkammer und einer Durchflusszelle. Die Durchflusszelle befindet sich auf einer schwarzen Folie mit geringer Autofluoreszenz. Auf der Durchflusszelle wurden die Mikropartikel (aus **B**) immobilisiert. **B**, Symbolbilder der verwendeten Mikropartikelpopulationen mit den Biomarkern Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL und cfmdNA (siehe Text). Die Mikropartikelpopulationen unterscheiden sich anhand ihrer Größe und ihrer Fluoreszenzcodierung [4]. **C**, Die immobilisierten Mikropartikel auf der Durchflusszelle sind in Falschfarben dargestellt. **D**, Biomarker werden durch Immunfluoreszenz auf der Mikropartikeloberfläche sichtbar (rote Corona).

Autoantikörpermodelle (Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL) und ein DNA-Modell (cfmdNA) in das System integriert. Das System kann auf 18 Mikropartikelpopulationen erweitert werden [4].

Hydrogele als Matrix für antikörperbasierte Tests

Eine Möglichkeit, um den Multiplexgrad zu erhöhen und Proben zu prozessieren (z. B. Filtern), sind Hydrogele. Diese polymeren Netzwerke können durch eine einfache Vernetzungsschemie hergestellt werden. Sie bestehen beispielsweise aus Polymeren aus dendritischem Polyglycerin (dPG) und Polyethylenglykol (PEG). Durch unterschiedliche Polymermischungsverhältnisse können die

Porengrößen eingestellt und Hydrogele somit als größenselektive Filter eingesetzt werden. Der Zusammenschluss der Polymerstrukturen beeinflusst nicht die Aktivität der eingesetzten Biomoleküle. Des Weiteren haben sie Antifouling-Eigenschaften und verhindern unspezifische Bindungen. Wir nutzten diese Technologie, um fluoreszenzmarkierte Antikörper, Fab-Fragmente und Oligonukleotide in Schichten (*layer*) mit verschiedenen Porengrößen zu separieren. In den Schichten befinden sich Fluoreszenz-codierte, beschichtete Mikropartikel, an welche die einzelnen Biomarker binden können. Die Biomarker können nun durch eine rote Corona mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (**Abb. 1D**, [5]).

3D-Druck für die funktionelle Bioanalytik

In der Forschung und Entwicklung besteht ein hoher Bedarf an innovativen Konzepten, mit denen komplexe bioanalytische Systeme entwickelt werden können. Dabei gewinnen Technologien, wie der 3D-Druck (3DP) an Bedeutung. Diese Technik bietet Vorteile, da dreidimensionale, funktionale Modelle schnell und maßgeschneidert produziert werden können. 3D-gedruckte Objekte wurden bereits in der Bioanalytik (z. B. Zellmessungen, Blutuntersuchung), der Forensik oder der Tumordiagnostik mittels DNA- und Protein-Biomarkern verwendet [6, 7]. Hierfür stehen verschiedene Materialien zur Verfügung, die aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften (Schmelzverhalten, mechanische und chemische Stabilität, Kristallinität, spektrale Charakteristika) nur für bestimmte Anwendungen geeignet sind [7]. Moderne 3DP-Systeme haben eine hohe Präzision, sodass feine und hochwertige 3D-Drucke erstellt werden können. Der Einsatz in der Milli- (größer als ein Millimeter) bis hin zur Mikrofluidik (kleiner als 100 Mikrometer) ist möglich. In antikörperbasierten Anwendungen wie dem ELISA können durch 3D-Druck Sensitivitätssteigerungen erzielt werden [6].

Abbildung 2 verdeutlicht anhand eines mit Kanälen und Probenreservoirs bedruckten Kunststoffobjekttträgers die Möglichkeit, individuelle Testobjekte schnell per 3D-Druck zu erstellen (*Rapid Prototyping*). In den Vertiefungen, die als separate Reaktionsräume dienen, können Biomoleküle immobilisiert oder Zellen kultiviert werden (**Abb. 2B**). Wir druckten Systeme, um DNA-Doppelstrangbrüche (DSB; Biomarker für den Effekt einer Krebstherapie [3]) in adhärenierten Tumorzellen (SiHa-Zellen, ATCC® HTB-35™, Zervixkarzinom) mittels Immunocytochemie nachzuweisen. Nach Versiegelung mit Deckgläsern wurden die Kammern über fluidische Kanäle (400 Mikrometer) befüllt und gewaschen. Der Nachweis der DSB-assoziierten Biomarker γ H2AX und 53BP1 erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Fluoreszenzmikroskopie (**Abb. 2C**). Die Quantifizierung mittels digitaler Bildanalyse ergab im Durchschnitt $3,1 \pm 5,0$ γ H2AX-Foci pro Zelle (**Abb. 2D**). Besonders in fluoreszenzbasierten Assays ist zudem die Materialwahl entscheidend. Autofluoreszenzanalysen von Kunststoffen zeigten weiterhin, dass diese unterschiedliche spektrale Eigenschaften (Autofluoreszenz) besitzen, die eine

Abb. 2: 3D-Druck für die Bioanalytik. Dargestellt ist die antikörperbasierte Detektion von Doppelstrangbrüchen (DSB) in der Tumorzelllinie SiHa (ATCC® HTB-35™, Zervixkarzinom) auf einem durch 3D-Druck modifizierten Objektträger. **A**, Modell des mittels 3D-Druck modifizierten Objektträgers (CAD, computer-aided design). **B**, Die Suspension einer Vorkultur wurde in die Kammern pipettiert. Die SiHa-Zellen adhärten über Nacht auf der Objektträgeroberfläche. **C**, Nach Fixierung der Zellen (2 % PFA) wurden die DSB-assoziierten Biomarker γH2AX (grün, FITC) und 53BP1 (rot, Cy5) durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Bildausschnitt aus der konfokalen Mikroskopie) und deren Signale mittels *Bioimage informatics* [3] quantifiziert. Zur Identifizierung der Zellkerne (blau, DAPI) wurde die DNA gefärbt. Maßstab: 20 µm. **D**, Die Häufigkeit der Biomarker γH2AX und 53BP1 unterscheidet sich. Die meisten Zellen haben nur wenige Doppelstrangbrüche.

Korrespondenzadresse:

Dr. Stefan Rödiger
BTU Cottbus – Senftenberg
Campus Senftenberg
Institut für Biotechnologie
Universitätsplatz 1
D-01968 Senftenberg
Stefan.Roediger@b-tu.de

AUTOREN

Franziska Dinter

Jahrgang 1990. 2009–2016 Biotechnologiestudium (B. Sc., M. Sc.) an der BTU Cottbus-Senftenberg. 2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin der Attomol GmbH, Lipten. 2016–2019 wissenschaftliche Mitarbeiterin und seit 2019 Promotion an der BTU-Cottbus-Senftenberg.

Christoph Jurischka

Jahrgang 1990. 2011–2017 Biotechnologiestudium (B. Sc., M. Sc.) an der BTU Cottbus-Senftenberg. Abschlussarbeiten in der pharmazeutischen Krebsforschung (HZDR, Dresden-Rossendorf) und der Grundlagenforschung zu regenerativen Therapien (CRTD, Dresden). Seit 2017 wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion an der BTU Cottbus-Senftenberg.

Romano Weiss

Jahrgang 1993. 2012–2018 Biotechnologiestudium (B. Sc., M. Sc.) an der BTU Cottbus-Senftenberg. Abschlussarbeiten in der Brustkrebsforschung (Universitätsklinikum Leipzig) und Untersuchungen zu Interleukinen (Universitätsklinikum Dresden). Seit 2019 wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotionsstudent an der BTU Cottbus-Senftenberg.

Stefan Rödiger

Jahrgang 1979. Pharmabiotechnologie und Forensiker. 2005–2006 technischer Mitarbeiter an den Universitäten Leipzig und Dresden. 2007–2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschule Lausitz (FH). 2013 Promotion an der Charité, Berlin. 2012–2013 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Attomol GmbH, Lipten. Seit 2013 Arbeitsgruppenleiter an der BTU Cottbus-Senftenberg und 2017–2018 Associate an der University of Surrey, UK.

Auswertung negativ beeinflussen können und bei der Verwendung berücksichtigt werden müssen [7].

Fazit

Antikörper können in vielseitigen diagnostischen Tests, einschließlich enzymgebundener Immunassays und Proteinarrays, verwendet werden. Die Antikörper dienen entweder als Nachweismolekül oder als Ziel (z. B. Autoantikörper). Für die *point-of-care*-Diagnostik ist es wichtig, effiziente Technologien für multiparametrische Antikörpertests zu entwickeln, um die Diagnostik zu vereinfachen und zu beschleunigen. Für die Realisierung mikrofluidischer Systeme und kostengünstiger Alternativen werden z. B. 3D-Druck oder neue Polymernetzwerke eingesetzt.

Literatur

- [1] Jung W, Han J, Choi J-W et al. (2015) Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. *Microelectron Eng* 132:46–57
- [2] Dinter F, Burdukiewicz M, Schierack P et al. (2019) Simultaneous detection and quantification of DNA and prote-

in biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. *Anal Bioanal Chem* 411:7725–7735

- [3] Schneider J, Weiss R, Ruhe M et al. (2019) Open source bioimage informatics tools for the analysis of DNA damage and associated biomarkers. *J Lab Precis Med* 4:1–27
- [4] Rödiger S, Schierack P, Böhm A et al. (2013) A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 133:35–74
- [5] Herrmann A, Rödiger SJ, Schmidt C et al. (2019) Spatial separation of microbeads into detection levels by a bioorthogonal porous hydrogel for size-selective analysis and increased multiplexity. *Anal Chem* 91:8484–8491
- [6] Singh H, Shimojima M, Shiratori T et al. (2015) Application of 3D printing technology in increasing the diagnostic performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious diseases. *Sensors* 15:16503–16515
- [7] Jurischka C, Dinter F, Efimova A et al. (2019) An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *Clin Hemorheol Microcirc*, doi: 10.3233/CH-190713

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.