

Eine biomimetische Sensoroberfläche zur Detektion von Autoantikörpern, welche beim Antiphospholipidsyndrom gebildet werden

U. Hilbig¹, O. Bleher¹, A. Le Blanc¹, G. Proll¹, S. Rau¹, G. Gauglitz¹

*¹Eberhard Karls Universität, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie,
Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Deutschland
urs.hilbig@uni-tuebingen.de*

Abstract

Um Autoantikörper des Antiphospholipidsyndroms (APS) zu Quantifizieren, wurde ein biomimetischer Sensor entwickelt. Anti- β_2 -Glykoprotein-I (β_2 GP-I) Antikörper und Anti-Cardiolipin Antikörper sind die beiden wichtigsten Laborparameter des APS [1]. Für beide Parameter wurde ein, auf geladenen Doppellipidmembranen beruhender, Assay entwickelt.

Die Detektion von Autoantikörpern, welche gegen das β_2 GP-I gerichtet sind, ist noch immer eine Herausforderung [2]. Bei der hier vorgestellten Detektionstechnik werden die den Anti- β_2 GP-I Antikörper bindenden Epitope des β_2 GP-I nach Anbindung an negative geladene Doppellipidmembranen exponiert [3]. Die Oberfläche des biomimetischen Sensors wurde folglich mit geladenen Membranen modifiziert, um β_2 GP-I Moleküle als Erkennungsstrukturen zu Immobilisieren und Anti- β_2 GP-I Antikörper zu detektieren.

Um Anti-Cardiolipin Antikörper zu detektieren kann direkt mit einer Cardiolipin enthaltenden, geladenen Doppellipidmembran gemessen werden.

Ein milder Regenerationsschritt erlaubt viele aufeinanderfolgende Messungen, ohne die Doppellipidmembran zwischen den Messungen neu präparieren zu müssen. Indem die labelfreie Methode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) [4] genutzt wurde, war es möglich Anti- β_2 GPI Antikörper und Anti-Cardiolipin Antikörper in Phosphatpuffer zu quantifizieren. Erste Messungen in Humanserum wurden durchgeführt und zeigen, dass der entwickelte Assay zur klinischen Testung von Patientenseren verwendet werden könnte. Es werden erste Vergleichsmessungen des Assays in Phosphatpuffer und in Humanserum gezeigt.

Key words: Biosensor, Reflectometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), Doppellipid Membran, Antiphospholipid Syndrom (APS), β_2 -Glykoprotein-I

1 Einleitung

Das Antiphospholipidsyndrom (APS) ist eine Autoimmunerkrankung. Es werden sogenannte Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen ausgebildet. Die Autoantikörper führen im Falle eines Krankheitsschubes zu starken Beeinflussungen der Blutgerinnungskaskade. Es kann zu vaskulären Thrombosen oder Aborten bei Schwangeren kommen, indem die Inhibierung der Blutgerinnungskaskade durch β_2 GP-I zu einer Induktion umgekehrt wird.

Die Prävalenz für diese Erkrankung ist bei Frauen mit erhöhten IFN- α und - β Spiegeln während entzündlichen Erkrankungen am Höchsten. Während des gesamten Krankheitsverlaufs zeigt die Erkrankung eine sehr unspezifische klinische Symptomatik.

Folglich gewinnen zuverlässig ermittelte Laborparameter bei der Krankheitsdiagnostik an Bedeutung.

Die wichtigsten Laborwerte sind: IgG Anti- β_2 GP-I Antikörper und IgG Anti-Cardiolipin Antikörper (nach: [1]). Nach einer erfolgreichen Diagnose kann eine medikamentöse Therapie relativ einfach zur Bekämpfung und Beseitigung der Symptomatik beitragen.

2 Methoden

2.1 Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Als Messmethode wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) gewählt. Es handelt sich um eine direkte optische

Bestimmungsmethode. Assoziations- und Dissoziationsvorgänge können zeitabhängig untersucht und dadurch Konzentrationen, nach erfolgter Kalibrierung, gemessen und Kinetiken bestimmt werden [5-10]. Es wird ein mehrschichtiger Glastransducer verwendet, an den eine geladene Doppellipidmembran aufgebracht wird. Je nachdem welcher Autoantikörper detektiert werden soll ist die Membran selbst die Erkennungsstruktur bzw. β_2 GP-I wird zusätzlich als Erkennungsstruktur aufgebracht.

Der Glastransducer wird mit Weißlicht bestrahlt und das entstandene Interferenzspektrum mittels eines Diodenzeilenspektrometers ausgewertet. Lagert sich ein Analyt an den fixierten Ligand an, wird dies durch die Verschiebung des Minimums des Interferenzspektrums detektierbar. Lässt sich der Analyt wieder vom Glastransducer entfernen, ist dies auch verfolgbar. In diesem Fall ist das System eventuell regenerierbar.

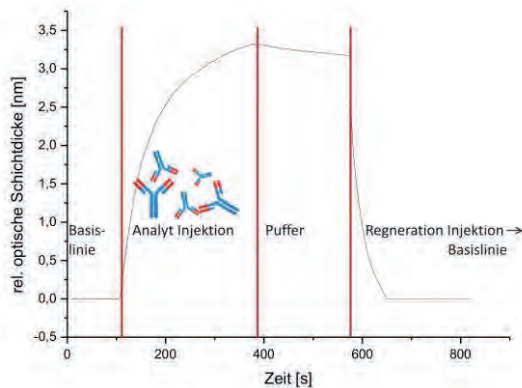


Fig. 1. Schematischer Ablauf des Immunoassays. Die roten Balken unterteilen die verschiedenen Assayschritte.

2.2 Die Präparation der künstlichen, geladenen Doppellipidmembran

Die Präparationsschritte:



Fig. 2. Schritt 1: $PEG(COOH)_2$ und $PEG(Lipidanker)$ werden auf die aktivierte Transduceroberfläche aufgebracht.

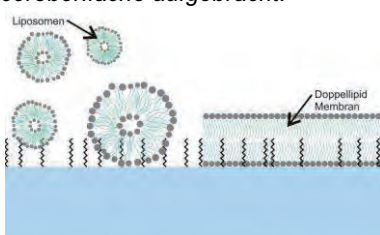


Fig. 3. Schritt 2: Die Membranpräparation erfolgt mit Cardiolipin (CL) oder Phosphatidylserin (PS) beinhaltenden Vesikeln. Aus Ihnen formt sich eine Doppellipidmembranartige Struktur.

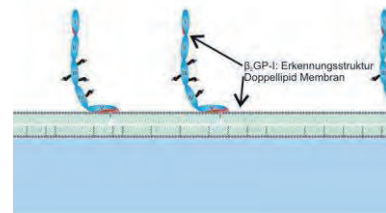


Fig. 4. Schritt 3: Das β_2 Glykoprotein-I bindet an die geladenen, künstlichen Membranen. Sie ermöglichen eine biomimetische Konformationsänderung, wie im Organismus, ohne Beschädigung des β_2 Glykoprotein-I. Nach der Konformationsänderung sind die relevanten Epitope nicht mehr abgeschirmt und stehen somit als Erkennungsstruktur für die Anti- β_2 GP-I Antikörper zur Verfügung.

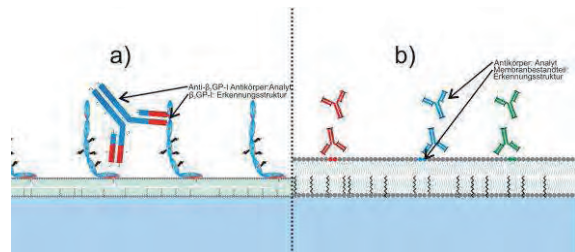


Fig. 5. Mit dem Immunoassay werden entweder nach Schritt 3 mittels des immobilisierten β_2 Glykoproteins-I Anti- β_2 GP-I Antikörper detektiert (a). Oder es werden Anti-Cardiolipin Antikörper nach Schritt 2 mittels der Doppellipidmembran mit dem enthaltenen Cardiolipin detektiert (b).

Modifiziert nach: [11]

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Anti- β_2 GP-I Antikörper in PBS

Um im Folgenden mit den Messungen in Humanserum vergleichen zu können wird die in [11] publizierte Kalibrierkurve gezeigt.

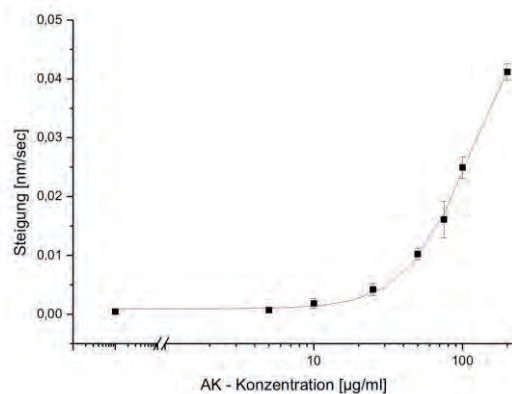


Fig. 6. Kalibrierkurve in PBS, ein logistischer Fit wurde angewendet [11].

Bei der Auswertung der Anti- β_2 GP-I Antikörper Anbindung wurde die Steigung zu Beginn der Messung ausgewertet. Details zur Auswertung der Kalibrierkurve und zu Wiederfindungsraten können [11] entnommen werden.

3.2 Quantifizierung der Anti-Cardiolipin Antikörper in PBS

Bei der Quantifizierung der Anti-Cardiolipin Antikörper ergab sich, halblogarithmisch aufgetragen, ein linearer Kurvenfit.

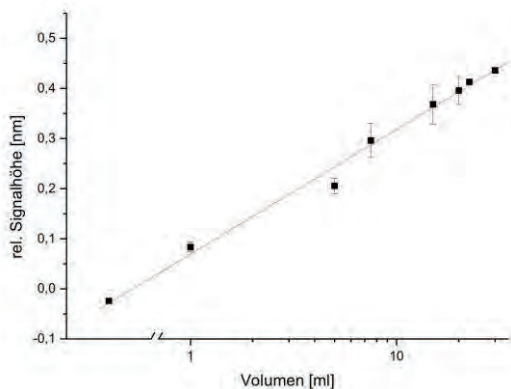


Fig. 7. Kalibrierkurve in PBS, ein linearer Fit wurde angewendet.

Die rel. Signalthöhe in nm wurde ausgewertet. Es wurde mit 0-100% Antikörper – Stock Lösung gemessen. Die Anti-Cardiolipin Antikörper besitzen eine Aktivität von 85-120 GPL. Die Kalibrierkurven der beiden Autoantikörper zeigen unterschiedliche Verläufe. Dies ist der Fall, da unterschiedliche Auswertemethoden gewählt wurden. Außerdem binden die Anti-Cardiolipin Antikörper direkt an die Membran und die Anti- β_2 GP-I Antikörper an ein membranständiges Protein (β_2 GP-I). Dies resultiert in stark unterschiedlichen Affinitäten. Es könnte sein, dass bei den Anti-Cardiolipin Antikörpern nur im linearen Bereich einer sigmoidalen Funktion gemessen wurde. Weitere Messungen werden hier Klarheit schaffen.

Durch weitere Anpassungen und Optimierungen soll der Assay noch weiter verbessert werden, da aufgrund apparativer Schwierigkeiten das Signal gering und bei manchen Messpunkten keine Dreifachmessungen möglich waren. Außerdem soll mit weiteren Messverfahren die genaue Antikörperkonzentration ermittelt werden.

3.3 Erste Messungen der Anti- β_2 GP-I Antikörper in Humanserum

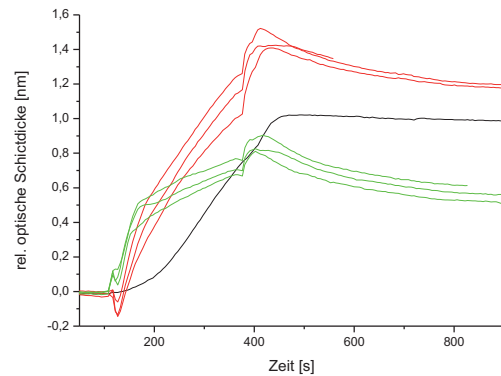


Fig. 8. Die Abbildung zeigt die Detektion der Anti- β_2 GP-I Antikörper. Die schwarze Linie zeigt die Detektion in PBS. Die grünen Linien zeigen die Messungen in 50 % verdünntem Humanserum ohne Analyt (Blanc Wert). Die roten Linien sind mit Probe in 50 % verdünntem Humanserum.

Bei der labelfreien, optischen Detektion in hochkonzentrierten Humanserum ist zu Beginn der Messung ein relativ starker Brechungsindexsprung zu sehen. Dies stört die Messung jedoch nicht, da der Bereich im Zeitraum 200 – 350 sec für die Auswertung relevant ist. Es kann also gemessen werden, da bei derselben Anti- β_2 GP-I Antikörper Konzentration dieselbe Steigung der Messkurve, im Humanserum wie im Puffer, zu sehen ist. Bei der gezeigten Messung ist dies in etwa der Fall. Dies zeigt, dass der Assay trotz der problematischen Matrix Humanserum mit guten Signalintensitäten und Reproduzierbarkeiten in die andere Matrix portiert werden kann.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Für Anti- β_2 GP-I Antikörper konnte eine Kalibrierfunktion in PBS bestimmt werden. Es konnte mit derselben Membran 24h lang reproduzierbar gemessen werden. Die gezeigte Kalibrierfunktion der Anti-Cardiolipin Antikörper in PBS besitzt noch Optimierungspotential. Die ersten Messungen der Anti- β_2 GP-I Antikörper in Humanserum sind vielversprechend, da Sie reproduzierbar sind und in etwa ein ähnliches Signal wie im reinen PBS Puffer zeigen. Das Ziel die entwickelten Immunoassays in Humanserum durchzuführen ist nach weiteren Optimierungen und Anpassungen in greifbare Nähe gerückt.

5 Danksagung

DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft

Die Arbeit wurde teilweise im Rahmen des Projektes PR1192/2-1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Wir danken Prof. Dr. med. Peter B. Lippa und seiner Arbeitsgruppe vom Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland) für Ihre Expertise und Unterstützung.

6 Literatur

- [1] S. Miyakis, M. D. Lockshin, T. Atsumi et al, *J. Thromb. Haemostasis* 4, 295-306 (2006)
- [2] G. Reber, F. Boehlen, *Semin. Thromb. Hemostasis* 34, 340-346 (2008)
- [3] B. De Laat, P. De Groot, *Current Rheumatology Reports* 13, 70-76 (2011)
- [4] G. Proll, G. Markovic, L. Steinle, G. Gauglitz, *Methods Mol. Biol.* 503, 167-178 (2009)
- [5] A. Brecht, G. Gauglitz, W. Nahm, *Analysis* 20(3), 135-140 (1992)
- [6] H.-M. Schmitt, A. Brecht, J. Piehler, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* 12(8), 809-816 (1997)
- [7] G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 398(6), 2363-2372 (2010)
- [8] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, M. Zerlin, C. Maul, R. Thiericke, S. Grabley, *Anal. Biochem.*, 249(1), 94-102 (1997)
- [9] P. Penttinen, J. Jaehrling, A.E. Damdopoulos, J. Inzunza, J. G. Lemmen, P. van der Saag, K. Petterson, G. Gauglitz, S. Maekelae, I. Pongratz, *Endocrinology*, 148(10) 4875-4886 (2007)
- [10] S. Rau, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402(1), 529-536 (2012)
- [11] U. Hilbig, O. Bleher, A. Le Blanc, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 713-717 (2012)