

# **Entwicklung mikropartikelbasierter Nachweisverfahren für hydrophile und amphiphile Biomarker**

Von der Fakultät Umwelt und Naturwissenschaften  
der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.)

Franziska Dinter

aus Lauchhammer

Gutachter: Prof. Dr. Peter Schierack

Gutachter: Prof. Dr. Katja Hanack

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2023



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> -----	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> -----	<b>III</b>
<b>Abstract</b> -----	<b>IV</b>
<b>Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis</b> -----	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> -----	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> -----	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1 Zielstellung</b> -----	<b>1</b>
<b>1.2 Biomarker und ihre Bedeutung für die Diagnostik</b> -----	<b>3</b>
<b>1.3 Point-of-Care-Diagnostik</b> -----	<b>5</b>
<b>1.4 Mikrofluidik in der Diagnostik</b> -----	<b>7</b>
<b>1.5 Kardiovaskuläre Erkrankungen</b> -----	<b>8</b>
<b>1.6 Lipide in der Diagnostik</b> -----	<b>10</b>
1.6.1 Cardiolipin als Model-----	11
1.6.2 Weitere wichtige Biomarker in der Lipiddiagnostik-----	12
<b>1.7 Anwendung hydrophober Mikropartikel</b> -----	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden</b> -----	<b>16</b>
<b>2.1 Mikropartikel, Sonden, Antikörper, Biomarker</b> -----	<b>16</b>
<b>2.2 Chemikalien und Puffer</b> -----	<b>22</b>
<b>2.3 Geräte</b> -----	<b>26</b>
<b>2.4 Verwendete Software für die Bildgebung und Analyse</b> -----	<b>27</b>
<b>2.5 Bildgebende Systeme zur Visualisierung von Fluoreszenzsignalen</b> -----	<b>28</b>
<b>2.6 Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein - und DNA - basierten kardiovaskulären Biomarkern</b> -----	<b>29</b>
2.6.1 Mikrofluidikchip-----	29
2.6.2 Kopplung der Biomarker an carboxylierte Mikropartikel-----	30
2.6.3 Kopplung der Fängersonden an carboxylierte Mikropartikel-----	31
2.6.4 Immobilisierung von Mikropartikeln im Mikrofluidikchip-----	32
2.6.5 Durchführung des Proteinassays – Imitierung von Autoantikörpern-----	33
2.6.6 Durchführung des DNA-Assays für cfDNA-----	33
2.6.7 Datenanalyse des Mikrofluidikchips-----	34
<b>2.7 Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays</b> -----	<b>35</b>
2.7.1 Charakterisierung der Mikropartikel-----	35
2.7.2 Kopplung relevanter Biomoleküle an die Mikropartikeloberfläche-----	38
2.7.3 Überprüfung der gerichteten Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide-----	39
2.7.4 Stabilität der Biomarker an der Mikropartikeloberfläche-----	40
2.7.5 Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays für Anti-Phospholipid-Antikörper-----	40
2.7.6 Optimierungen zur Signalverstärkung-----	44

<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein - und DNA - basierten kardiovaskulären Biomarkern</b>	<b>45</b>
3.1.1 Optimierung der Mikropartikelimmobilisierung und der Testumgebung	46
3.1.2 Nachweis von Biomarkern in einem mikropartikelbasierten Mikrofluidikchipsystem	48
3.1.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit	54
3.1.4 Simultaner Nachweis von Protein- und DNA-basierten Biomarkern in einem Mikrofluidikchip	56
3.1.5 Vergleich des Mikrofluidikchips und einer Multiwellplatte	57
3.1.6 Schlussfolgerungen	59
<b>3.2 Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays</b>	<b>60</b>
3.2.1 Charakterisierung der hydrophoben Mikropartikel	61
3.2.2 Immobilisierung der hydrophoben Mikropartikel auf verschiedenen Oberflächen	74
3.2.3 Kopplung Biomarker an die Mikropartikeloberfläche	75
3.2.4 Die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche	89
3.2.5 Assayentwicklung zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern	94
3.2.6 Optimierung zur Signalverstärkung an der Mikropartikeloberfläche	107
3.2.7 Schlussfolgerungen	116
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>5. Anhang</b>	<b>X</b>
<b>5.1 Danksagung</b>	<b>XXIX</b>
<b>5.2 Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>XXX</b>
<b>5.3 Publikationen</b>	<b>XXXI</b>
5.3.1 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation und eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen	XXXI
5.3.2 Gesamte Veröffentlichungsliste und sonstige Beiträge	XXXII



## Zusammenfassung

Für die Personalisierte Medizin wird eine präzise und schnelle Analyse relevanter kardiovaskulärer, Tumor- oder Autoimmunbiomarker in der heutigen Labordiagnostik immer wichtiger. Patienten sollen möglichst individuell und auf ihre Bedürfnisse abgestimmt behandelt werden. Mithilfe einfacher, tragbarer, zeit- und materialsparender Analysemethoden sollen in Zukunft die Ärzte durch automatisierte, multiparametrische Testsysteme unterstützt werden. Um diese Probleme adressieren zu können, ist es notwendig, Systeme zu entwickeln, die einen simultanen Nachweis von Protein-, Nukleinsäure-, und Lipidbiomarkern ermöglichen. Die vorliegende Dissertation setzt sich mit der Entwicklung mikropartikelbasierter Nachweissysteme für hydrophile und amphiphile Biomarker auseinander. Hierbei wurde ein mikropartikelbasierter Mikrofluidikchip zur Analyse von vier Protein- und DNA-basierten kardiovaskulären Biomarkern entwickelt. Dieser zeigt gegenüber der Verwendung einer Multiwellplatte eine Reduzierung der Zeit von 1 h auf 7 min, die Reduzierung von Patientenmaterial, aufgrund des Einsatzes geringer Volumina und eine erhöhte Sensitivität um einen Faktor von fünf gegenüber den Herstellerangaben der Biomarker. Die Analyse amphiphiler Biomarker wie Phospholipide oder Lipoproteine setzte die Verwendung hydrophober Mikropartikel voraus. Neuartige, fluoreszenzkodierte, hydrophobe Mikropartikel wurden hergestellt und anhand verschiedener Kriterien wie Verhalten in Puffersystemen, Hydrophobizität, Lösungsmittelstabilität und Fluoreszenz- und Größenverteilung charakterisiert. Mithilfe der typisierten hydrophoben Mikropartikel wurden amphiphile Biomarker, wie z. B. Anti-Phospholipid-Antikörper gegen Cardiolipin, welche bei Autoimmunerkrankungen, Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen, an die Mikropartikeloberfläche gekoppelt. Ein aussagekräftiger Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper konnte sowohl auf Membran- als auch Mikropartikelbasis entwickelt werden. Mit dem entwickelten Proof-of-Principle konnten erste Patientenserum analysiert und eine eindeutige Zuordnung der positiven und negativen Seren vorgenommen werden.

## Abstract

For Personalised Medicine, precise and rapid analysis of relevant cardiovascular, tumour or autoimmune biomarkers is becoming increasingly important in today's laboratory diagnostics. Patients should be treated as individually as possible and tailored to their needs. With the help of simple, portable, time- and material-saving analytical methods, doctors should be supported in future by automated, multiparametric test systems. To address these problems, it is necessary to develop systems that allow simultaneous detection of protein, nucleic acid and lipid biomarkers. This dissertation deals with the development of microbead-based detection systems for hydrophilic and amphiphilic biomarkers. A microbead-based microfluidic chip was developed for the analysis of four protein- and DNA-based cardiovascular biomarkers. Compared to the use of a multiwell plate, this shows a reduction in time from 1 h to 7 min, the reduction of patient material due to the use of low volumes and an increased sensitivity by a factor of five compared to the biomarker manufacturer's specifications. The analysis of amphiphilic biomarkers such as phospholipids or lipoproteins required the use of hydrophobic microbeads. Novel, fluorescence-encoded, hydrophobic microbeads were prepared and characterised using various criteria such as behaviour in buffer systems, hydrophobicity, solvent stability and fluorescence and size distribution. Using the typed hydrophobic microbeads, amphiphilic biomarkers, such as anti-phospholipid antibodies against cardiolipin, which play a role in autoimmune diseases, cancer and cardiovascular diseases, were coupled to the microbead surface. A meaningful detection of the anti-phospholipid antibodies could be developed on both membrane and microbead basis. With the developed proof-of-principle, first patient sera could be analysed and a clear assignment of positive and negative sera could be made.

## Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/Formelzeichen	Bedeutung
$\lambda$ ( $\lambda_{\text{Ex}}$ ; $\lambda_{\text{Em}}$ )	Wellenlänge (Anregung; Emission)
$\beta$ 2-GP1	Apolipoprotein H (Beta-2-Glykoprotein 1)
AK	Antikörper
APOH	Apolipoprotein H (Beta-2-Glykoprotein 1)
Apo-A1	Apolipoprotein-A1
APS	Anti-Phospholipid-Syndrom
BHQ2	Black Hole Quencher 2
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C10	Alkylkette mit 10 Kohlenstoffatomen
C18	Alkylkette mit 18 Kohlenstoffatomen
C3	Alkylkette mit 3 Kohlenstoffatomen
C6	Coumarin 6
C8	Alkylkette mit 8 Kohlenstoffatomen
cfmDNA	cell free mitochondrial DNA
CL	Cardiolipin
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
Cy5	Cyanine 5
dB	Dezibel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FS	Fängersonde
HDL	High-Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPV72	Humanes Papillomvirus 72
HSA	Humanes Serumalbumin
HVMP	Hydrophobe Verwendungsstufe der Mikropartikel
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDA	Kilo Dalton
LDL	Low-Density Lipoprotein
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NS	Nachweissonde
oxLDL	Oxidiertes LDL
PBS (T)	Phosphate buffered saline +/- Tween® 20
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PosC	Positivkontrolle
PS	Phosphatidylserin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
refMFI	referenzierte Mittlere Fluoreszenzintensität

RhdG6	Rhodamin 6G
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time Polymerasekettenreaktion
S1-S8	Serum 1-8
SAv	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	systemischem Lupus Erythematodes
SNR	Signal-to-Noise Ratio/Signal-Rausch-Verhältnis
SPR	Surface plasmon resonance/Oberflächenplasmonenresonanz
STED	Stimulated Emission Depletion
TBS (T)	Tris buffered saline +/- Tween® 20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VMP69	Vorstufe der Mikropartikel 69

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Interessenentwicklung multiplexer Diagnostik von 1951 bis 2021	4
Abb. 2: Point-of-Care-Testsysteme	6
Abb. 3: 3D-Modell eines Mesofluidikchips	8
Abb. 4: Struktur von Cardiolipin	12
Abb. 5: Zusammensetzung eines Lipoproteins	14
Abb. 6: Mikrofluidikchip und seine Funktion	30
Abb. 7: Beladung carboxylierter Mikropartikel	31
Abb. 8: Kontaktwinkelbestimmung der Mikropartikeloberfläche	36
Abb. 9: Schnittstellen der Phospholipasen am Beispiel von Phosphatidylethanolamin - (PE-Cy5)	39
Abb. 10: Modell des Nachweises der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper am Mikropartikel	42
Abb. 11: Modell des Nachweises der Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper am Mikropartikel	43
Abb. 12: Pufferoptimierung für die Durchführung des simultanen Nachweises der Biomarker	47
Abb. 13: Einzelmessungen zum Nachweis von CRP, LDL, BNP und cfmdNA	51
Abb. 14: Verdünnungsreihen der Biomarker CRP, BNP und LDL	53
Abb. 15: Vergleich Multiwellplatte und Mikrofluidikchip	55
Abb. 16: Simultaner Nachweis der Biomarker im Mikrofluidikchip	57
Abb. 17: Lösungsmittelstabilität der carboxylierten und hydrophoben Mikropartikel	63
Abb. 18: Vergleich unbeladener und gekoppelter Mikropartikel in TBS-T	65
Abb. 19: Größenverteilung der Mikropartikelpopulation CO498	67
Abb. 20: Konfokale Aufnahme unbeladener hydrophober Mikropartikel	68
Abb. 21: Vergleich des Kontaktwinkels hydrophober und hydrophiler Oberflächen	70
Abb. 22: Färbung der Mikropartikeloberfläche mit dem Farbstoff CellBrite® Red	72
Abb. 23: Verdünnungsreihe des Farbstoffes CellBrite® Red	73
Abb. 24: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide – VideoScan-Technologie	77
Abb. 25: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide - Durchflusszytometrie	78
Abb. 26: Strukturen der fluoreszenzmarkierten Phospholipide	80
Abb. 27: Oberflächenbeladung der Mikropartikel mit dem Phospholipid CL-Cy5	82
Abb. 28: Gerichtete Bindung des Phospholipids PC-Cy5 an der Mikropartikeloberfläche	84
Abb. 29: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide an VMP69	86
Abb. 30: Verdau der Phospholipide mittels Phospholipasen – VMP69	88
Abb. 31: Stabilität des Phospholipids CL-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen	90
Abb. 32: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche in Alkoholen	93
Abb. 33: Abschmelzen des Phospholipids CL-Cy5	94
Abb. 34: DotBlot zum Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern	96
Abb. 35: DotBlot zum Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern	97
Abb. 36: DotBlot zum Nachweis von $\beta$ 2-GP1	99
Abb. 37: Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern mittels VideoScan-Technologie	101
Abb. 38: Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern mittels VideoScan-Technologie	104
Abb. 39: Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie	106

---

Abb. 40: Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie	107
Abb. 41: Kopplung des Phospholipids CL-Cy5 im Vergleich mit Methanol und Ethanol	110
Abb. 42: Nachweis der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper mit einem Blockierungsschritt	112
Abb. 43: Simultaner Nachweis von $\beta$ 2-GP1, LDL und Phospholipiden	115
Abb. 44: Nachweis kardiovaskulärer Biomarker	X
Abb. 45: Verdünnungsreihe cfmDNA	XI
Abb. 46: Simultane Verdünnungsreihen CRP, BNP, LDL	XII
Abb. 47: pH und Puffer abhängige Aggregationsneigung I	XIV
Abb. 48: pH und Puffer abhängige Aggregationsneigung II	XV
Abb. 49: pH und Pufferabhängige Aggregationsneigung III	XVI
Abb. 50: pH und Pufferabhängige Aggregationsneigung IV	XVII
Abb. 51: Größenverteilung der Mikropartikel CO499	XVIII
Abb. 52: Größenverteilung der Mikropartikel CO500	XIX
Abb. 53: Größenverteilung der Mikropartikel CO501	XX
Abb. 54: Oberflächenbeladung der Mikropartikel mit PE-Cy5	XXI
Abb. 55: Gerichtete Bindung des Phospholipid CL-Cy5	XXII
Abb. 56: Gerichtete Bindung des Phospholipid PE-Cy5	XXIII
Abb. 57: Stabilität des Phospholipids PE-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen	XXIV
Abb. 58: Stabilität des Phospholipids PC-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen	XXIV
Abb. 59: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche CL-Cy5	XXV
Abb. 60: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche PE-Cy5	XXV
Abb. 61: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche PC-Cy5	XXVI
Abb. 62: Abschmelzen des Phospholipids PE-Cy5	XXVI
Abb. 63: Abschmelzen des Phospholipids PC-Cy5	XXVII
Abb. 64: Alkoholreihe Methanol und Ethanol im Vergleich PE-Cy5	XXVIII

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mikropartikelpopulationen -----	16
Tab. 2: Fluoreszenzfarbstoffe-----	18
Tab. 3: Sonden- und DNA-basierte Biomarker-----	19
Tab. 4: Antikörper -----	20
Tab. 5: Enzyme -----	21
Tab. 6: Biomarker -----	21
Tab. 7: Chemikalien -----	22
Tab. 8: Puffer und Lösungen - Zusammensetzung-----	24
Tab. 9: Verbrauchsmaterialien-----	25
Tab. 10: Laborgeräte -----	26
Tab. 11: Beladung der carboxylierten Mikropartikel -----	31
Tab. 12: humane Seren -----	41
Tab. 13: Vergleich Mikrofluidikchip und Multiwellplatte-----	59
Tab. 14: Kontaktwinkelmessungen-----	71
Tab. 15: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide [in refMFI] -----	76
Tab. 16: Kopplungswerte der Phospholipide [in mittlerer Fluoreszenzintensität] -----	79
Tab. 17: Messdaten der enzymatischen Reaktion der Phospholipase C -----	85
Tab. 18: Grauwerte des DotBlots zum Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern-----	97
Tab. 19: Grauwerte des DotBlots zum Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern-----	98
Tab. 20: Fluoreszenzwerte des Nachweises der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper [in refMFI] -----	102
Tab. 21: Fluoreszenzwerte des Nachweises der Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper [in refMFI] -----	104
Tab. 22: verwendete Puffer für Puffer- und pH abhängige Aggregationsneigung -----	XIII
Tab. 23: Multiwellplatten für die Immobilisierung von hydrophoben Mikropartikeln -----	XXI





# 1. Einleitung

Eine schnelle und präzise Diagnostik wird in der heutigen Zeit immer wichtiger. Um den Anforderungen der Personalisierten Medizin und der damit verbundenen Individualität der Patienten gerecht zu werden, bedarf es Methoden zum simultanen Nachweis verschiedener Biomarkerspezies, wie zum Beispiel Proteine, DNA oder amphiphile Biomarker. Der gleichzeitige Nachweis verschiedener Biomarker stellt eine neue Herangehensweise dar. Naturgemäß ist die simultane Messung der Biomarker herausfordernd, da diese teils gegenläufige biophysikalische und biochemische Eigenschaften aufweisen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Ziele zur Entwicklung anpassbarer und tragbarer mikropartikelbasierter Nachweisverfahren adressiert.

## 1.1 Zielstellung

Zum einen sollte ein Nachweisverfahren zur simultanen Analyse verschiedener Biomarkerspezies auf der Basis eines Mikropartikel Mikrofluidikchips entwickelt werden. Der Nachweis kardiovaskulärer Biomarker auf Protein- und DNA-Basis sowie die Optimierung der Puffer- und Assaybedingungen standen dabei im Vordergrund. Gleichzeitig stellte sich die Frage, welche Vorteile ein teurer und zur einmaligen Nutzung bestimmter Mikrofluidikchip gegenüber einer herkömmlichen und billigen Multiwellplatte zeigt.

Die im Zusammenhang mit dieser Dissertation erstellte Veröffentlichung zur Entwicklung eines mikropartikelbasierten Mikrofluidikchips fließt zum Großteil in die Darstellung der Ergebnisse zum ersten Themenbereich *Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein – und DNA- basierten kardiovaskulären Biomarkern* ein.

- **Dinter F**, Burdukiewicz M, Schierack P, Lehmann W, Nestler J, Dame G, Rödiger S. (2019). Simultaneous detection and quantification of DNA and protein biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. *Anal.Bioanal.Chem.* 411:7725-7735 (1)

Zum anderen galt es, neuartig hergestellte fluoreszenzkodierte hydrophobe Mikropartikel zu charakterisieren, amphiphile und lipophile Biomarker auf die hydrophobe Mikropartikeloberfläche zu koppeln und eine Methode zu entwickeln, diese Biomarker über Antigen-Antikörper-Bindung nachzuweisen.

Neben unveröffentlichten Ergebnissen fließt die im Zusammenhang mit dieser Dissertation erstellte Veröffentlichung in die Darstellung der Ergebnisse des zweiten Themenbereichs *Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweis-Assays* ein.

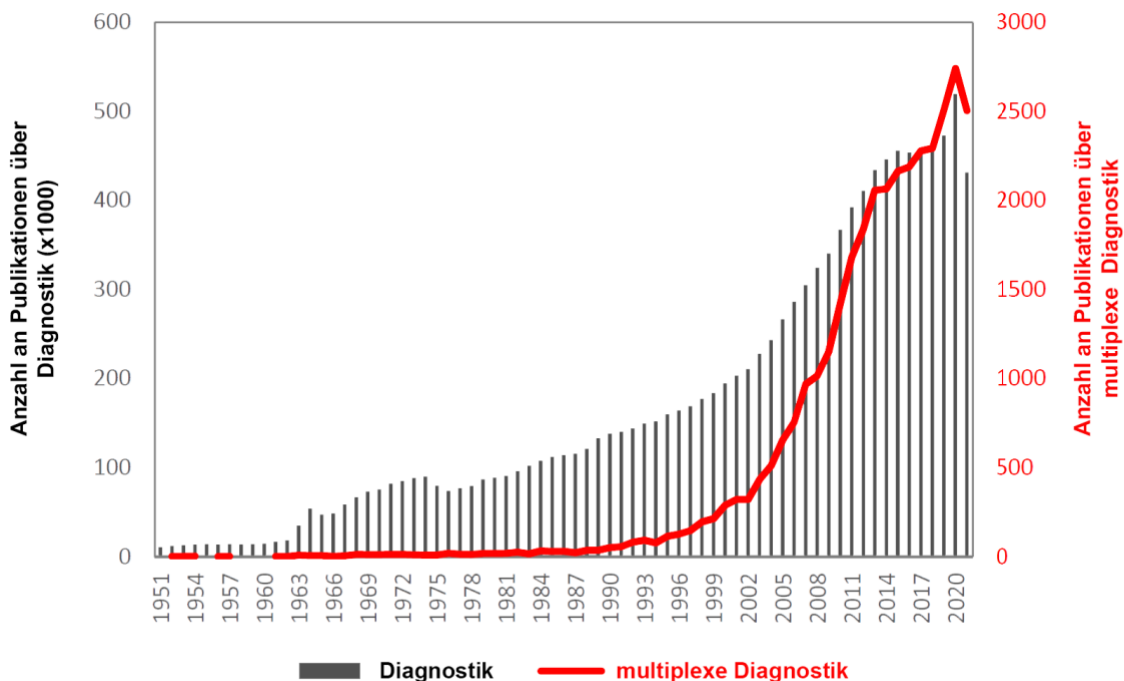
- **Dinter** F, Thiele T, Schedler U, Lehmann W, Schierack P, Rödiger S (Preprint) Immobilisation of Lipophilic and Amphiphilic Biomarker on Hydrophobic Microbeads. bioRxiv; doi:<https://doi.org/10.1101/2023.01.10.523433> (2)
- **Dinter** F, Jurischka C, Brose E., Schedler U., Schierack P, Rödiger S (in Bearbeitung) Hydrophobic microbeads, their application in diagnostics and future perspectives.

## 1.2 Biomarker und ihre Bedeutung für die Diagnostik

Herkömmliche Medizin, auch als Durchschnittsmedizin bekannt, behandelt traditionell nach einem allgemeinen Ansatz auf der Basis klinischer Studien, der für jeden Patienten gilt. Dies führt dazu, dass einige Patienten nicht oder nur schlecht auf die Versorgung ansprechen, und somit eine Durchschnittsmedizin nicht für alle Patienten in Frage kommt (3). Die Personalisierte Medizin betrachtet dagegen mehrere Faktoren wie Krankheitsgeschichte, Lebensstil, genetische und umweltbedingte Merkmale des Einzelnen (3,4). Der Patient kann individuell und auf ihn zugeschnitten in Diagnose, Behandlung und Vorbeugung betreut werden (3). Krankheiten können so anhand von Genomik, Proteomik, Metabolomik, Sensordaten, Bildgebung, Krankheitsgeschichte, Anamnese, Lebensstil und vielem mehr neu definiert werden (4). Durch maßgeschneiderte Therapie können unnötige Behandlungen und diagnostische Eingriffe vermieden und Risiken reduziert werden (5,6). Dies führt zur Verminderung der Gesundheitskosten und zu einer effizienteren und wirksameren Versorgung der Patienten (4,7,8).

Die Medizin entwickelt sich von Jahr zu Jahr weiter, jedoch werden Biomarker immer eine Rolle spielen. Biomarker sind laut Definition der Biomarker Definition Working Group aus dem Jahre 2001 „ein Merkmal, das objektiv gemessen und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf einen therapeutischen Eingriff bewertet wird.“ (9). Ein Biomarker kann auf der Genexpression, einzelnen Proteinen, Proteomik, Metabolomik, Histologie, Bildgebung und sogar klinischen Beobachtungen beruhen (10). Biomarker können prädiktiv, prognostisch, pharmakodynamisch oder diagnostisch sein, dies ist abhängig von ihrer Biologie, ihrer Messmethode und ihrem Ergebnis oder ihrem Zweck (11,12). Biologische Anwendungen beziehen sich auf die morphologischen, physiologischen oder molekularen Charakteristika. In Bezug auf die Messung und das damit verbundene Ergebnis kann ein Biomarker qualitativ, semiquantitativ oder quantitativ sein. Der Zweck eines Biomarkers wird anhand der Information des jeweiligen Biomarkers bestimmt. Prognostische Biomarker zeigen den Zusammenhang mit klinischen Ergebnissen, unabhängig der Behandlung. Prädiktive Biomarker zeigen den Nutzen einer bestimmten Behandlung (erwünscht/unerwünscht) und helfen somit, klinische Entscheidungen zu treffen. Pharmakodynamische Biomarker zeigen die Wirkung eines Arzneimittels auf die Krankheit an. Diagnostische Biomarker helfen bei der Feststellung von Krankheiten in Patientenproben (11–13).

Um eine schnelle und effiziente Diagnose stellen zu können, wird es immer wichtiger Biomarker zu kombinieren und simultan in einer Reaktion und Patientenprobe nachzuweisen (Abb. 1) (14).



**Abb. 1: Interessenentwicklung multiplexer Diagnostik von 1951 bis 2021**

Dargestellt ist ein Vergleich zu den jährlichen Veröffentlichungen zum Thema Diagnostik und zum Thema multiplexe Diagnostik in den Jahren 1951 bis 2021, basierend auf den Daten der PubMed Datenbank. Die Abbildung wurde nach Otoo 2022 modifiziert (15).

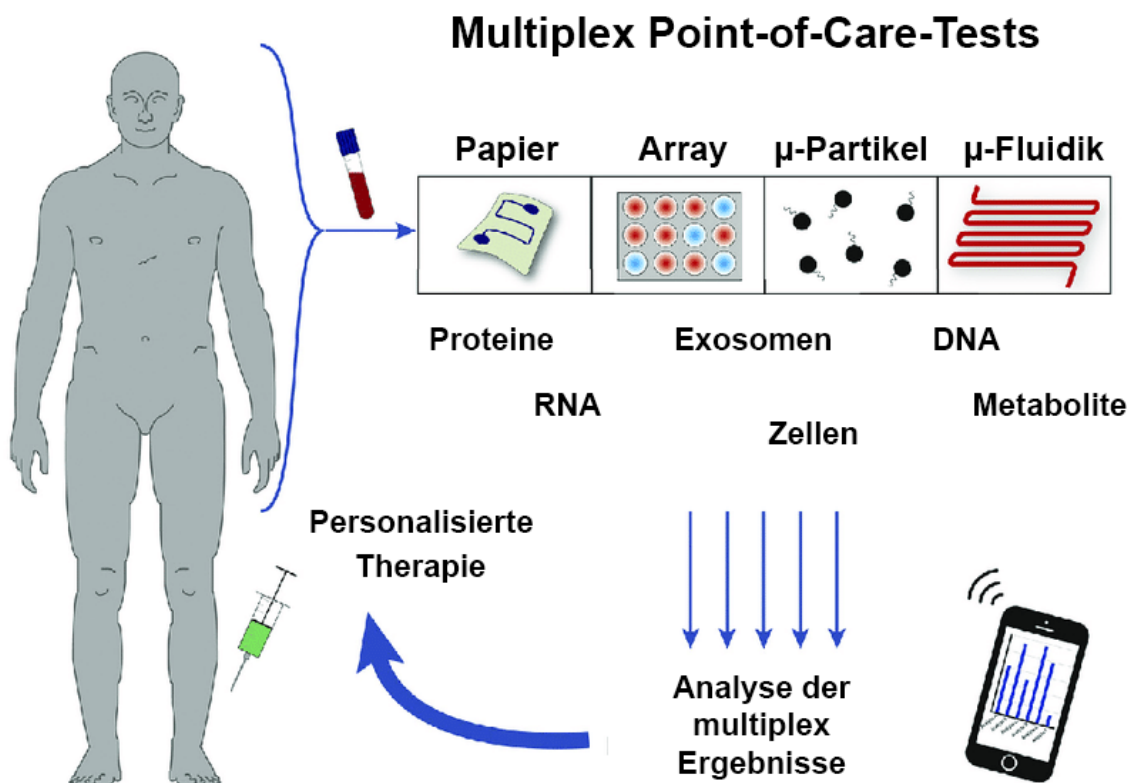
Ein multiplexer Nachweis führt zu einer Ersparnis der Zeit, des Patientenmaterials und einem schnelleren Durchsatz im Vergleich zu Einzelanalysen (15–17). Aufgrund multiplexer Biomarkeranalysen können unter anderem Aussagen über den optimalen Wirkungsgrad verschiedener Medikamente in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen oder zur Unterscheidung verschiedener Krebsarten und ihrer Lokalisation getroffen werden (15). Wichtige Analyten sind Proteine, Nukleinsäuren, Peptide, Metabolite, Lipide und andere Moleküle (15). Aufgrund ihrer individuellen biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften stellt ein simultaner Nachweis verschiedener Analyten eine Herausforderung dar. Bei Proteinen kann es zu Kreuzreaktivitäten untereinander kommen. Pufferkonditionen müssen aufgrund verschiedener Ladungen der Proteine angepasst werden (15,18). Nukleinsäuren benötigen zur Amplifikation verschiedene Temperaturen. Die Verwendung

unterschiedlicher Primerpaare kann zur Bildung von Primerdimeren und somit zu einer unspezifischen Amplifikation führen. Um Multiplexpolymerasekettenreaktionen (PCR) erfolgreich zu generieren, werden optimierte Reaktionsparameter und -konditionen benötigt (15,19). Die Entwicklung multiplexer Nachweise erfordert optimierte Assaybedingungen für alle nachweisbaren Analyten, wie optimale Probenverdünnungen, abgestimmte Probeninkubationszeiten, Reduktion der Kreuzreaktivität zwischen Assays, sowie die Reduktion unspezifischer Bindungen (15,17,19). Neben den zuvor genannten Herausforderungen sollte bei der Entwicklung von Multiplexverfahren auch die Sensitivität und Spezifität der einzelnen diagnostischen Biomarker beachtet werden, um präzise Aussagen über eventuelle Krankheiten treffen zu können.

### 1.3 Point-of-Care-Diagnostik

Häufig verwendete Nachweismethoden für diagnostische Biomarker sind Einzelnachweise unter anderem mittels Immunoassay (membran- oder chipbasiert), qPCR, Durchflusszytometrie oder Massenspektrometrie (20,21). Die fortschrittlichen Methoden sind in den Laboren weit verbreitet, jedoch gibt es in strukturschwachen Regionen oder Entwicklungsländern kaum die Möglichkeit, solche Tests schnell und präzise durch geschultes Personal durchzuführen (22,23). Dahingegen ist Point-of-Care-Diagnostik schnell, einfach, präzise, kostengünstig und es bedarf keines geschulten Laborpersonals (22,24). Aufgrund dieser Eigenschaften bietet Point-of-Care-Diagnostik eine gute Alternative in strukturschwachen Gegenden. Die medizinische Versorgung vor Ort zur Kontrolle und Prävention von Infektionskrankheiten oder kardiovaskulären Erkrankungen kann somit ausgeweitet und vorangetrieben werden (25). Point-of-Care kann als klinischer Test außerhalb des Labors, aber nah am Patienten definiert werden. Bekannte Point-of-Care-Tests sind z. B. Blutzuckermessung und Schwangerschaftstests (26). Die WHO hat hinsichtlich der Eigenschaften, die ein entwickelter Point-of-Care-Test haben muss, einige Richtlinien entwickelt und diese **ASSURED** genannt. **Affordable** (erschwinglich für infektionsgefährdete Personen), **Sensitive** (empfindlich, minimal falsch-negative Ergebnisse), **Specific** (spezifisch, minimale falsch-positive Ergebnisse), **User-friendly** (benutzerfreundlich, minimale Schritte zur Durchführung des Tests), **Rapid & Robust** (schnell und robust, kurze Durchlaufzeit und keine Notwendigkeit für gekühlte

Lagerung), *Equipment-free* (gerätefrei, keine komplexe Ausrüstung) und *Delivered* (ausgeliefert, an den Endverbraucher) (27). Neben den Kriterien, die entwickelte Point-of-Care-Tests erfüllen müssen, können diese in der Hand gehalten oder auf einem Wagen transportiert werden (28). Zur Anwendung kommen verschiedene Systeme wie RT-PCR, sondenbasierte Technologien, Microarraytechnologien oder Mikrofluidiktechnologien (29) (Abb. 2).

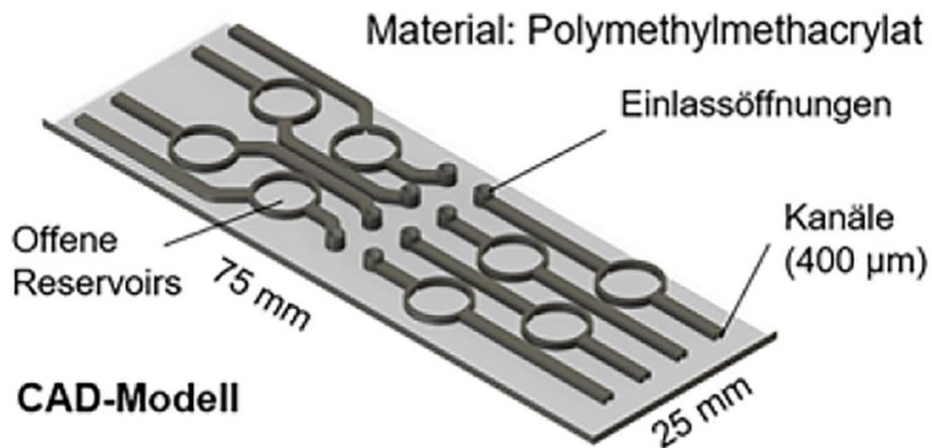


**Abb. 2: Point-of-Care-Testsysteme**

Die Anwendung von Point-of-Care-Testsystemen basierend auf Papier, Arrays, Mikropartikeln oder Mikrofluidik kann zu einer schnellen, einfachen und kostengünstigen Analyse von Proteinen, Exosomen, DNA, RNA, Zellen oder Metaboliten genutzt werden. Die analysierten Testergebnisse können dann wiederum in der Personalisierten Medizin zur Therapie eingesetzt werden. Abbildung modifiziert nach Dincer et al 2017 (30).

## 1.4 Mikrofluidik in der Diagnostik

Die Forschung auf dem Gebiet der Mikrofluidik hat in den letzten Jahrzehnten an Interesse gewonnen (31). Mikrofluidische Plattformen basieren auf kleinen Kammern und Kanälen im Bereich weniger Mikrometer (10-100  $\mu\text{m}$ ) (8). Sie können mischen, pumpen, Zellen kultivieren und Biomarkernachweise durchführen (32). Durch zusätzliche Mikropumpen, mikroskalige Einlassventile oder miniaturisierte Auslassabflüsse kann die Analyse und Durchführung komplexer Versuche umgesetzt werden (33,34). Die Entwicklung mikrofluidischer Systeme vereint mehrere Disziplinen wie Biotechnologie, Biophysik, Nanobiotechnologie, Mikrotechnik, analytische Chemie und weitere Bereiche miteinander (35,36). Vorteile bei der Verwendung mikrofluidischer Systeme sind ein hohes Verhältnis zwischen der Oberfläche zum Volumen, der Einsatz geringer Reagenzienmengen, schnelle Diffusionszeiten, hohe Genauigkeit und Kosteneffizienz sowie die Modellierbarkeit durch 3D-Drucke (Abb. 3) (8,35,37,38). Ein weiterer Vorteil ist die geringe Größe und somit die Miniaturisierung und Parallelisierung verschiedener Geräte (32). Diese Vorteile führen zum Einsatz der Mikrofluidik in Gebieten der Zellseparation, analytischen Chemie, der Molekularbiologie oder der Diagnostik als Point-of-Care-Verfahren (31,35,39). Hier kommt es zur gleichzeitigen Durchführung von Probenvorbehandlung, Markierungsreaktionen, Trennung, nachgeschalteter Reaktion und der Nachweis von Analyten (31,40). Unterschieden werden können statische und dynamische Arrays, bei denen Mikropartikel zum Einsatz kommen. Statische Arrays bestehen aus immobilisierten Biomolekülen auf statischen Substraten, wohingegen dynamische Arrays aus Biomolekülen immobilisiert auf mobilen Substraten wie Mikropartikeln bestehen (37). Mikropartikelbasierte Mikrofluidik zeigt Vorteile gegenüber anderen Anwendungen durch ein geringes Hintergrundrauschen, verbesserter Reaktionskinetik und niedriger Systemkosten (41,42). Der Einsatz mikrofluidischer Point-of-Care-Systeme führt in der Medizin durch den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Biomarker zu einer schnelleren Erkennung von Krankheiten und Behandlung von Patienten (43). Der schnelle, einfache und kostengünstige Nachweis bei der Verwendung von mikrofluidischen Point-of-Care-Systemen ist ebenfalls ein Vorteil bei der Unterstützung der Ärzte (32,44).



**Abb. 3: 3D-Modell eines Mesofluidikchips**

Das 3D-Modell modifiziert aus Dinter et al 2020 (45) zeigt die Möglichkeit Meso- oder Mikrofluidikchips im 3D-Drucker so in den Maßen zu generieren, wie sie für die jeweilige Anwendung benötigt werden.

## 1.5 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauferkrankungen (CVD) sind weltweit eine der nicht übertragbaren Hauptursachen für Mortalität und Morbidität, die durch genetische Veranlagung, Lebensstil, Umwelteinflüsse, hohe Fehldiagnosen und das Fehlen klar definierter Kriterien zur Risikobewertung verursacht werden (46–49). Von traditionellen Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes, Bluthochdruck oder Hyperlipädemie ist nur ein Teil der Bevölkerung betroffen (50–53). Umwelteinflüsse und genetische Veranlagungen spielen auch eine Rolle bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (52,54,55). Kardiovaskuläre Erkrankungen können je nach betroffenem Organ in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Betroffen sein können: 1) das Herz mit koronaren Syndromen, Angina pectoris, Arrhythmie, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, entzündlichen Herzerkrankungen, koronarer oder ischämischen Herzerkrankungen; 2) das Gehirn mit zerebralvaskulären Erkrankungen, hämorrhagischen oder ischämischen Schlaganfall; 3) das Herz-Kreislaufsystem mit hypertensiven Herzerkrankungen, peripheren Arterienerkrankungen, Venenthrombosen oder Lungenembolien (56).

Eine frühzeitige Identifizierung und Behandlung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ist dringend erforderlich, um das Risiko von Fehldiagnosen oder Unfalltoden zu minimieren (57). Um eine frühzeitige Identifizierung sicherzustellen, ist es notwendig, neue und aussagekräftige kardiovaskuläre Biomarker zu identifizieren (57). In den letzten 10 Jahren wurde eine große Anzahl von Biomarkern für CVD



untersucht und für schnellere Diagnosen und spezifische Behandlungen genutzt (46,58,59). Dazu gehören C-reaktives Protein (CRP), Brain natriuretisches Peptid (BNP) und low density Lipoprotein (LDL). Es gibt jedoch auch neue DNA-basierte Biomarker wie die zellfreie mitochondriale DNA (cfmDNA), die auf systemische Entzündungen hinweisen (49,60,61). Hohe Konzentrationen von cfmDNA führen zu einer Zytokinproduktion in Monozyten und damit zu einer induzierten Entzündungsreaktion. Diese Reaktion kann an altersbedingten CVD-Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Atherosklerose und ischämischer Herzkrankheit beteiligt sein (60,61). In den letzten Jahren wurde eine anhaltende Diskussion über den Einfluss von Autoantikörpern auf die Pathologie entzündlicher Herz-Kreislaferkrankungen geführt (62,63). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Autoantikörper bei der Entstehung von Herz-Kreislaferkrankungen eine Rolle spielen, und zwar unabhängig davon, ob die Person von einer Autoimmunerkrankung betroffen ist oder nicht (64–66). Bei systemischem Lupus Erythematoses (SLE), einer multiorganischen Entzündungserkrankung, kann der CRP-Spiegel trotz Entzündungsaktivität sehr niedrig sein. Es treten jedoch Autoantikörper gegen CRP auf, die einen Zusammenhang mit dem akuten Koronarsyndrom und somit zwischen SLE und einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislaferkrankungen herstellen können (67–69). Ein weiterer Autoantikörper, der bei SLE auftritt, ist Anti-oxidiertes LDL (oxLDL). Ein erhöhtes Level von Anti-oxLDL weist auf Atherosklerose hin und kann auch als Marker für Herz-Kreislaferkrankungen dienen (53,70–72).

## 1.6 Lipide in der Diagnostik

Lipide als wichtigste Molekülklasse im menschlichen Körper (73) sind im täglichen Leben allgegenwärtig, in Lebensmitteln, im Blut, in Zellen und Geweben (74) oder im angeborenen und adaptiven Immunsystem (75). Sie werden als hydrophobe oder amphipathische kleine Moleküle in organischen Lösungsmitteln löslich definiert (74,76) und spielen eine Rolle bei der Zellsignalübertragung, der Zellmembranstruktur, dem Lipidtransport und dem Energiespeicher (74,77). Die wichtigsten Lipidklassen im Blut sind Triglyzeride, Cholesterin und Phospholipide. Lipoproteine setzen sich aus diesen Lipidklassen in Verbindung mit Proteinen zusammen (78,79). Ihre Aufgabe besteht darin, Lipide von einem Ort im Gewebe zum nächsten zu transportieren. Lipide bestehen unter anderem aus Fettsäuren, ihre Hauptaufgabe liegt in der Verteilung und dem Stoffwechsel dieser, als Bausteine für Phospholipide der Zellmembranen (78). Lipide werden zunehmend mit Krankheiten wie Atherosklerose (80,81), Herz-Kreislaufkrankungen (1,82), Multipler Sklerose (73), Infektionen und Entzündungskrankheiten (75), Alzheimer und Diabetes (83) sowie Krebs (84–86), Autoimmunerkrankungen (87–89), COVID-19 (87,90) und neurodegenerative Erkrankungen (91,92) in Verbindung gebracht. Bei Krebs beispielsweise haben Tumorzellen aufgrund ihrer schnellen Vermehrung einen hohen Bedarf an Phospholipiden für den Aufbau der Zellmembran und aktivieren eine Lipidsynthese aus dem Nichts (85). Bei Autoimmunerkrankungen wie dem Anti-Phospholipid-Syndrom spielen Anti-Phospholipid-Autoantikörper gegen Cardiolipin (CL), Apolipoprotein H/ $\beta$ 2-Glykoprotein 1 (APOH/ $\beta$ 2-GP1) oder Phosphatidylethanolamin eine Rolle. Dies kann zu arterieller oder venöser Thrombose, Thrombozytopenie oder Schwangerschaftsmorbidität führen (88,93,94). Lipidveränderungen können die mitochondrielle Funktion beeinträchtigen, da sie sowohl die äußere als auch innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten (95). Lipide sind zu 40 – 81 % Bestandteile des Gehirns (96). Ihnen werden verschiedene Funktionen im Gehirn zugeschrieben, wie die Modulation der zellulären Kalziumsignalübertragung oder andere Signaltransduktionskaskaden wie die Ausrichtung von Proteinen auf Membranen (97,98). Veränderungen in Lipidkonzentrationen oder -verteilung könnten daher zu Veränderungen der Membraneigenschaften (Fluidität, Clustering von Rezeptoren) und somit zu neurodegenerativen Erkrankungen führen (99,100).

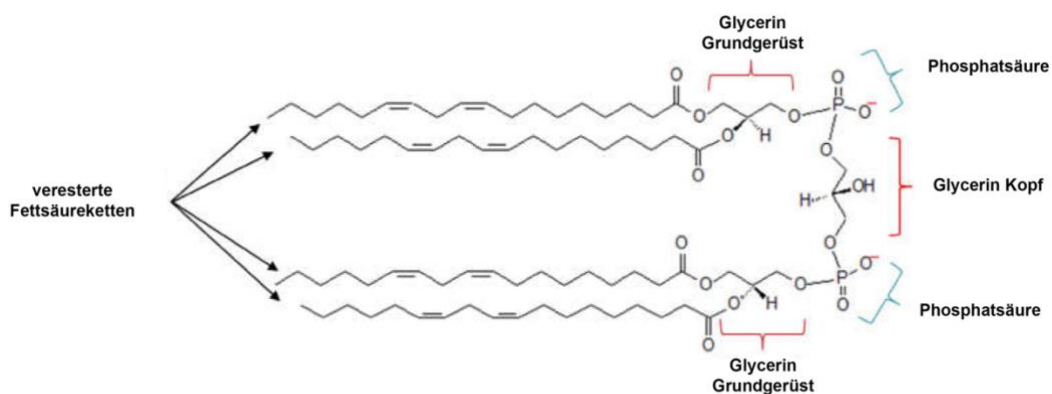
Verwendete Methoden zum Nachweis von Lipiden sind Agarosegel-Elektrophorese (101), Massenspektrometrie, Flüssigchromatographie und andere Arten der

Chromatographie (83,100,102), Shotgun-Lipidomics (103), Streifentests (104,105), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (106–108) und Biosensoren (96,109,110). Gegenwärtig verwendete Methoden, wie ELISA sind kostspielig, verbrauchen viel Probenmaterial und können oft nicht mehrere Lipide gleichzeitig identifizieren (111). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und komplexen Strukturen sind Lipide als Biomarker für eine Vielzahl von Krankheiten möglich (96). Jedoch ist es hinsichtlich ihrer wasserunlöslichen Komponenten (Kohlenwasserstoffketten) schwer, diese in Blut bzw. wässrigen Lösungen nachzuweisen, was ihre Anwendbarkeit als diagnostischer Marker weitgehend einschränkt (96).

### 1.6.1 Cardiolipin als Model

Der Trivialname für 1,3-Diphosphatidyl-sn-Glycerin ist Cardiolipin. CL ist ein Phospholipid aus der inneren mitochondrialen Membran, macht ungefähr 20 % (112) der Phospholipidmasse aus und wurde erstmals von Mary Pangborn 1942 aus dem Rinderherz isoliert (84,95,110,113). Es setzt sich, für Phospholipide einzigartig, aus zwei Phosphatkopfguppen, drei Glycerineinheiten und vier Fettsäureketten zusammen (Abb. 4). Durch die angelagerten vier Fettsäureketten an die Kopfgruppen zeigt das CL eine kegelförmige Struktur (84,114,115). Seine physiologischen Funktionen im menschlichen Körper sind die Unterstützung der Membrandynamik, die Stabilisierung der lateralen Organisation proteinreicher Membranen und zahlreiche Enzymaktivitäten (110,116). Unter anderem solche Enzymaktivitäten, die mit der Oxidativen Phosphorylierung und der gekoppelten Atmung zusammenhängen. Veränderungen der CL-Konzentration oder -Verteilung können zu Veränderungen in der zellulären Atmung führen (95,117). Eine Dysregulation in der Atmungskette und somit eine Veränderung in der Energiegewinnung bestätigt die Warburg-Theorie, wonach Krebszellen durch veränderte Energiegewinnung entstehen (114,118). CL sind aufgrund ihrer ungesättigten Fettsäuren anfällig für oxidativen Stress. Oxidierungen der Fettsäuren können Signale für die mitochondrielle Apoptose senden. Entscheidend für die Regulierung der zellulären Apoptose ist ein Gleichgewicht zwischen ungesättigten und gesättigten Fettsäuren. Eine Dysregulation des CL wurde bereits in verschiedenen Krebsarten (119–121), Krankheiten im Zusammenhang mit mitochondrialer Atmungsfunktion (Ischämie des Herzens, Gliome, Herzversagen) (122,123), neurodegenerativen Erkrankungen (Parkinson-Krankheit) (124) und bei der

Verwendung von Medikamenten beobachtet (84). Das Interagieren von CL und verschiedenen Medikamenten wie Anthrazykline und Aminoglykoside kann zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Herzversagen oder Nierenschäden führen (110). Die hohe Beteiligung des CL an unterschiedlichen Krankheiten ist auf die Vielfalt der molekularen Spezies des CL aufgrund der CL-Biosynthese und des CL-Katabolismus zurückzuführen (114,125,126). Die Vielfalt und das Vorkommen von CL in verschiedensten Krankheiten macht es zu einem aussagekräftigen Biomarker (127).



**Abb. 4: Struktur von Cardiolipin**

Die Struktur eines Cardiolipinmoleküls besteht aus vier Fettsäureketten, zwei GlycerinGrundgerüsten, zwei Phosphatgruppen und einem Glycerinkopf. Abbildung modifiziert nach Ahmadpour 2020 (84).

### 1.6.2 Weitere wichtige Biomarker in der Lipiddiagnostik

Weitere wichtige Biomarker neben Cardiolipin sind andere Phospholipide, Lipoproteine und Ganglioside.

#### Phospholipide

Phospholipide sind die Hauptbestandteile der Zellmembranen (128,129) und setzen sich aus zwei Fettsäureketten, einer Glycerineinheit und einer polaren Kopfgruppe wie Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerin oder Inositol zusammen. Die Bindung verschiedener Kopfgruppen führt zu unterschiedlichen Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS),

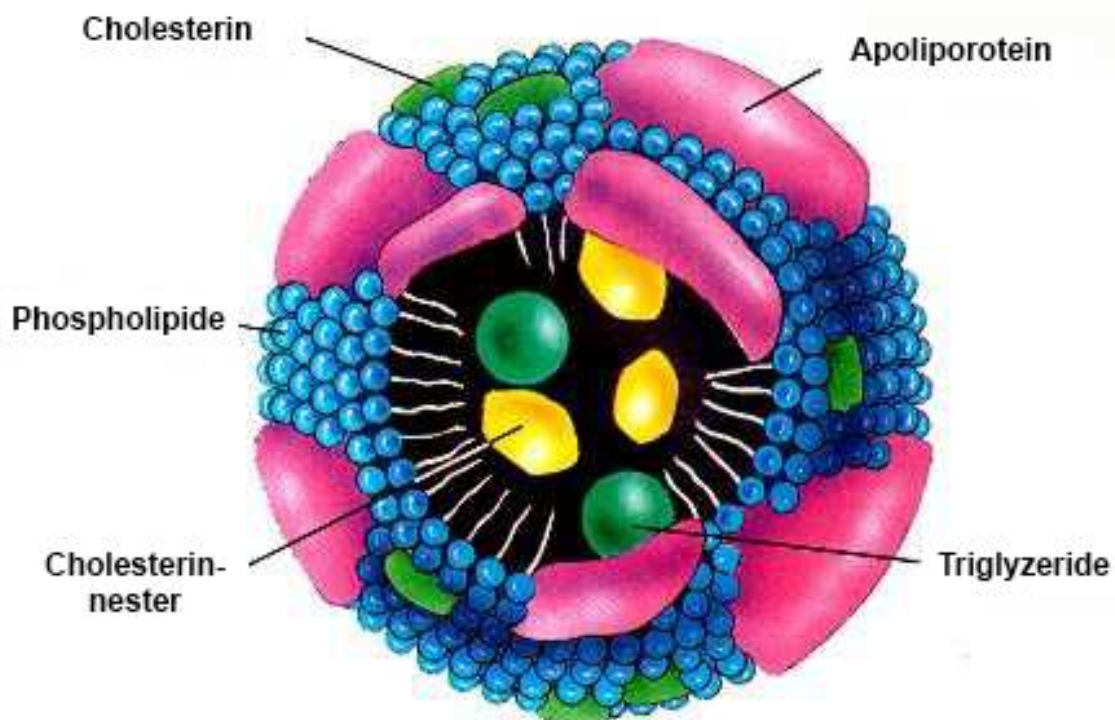
Phosphatidylglycerin (PG) oder Phosphatidylinositol (PI) (74,130). Ihre Aufgabe besteht darin, die strukturelle Integrität der Zelle und die räumliche Trennung verschiedener subzellulärer Kompartimente aufrechtzuerhalten (129,130). Die Fettsäuren von Phospholipiden in normalen Geweben sind meist langkettig und ungesättigt. Wohingegen in Mitochondrien aus Tumorzellen die Phospholipide kurzkettige und gesättigte Fettsäureketten enthalten (95). Veränderte Phospholipide durch Oxidation können bei verschiedenen Krankheiten wie Diabetes, Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (130,131). Autoantikörper gegen Phospholipide treten in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen wie dem Anti-Phospholipid-Syndrom (APS) auf (132–134), aber in neuesten Studien zeigen auch Patienten, die am SARS-CoV-2-Virus erkrankt sind und thrombotische Ereignisse aufwiesen, Anti-Phospholipid-Antikörper. Jedoch bleibt die pathophysiologische Bedeutung von Anti-Phospholipid-Antikörpern bei COVID-19-Patienten unklar (135).

### Lipoproteine

Neben Lipiden stehen auch Lipoproteine im Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Sie setzen sich aus einem Kern von Triglyzeriden und Cholesterinnestern, umgeben von einer Phospholipid- und Cholesterin-, Apolipoproteinhülle (Abb. 5) zusammen (81). Eine Klassifizierung (High, Low und Very-Low Density Lipoproteine) von Lipoproteinen wird über die Größe und Dichte vorgenommen (109). Ihre Aufgabe besteht darin, Lipide und Cholesterin von einem Gewebe ins andere Gewebe zu transportieren (81). Lipoproteine wie High-Density-Lipoprotein (HDL), Low-Density-Lipoprotein und Apolipoprotein-A1 (Apo-A1) zeigen bei Infektionen und entzündlichen Erkrankungen deutliche Konzentrationsveränderungen (75). Sie werden weiterhin zur Bewertung des Risikos zur Entwicklung von CVD und somit zur Frühdiagnose verwendet (109).

Ein weiteres wichtiges Lipoprotein ist das Apolipoprotein H/ $\beta$ 2-Glykoprotein 1, welches ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 43 – 50 KDa, bestehend aus fünf Domänen, ist (47,133,136). Unter anderem ist  $\beta$ 2-GP1 in seiner physiologischen Funktion an der Blutgerinnung beteiligt (136). Seine Bezeichnung als Apolipoprotein H beruht auf der hohen Affinität zu triglyzeridreichen Lipoproteinpartikeln und der Aktivierung von Lipoproteinlipasen (137).  $\beta$ 2-GP1 spielt bei der Autoimmunerkrankung

APS eine wichtige Rolle, da sowohl gegen CL als auch  $\beta$ 2-GP1 die meisten IgG/IgM-Autoantikörper im Serum eines Patienten nachweisbar sind (47,133). Das  $\beta$ 2-GP1 wird von Anti-Cardiolipin-Antikörpern in APS als Kofaktor zur Bindung benötigt, was auf eine Abhängigkeit der Anti-Cardiolipin-Antikörper von der Struktur des  $\beta$ 2-GP1 hinweist (138). Positive Seren von APS-Patienten zur Analyse zu bekommen ist eine Seltenheit, da geschätzt wird, dass nur etwa 0,3 bis 1 % der Bevölkerung von APS betroffen sind (139,140).



**Abb. 5: Zusammensetzung eines Lipoproteins**

Ein Lipoprotein setzt sich aus einem Kern aus Triglyceriden und Cholesterinnestern und einer Hülle aus Cholesterin, Apolipoproteinen, Cholesterin und Phospholipiden zusammen. Abbildung modifiziert nach Walic 2010 (141).

### Ganglioside

Ganglioside sind eine wichtige Unterklasse der Glykosphingolipide, die über ihren Lipooligosaccharidanteil in der äußeren Zellmembran verankert sind (142). Sie kommen in allen Körpergeweben, besonders aber im Gehirn und Nervensystem vor (142,143). Sie sind an der Entwicklung und Regeneration von Neuronen (144)

Gedächtnisbildung (145), synaptische Übertragung (146) und der Reparatur von Nervenzellen (147) beteiligt. Eine Klassifizierung der Ganglioside erfolgt zum einen über die Anzahl der an die Zuckergruppe gebundenen Sialinsäurereste (M = 1, D = 2, T = 3, Q = 4) und zum anderen über ihre chromatographische Mobilität (142,148). Ein veränderter Gangliosidmetabolismus oder Autoantikörper gegen Ganglioside werden in verschiedenen neurologischen, immunologischen oder Infektionskrankheiten beobachtet (142,149,150).

## 1.7 Anwendung hydrophober Mikropartikel

Hydrophobe Mikropartikel werden in verschiedenen Chromatographie- oder Durchflusszytometriemethoden eingesetzt (151,152). Abhängig von der Anwendung der Mikropartikel können diese aus unterschiedlichen Materialien wie Polymethylmethacrylat, Polystyrol, Polyurethan, Polyvinylchlorid, Silan oder anderen Polymethacrylaten bestehen (153). Sie können aufgrund verschiedener Oberflächenmodifikationen eine hydrophobe Oberfläche besitzen (154). Anwendungsgebiete von hydrophoben Mikropartikeln finden sich in der Diagnostik für therapeutische Anwendungen (155), Krebstherapie (156), Medikamententransport (157), in der Aufreinigung von Wasser (158–160), der Produktion von Biokraftstoffen (161) oder in der Lebensmittelindustrie (162). Hydrophobe Mikropartikel, welche aufgrund ihres Verhältnisses zweier Fluoreszenzfarbstoffe (Coumarin 6 und Rhodamin 6G) sowie ihrer Größe kodiert und in organischen Lösungsmitteln stabil sind, gibt es jedoch nicht. Die Herstellung solcher Mikropartikel würde es ermöglichen, mehrere lipophile oder amphiphile Biomarker an die Oberfläche dieser Mikropartikel zu koppeln und somit einen simultanen Nachweis dieser mit nur einer Probe durchzuführen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mikropartikel, Sonden, Antikörper, Biomarker

**Tab. 1: Mikropartikelpopulationen**

Mikropartikel	Größe	Hydrophobie	Spezifikation	Oberflächenmodifikation	Herkunft
CO426	15,0 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO427	15,4 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO430	11,2 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO431	11,1 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO432	11,0 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO433	12,3 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH
CO434	11,2 µm	hydrophil	PMMA-Mikropartikel, fluoreszenzkodiert (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 334) und größenkodiert	carboxylierte Oberfläche	PolyAn GmbH



HVMP75-C3*	6 – 12 µm	hydrophob	transparente, quervernetzte-PMMA Mikropartikel	C3 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
HVMP75-C8*	6 – 12 µm	hydrophob	transparente, quervernetzte-PMMA Mikropartikel	C8 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
HVMP75-C10*	6 – 12 µm	hydrophob	transparente, quervernetzte-PMMA Mikropartikel	C10 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
HVMP75-C18*	6 – 12 µm	hydrophob	transparente, quervernetzte-PMMA Mikropartikel	C18 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO497 (VMP69)	6 – 12 µm	hydrophil	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	poly OH-Gruppen Oberfläche	PolyAn GmbH
CO498 (HVMP69-C3)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C3 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO499 (HVMP69-C18)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C8 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO500 (HVMP69-C10)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C10 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO501 (HVMP69-C18)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C18 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO512** (HVMP81-C3)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C3 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO513** (HVMP81-C8)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C8 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
CO514** (HVMP81-C10)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C10 Silanoberfläche	PolyAn GmbH

CO515** (HVMP81-C18)	6 – 12 µm	hydrophob	quervernetzte, fluoreszenzkodierte (spezifisches Farbstoffverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und Coumarin 6) Mikropartikel	C18 Silanoberfläche	PolyAn GmbH
-------------------------	-----------	-----------	--	---------------------	-------------

\*HVMP75-C3-C18 kein CO-Nummern, da diese Mikropartikel aufgrund ihrer Transparenz nicht mit der VideoScan-Technologie eingemessen wurden

\*\*hergestellte Austauschpopulation HVMP69-C3-C18

**Tab. 2: Fluoreszenzfarbstoffe**

Fluoreszenzfarbstoffe	Anregungswellenlänge $\lambda_{Ex}$ [nm]	Emissionswellenlänge $\lambda_{Em}$ [nm]
Alexa Fluor® 647	651	667
CellBrite® Red	644	665
Coumarin 334	444	510
Coumarin 6	460	500
Cy5	650	670
Nilrot	530	635
Rhodamin 6G	528	550

Tab. 3: Sonden- und DNA-basierte Biomarker

Sonde	Bezeichnung	Sequenz	Konjugat	Anwendung	Herkunft
cfmDNA	Cell free mitochondrial DNA	5'-TGG GAG TGG GAG GGG AAA ATA ATG TGT TAG TTG GGG GGT GAC TGT TAA AAG TGC ATA CCG CCA AAA GAT AAA ATT TGA AAT CTG GTT AGG CTG GTG TTA GGG TTC TTT GTT TTT GGG GTT TGG CAG AGATGT GTT TAA GTG CTG TGG CCA-3'	-	DNA-basierter kardiovaskulärer Biomarker	Biotez Berlin Buch GmbH
	Fänger-sonde	5'-(T)20ATCTCTGCCAAACC CC-3'	3'biotinyliert	Nachweis des DNA-basierten kardiovaskulären Biomarkers	Biomers.net GmbH
	Nachweis-sonde	5'-TTGG CGGTATGCACTT-3'	5'Cy5	Nachweis des DNA-basierten kardiovaskulären Biomarkers	Biomers.net GmbH
FISH	Fänger-sonde	5'-(T)20ACWCCTACGGG WGGCWGC-3'	3'biotinyliert	unabhängige interne Kontrolle	Biomers.net GmbH
	Nachweis-sonde	5'-GCWGCCWCCCGTAGGWGT-3'	5'Cy5	unabhängige interne Kontrolle	Biomers.net GmbH
HPV72	Human Papiloma Virus	5'-CATCTGTTGGTTTA ATGAGCTT-3'	3'Cy5 5'biotinyliert	unabhängige interne Kontrolle	Biomers.net GmbH
	Nachweis-sonde	5'-AAGCTCATTAACC AACAGATG-3'	3'biotinyliert 5'BHQ2	unabhängige interne Kontrolle	Biomers.net GmbH

Tab. 4: Antikörper

Antikörper	Isotyp/Klonalität	Anwendung	Konjugat	Herkunft
Anti-CRP-Antikörper	IgG, monoklonal	Protein-basierter Nachweis kardiovaskulärer Biomarker	Cy5	Bioss antibodies
Anti-BNP-Antikörper	IgG, monoklonal	Protein-basierter Nachweis kardiovaskulärer Biomarker	Cy5	Bioss antibodies
Anti-LDL-Antikörper	IgG, polyklonal	Protein-basierter Nachweis kardiovaskulärer Biomarker	Cy5	Bioss antibodies
Anti-humanes-Cardiolipin	IgG, polyklonal	Primärantikörper im Nachweis von Cardiolipin	-	antibodies-online GmbH
Ziege Anti-Maus-IgG	IgG, polyklonal	Sekundärantikörper im Nachweis von Lpa	Cy5	Dianova
Ziege Anti-APOH-Antikörper	IgG, polyklonal	Primärantikörper im Nachweis von APOH	-	antibodies-online GmbH
Esel Anti-Ziege IgG	IgG, polyklonal	Sekundärantikörper im Nachweis von APOH	Cy5	BIOZOL Diagnostika Vertrieb GmbH
Maus Anti-human IgG Antikörper	IgG, polyklonal	Sekundärantikörper im Nachweis von humanen IgG-Antikörpern	Alexa Fluor® 647	Dianova
Ziege Anti-human IgM	IgG, Fc <sub>5μ</sub> , polyklonal	Sekundärantikörper im Nachweis von humanen IgM-Antikörpern	Alexa Fluor® 647	Jackson Immuno Research Laboratories, INC.

**Tab. 5: Enzyme**

Enzyme	Spezifikation	Konzentration	Herkunft
Phospholipase A2 (aus Rinder Pankreas)	katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung an der zweiten Fettsäurekette an der sn-2 Position	20 Units/mg Protein	Sigma-Aldrich
Phospholipase C (aus <i>Bacillus cereus</i> )	Katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung am Glycerin-Grundgerüst	200 Units/mg Protein	Sigma-Aldrich

**Tab. 6: Biomarker**

Biomarker	Bezeichnung	Konjugat	Herkunft
CRP	C-reaktives Protein	-	antibodies-online GmbH
BNP	Brain natriuretic peptide	-	Bachem
LDL	Low-Density Lipoprotein	-	BIOZOL Diagnostika Vertrieb GmbH
β2-GP1	Beta 2-Glykoprotein I (Apolipoprotein H)	-	Avanti Polar Lipids, INC.
CL-Cy5	Cardiolipin Cy5	Cy5	Avanti Polar Lipids, INC.
PE-Cy5	Phosphatidylethanolamin Cy5	Cy5	Avanti Polar Lipids, INC.
PC-Cy5	Phosphatidylcholin Cy5	Cy5	Avanti Polar Lipids, INC.
CL 16:0	synthetisches Cardiolipin	-	Echelon Biosciences INC
Natives CL	Cardiolipin	-	antibodies-online GmbH
CL bovine heart	Cardiolipin	-	Avanti Polar Lipids, INC.
PS	Phosphatidylserin	-	Avanti Polar Lipids, INC.
PE	Phosphatidylethanolamin	-	Avanti Polar Lipids, INC.
PC	Phosphatidylcholin	-	Avanti Polar Lipids, INC.
PI	Phosphatidylinositol	-	Avanti Polar Lipids, INC.

## 2.2 Chemikalien und Puffer

Tab. 7: Chemikalien

Chemikalien	Zusatzinformationen	Herkunft
1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O; 99% rein	ACROS Organics™
7-Aminoactinomycin D	1 mg	Invitrogen
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O; ≥ 99,5%	Carl Roth
Acetonitril	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N; HPLC grade	ACROS Organics™
Acridine Orange 10-nonyl Bromid	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> BrN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Ammoniumdihydrogensulfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; ≥ 99%	ACROS Organics™
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; ≥ 99,8%	Carl Roth
BSA	Bovines Serumalbumin; IgG-frei	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O; ≥ 99%	Carl Roth
CellBrite® Red	CellBrite® Red	Biotium
Chloroform	CHCl <sub>3</sub> ; ≥ 99%	Carl Roth
Chlorwasserstoffsäure	HCl; 25%	Carl Roth
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol – Dihydrochlorid	AppliChem
Decyltrimethylammonium Bromid	≥ 98% rein	Fluka Chemie
Dinatriumhydrogenphosphat	≥ 99%	Carl Roth
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Ethanol (absolut)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH; ≥ 99,8%	VWR
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S; ≥ 99,5%	Carl Roth
HSA	Albumin vom humanen Serum ≥ 96%	Sigma-Aldrich
Immersionsöl	F30CC	Olympus
Immobilisierungslösung	-	Medipan
Isopropanol (2-Propanol)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O; ≥ 99,8%	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; ≥ 99,5%	BioChemica
Magermilchpulver	Blotting Grade, fettarm	Carl Roth

Magnesiumchlorid - Hexahydrat	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	AppliChem
MES	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ ; $\geq 99\%$	Carl Roth
Methanol	$\text{CH}_4\text{O}$ ; $\geq 99\%$	Carl Roth
Methylimidazol	$\geq 99\%$	Sigma Aldrich
Natrium n-Octyl Sulfat	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaSO}_4$ ; 99 %	Alfa Aesar™
Natriumchlorid	$\text{NaCl}$ ; $\geq 99,8\%$	Carl Roth
Natriumcholat	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_5$	Carbolution Chemicals
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; $\geq 98\%$	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	$\text{CHNaO}_3$ ; $\geq 99,5\%$	AppliChem
Natriumhydroxid	$\text{NaOH}$ ; 98%	Carl Roth
Natriumsulfat	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	ACROS Organics™
Nilrot	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$	Carl Roth
Octansäure	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ ; $\geq 99\%$	Carl Roth
Pferdeserum		Biochrom AG
Poly-L-Lysine - HCL	PLL-HCl	Sigma Aldrich
Poly-L-Lysine - HBr	PLL-HBr	Sigma Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Ultra pute; $\geq 99\%$	Carl Roth
Sheath Fluid	Flowzytometer	Quantum Analysis
Solid Mount	Mountingmedium STED Proben	Abberior Instruments
Streptavidin	intern produziert nach Gallizia et al. – 1998 (163)	Forschungsgruppe
Tetramethylammoniumchlorid	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NCl}$	Sigma-Aldrich
TRIS Base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ; $\geq 99\%$	Carl Roth
TRIS-HCL	$\geq 99\%$	VWR Chemicals
Tween® 20	Polysorbat 20; nichtionisches Detergens; Dichte = $1,095 \text{ g/cm}^3$	Carl Roth
UV-Kleber	Isopropanol, Harze, Stabilisatoren, Vernetzer, Ethanol	attomol GmbH
Wasser, Reinstwasser	$\text{H}_2\text{O}$ , durch Reinstwasseranlage	ELGA

**Tab. 8: Puffer und Lösungen - Zusammensetzung**

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Alkoholreihe Ethanol	100, 80, 60,40, 10, 5 % (v/v) Ethanol in H <sub>2</sub> O
Alkoholreihe Methanol	100, 80, 60,40, 10, 5 % (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O
BSA-Lösung	x % in TBS/TBS-T (0,01% Tween® 20); zum Blocken
CellBrite® Red Lösung	1:50 – 1:100.000 in TBS-T mit 0,01 % Tween® 20
HEPES-Puffer	20 mM in ddH <sub>2</sub> O
Magermilchlösung	x % in TBS/TBS-T (0,01% Tween® 20); zum Blocken
Nilrot-Lösung	2 µg/µl und 10 µg/µl in 80 % Methanol
PLL-Lösungen	0,1 mg/ml PLL in H <sub>2</sub> O 80 µg/µl in 1x PBS
PBS-T	0,01 % bis 0,1 % (v/v) Tween® 20 in PBS
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 (-> HCl), autoklaviert
PCR -Puffer (10x)	160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 670 mM TRIS HCL; 0,1 % Tween® 20; pH 8,8 (-> NaOH)
Puffer 1 (164)	CH <sub>4</sub> O; C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N; C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> NCl (70:25:5, v/v)
Puffer 2 (165)	50 mm NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; pH 7,0 (-> HCl)
Puffer 3 (166)	0,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1 mM TRIS-HCl; pH 8,0 (-> HCl)
Puffer 4 (166)	0,2 M NaCl; 5 mM TRIS-HCl; pH 7,1 (-> HCl)
Puffer 5 (166)	1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 50 mM C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>5</sub>
TBS -T	0,01 % bis 0,1 % (v/v) Tween® 20 in TBS
TBS mit CaCl <sub>2</sub>	20 mM CaCl <sub>2</sub> in TBS
TBS (10x)	500 mM TRIS Base; 1,5 M NaCl; pH 7,5 (-> HCl)



Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Zusatzinformationen	Herkunft
attomol® Anti-Phospholipid-IgG/M LINA 3	REF 1176	attomol GmbH
Deckgläser	24 x 24	Carl Roth
Mikrofluidikchip	Flex.flow slides; 6 Kammern	BiFlow Systems
	Flow-Cell Tapes	BiFlow Systems
	transparentes Cover Tape	BiFlow Systems
	Schwarzes Tape	BiFlow Systems
Mikroreaktionsgefäße	500, 1500, 2000, 5000 µl	Carl Roth
Multiwellplatten	96-Well; Polystyrol; Flachboden	Greiner bio-one
	96 Well; Polypropylen	Greiner bio-one
	96 Well; Nunc Thermo	Thermo Fisher Scientific
	96 Well; Maxi Sorb Click	Thermo Fisher Scientific
	96 Well; Zellkultur	TH Geyer
	96 Well; Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific
	96 Well; ImmunoGrade	Brand
	96 Well; LipoGrade	Brand
	96 Well	Sarstedt
	96 Well	IBIDI
	96 Well PolySorP	Thermo Fisher Scientific
Nitrozellulosemembran	Amershan Protran; 0,2 µm	GE Healthcare
	Amersham Protran Premium; 0,45 µm	cytiva
Objektträger	76 x 26 x 1 mm	Süsse
	Zenonor Beschichtung	PolyAn GmbH
Petrischalen		
PVDF-Membran	Transfermembran; 0,45 µm	Carl Roth
	Amersham Hybond LFP; 0,2 µm	cytiva
Reaktionsgefäße	für Mikropartikel; 200 µl	Brand®
Röhrchen	transparent, für Flowzytometer	Greiner bio-one
Sterilfilter	Nalgene™ Rapid-Flow™; Einweg-Flaschenaufsatzfilter mit PES-Membran 150 ml	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen	15, 50 ml	Sarstedt

## 2.3 Geräte

**Tab. 10: Laborgeräte**

Laborgeräte	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaagen	Ailon; LE5201	Acculab; Sartorius
Autoklav	V-Serie	Systec
Bestrahlungskammer	UV/VIS BS-4	Opsytec
Chemilumineszenz Imager	Biostep Celvin S 420 FL	Biostep
Digitale Fluoreszenzmikroskopieplattform	VideoScan-Technologie	BTU C-S (167)
Evaluation Kit	Version 4.3	BiFlow Systems
Flowzytometer	QA FCM QP 2	Quantum Analysis
Heizrührgerät	Yellow line; MSH basic	IKA
Inkubator	Minitron	Infors HT
Real-time Cycler	IQ5 Real time PCR System	Bio-Rad
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Kontaktwinkelmeter	OCA 30	dataphysics
Mikropipetten (Ein-/Mehrkanal)	Research (plus)	Eppendorf
pH-Meter	pH 50 VioLab	Carl Roth
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Reinstwasseranlage	-	ELGA
STED- Mikroskopiesystem	Expert Line	Aberrior Instruments
Thermoschüttler	ThermoMixer C	Eppendorf
Tischzentrifuge	Minispin plus	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonorex digital 10P	Bandelin
Vakuumabsaugsystem	Vascusafe	INTEGRA Biosciences
Vortex-Shaker	Intelli-Mixer™ RM-2M	ELMI
Vortexer	RS-VA10	Phoenix Instrument
Wasserbad	TW12	Julabo

## 2.4 Verwendete Software für die Bildgebung und Analyse

Für die Erhebung der Daten und Bildaufnahmen für diese Arbeit wurden verschiedene Programme benutzt:

Bildaufnahme, -verarbeitung und -analyse:

- VideoScan-Technologie
  - CamMicControl (Version v0.68.10.5)
  - FastFluoScan (Version 1.9.1.13)
- STED Mikroskopiesystem
  - Abberior Inspector (Version v0.13.12637)
- Biostep Celvin S 420 FL
  - SnapAndGo (Version 1.8.2 (Rev.1))
- ImageJ/FIJI (Version 2.3.0/1.53q)

Software zur Erhebung von Daten:

- Kontaktwinkelmeter
  - SCA 20 (Version V.361.6 build 197)
- Flowzytometer
  - CyPAD (Version v1.4.1)
- Evaluations Kit Bi.Flow Systems
  - bi.Flow Pump Control Software (Version 2.4)

Programme für statistische Analysen:

- R/R Studio
- Microsoft Excel
- Digilogger
- ImageJ/FIJI (Version 2.3.0/1.53q)

für das Erstellen von Abbildungen, die Ergebnisaufbereitung und das Verfassen der Arbeit:

- Microsoft Word
- Microsoft Excel
- Microsoft Powerpoint
- Adobe Photoshop

## 2.5 Bildgebende Systeme zur Visualisierung von Fluoreszenzsignalen

Zur Visualisierung von Fluoreszenzsignalen wurden verschiedene bildgebende Systeme verwendet. Zur Analyse der DotBlots wurde ein Chemilumineszenz Imager Biostep Celvin S 420 FL mit der Option der Fluoreszenzgebung verwendet. Der Celvin S 420 FL ist ein hochauflösendes Fluoreszenzsystem, mit vier verschiedenen LED-Typen für die Fluoreszenzanregung und vier verschiedenen Bandpassfiltern ausgestattet. Verwendet wurde die LED Red 625 nm (590 – 680 nm) und der Bandpassfilter 680 (660 – 700 nm) zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor® 647 und Cy5.

Die VideoScan-Technologie ist eine vollautomatische fluoreszenzmikroskopiebasierte Bildgebungsplattform zur quantitativen Auswertung 2-dimensionaler Bilder mittels Algorithmen der digitalen Bildverarbeitung. Diese Technologie wurde zur Visualisierung und Analyse der Mikropartikel eingesetzt. Sie ist in der Lage, einzelne Mikropartikel aufgrund ihres Farbstoff- und Größenverhältnisses in Populationen einzuteilen und gebundene Fluoreszenzsignale an der Mikropartikeloberfläche zu quantifizieren. Hierbei wird ein Fluoreszenzsignal als referenzierte Mittlere Fluoreszenzintensität ausgegeben (refMFI) (167).

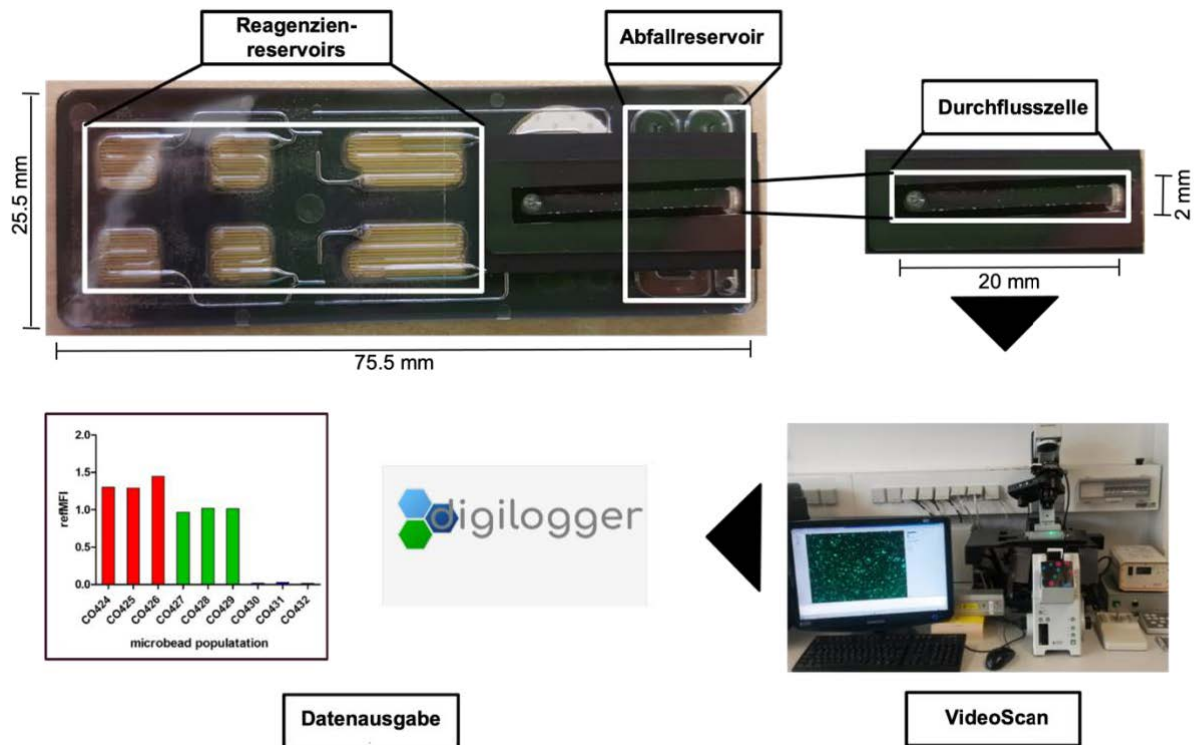
Das STED-Mikroskop basiert auf einem invertierten IX83 Multikanal konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit einem 100x-Objektiv und den Anregungslasern 561 nm und 640 nm in Kombination mit einem gepulsten Depletion Laser mit 775 nm für Aufnahmen mit einer Auflösung von bis zu 20 nm. Das konfokale Fluoreszenzmikroskop wurde zur Visualisierung der Mikropartikel und deren Ligandenfluoreszenz auf Objektträgern verwendet.

Das Durchflusszytometer QA FCM QP 2 von Quantum Analysis, ist eine Technologie zur Detektion von Einzelzellen und Partikeln mit drei Lichtquellen. Davon sind 2 solid State Laser für rot (637 nm) und blau (488 nm) und eine LED für UV (365 nm), sowie 8 optische Kanäle (FSC – 488 nm Forward Scatter; SSC – 488 nm – Side Scatter; FL1 515-555 nm; FL2 570-610 nm; FL3 – 665 – 705nm; FL4 – 755-815 nm; FL5 – 415-475 nm und FL6 – 665-705 nm) verbaut. Das Durchflusszytometer wurde zur Analyse der Mikropartikel und der damit verbundenen Assays mit den optischen Kanälen FL1 und FL6 verwendet.

## 2.6 Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein - und DNA - basierten kardiovaskulären Biomarkern

### 2.6.1 Mikrofluidikchip

Der Mikrofluidikchip besteht aus sechs Reagenzienreservoirs mit Volumina von 25 und 50 µl, einer Blasenfalle und einem Abfallreservoir (Abb. 6). Die Reservoirs können durch integrierte elektrochemische Mikropumpen entleert werden. Der technische Aufbau und das Funktionsprinzip der mikrofluidischen Kartuschen sowie der integrierten Mikropumpen sind in den Arbeiten von Streit et al 2018, Schumacher et al 2018 und Geidel et al 2016 beschrieben (168–170). Ein Chip kann aufgrund seiner Konzeption und der ablaufenden chemischen Reaktion für einen Patienten verwendet werden. Die Reagenzienreservoirs wurden mit Assaykomponenten (Puffer oder Probenlösung) befüllt. Die Reagenzienreservoirs und die Durchflusszelle wurden mit druckempfindlichem Klebeband versiegelt. Die integrierten Mikropumpen und damit die Volumenströme in den Kavitäten wurden über die Pumpensteuerungssoftware (bi.Flow Pump Control Software) gesteuert. Ein selbsterstelltes Video zur Handhabung des mikrofluidischen Chips findet sich im Supplement des Papers Dinter et al 2019 (1).



**Abb. 6: Mikrofluidikchip und seine Funktion**

Im Mikrofluidikchip (flex.flow, BiFlow Systems GmbH) wurden mit Biomarkern gekoppelte Mikropartikel in einer zufälligen Anordnung in der Durchflussszelle immobilisiert. Die Reagenzienreservoirs im Mikrofluidikchip sind mit Assaykomponenten (z. B. Puffer, Probenlösung) gefüllt. Während des Assays werden die Komponenten über die Pumpensteuerungssoftware von Bi.Flow Systems durch die mikrofluidischen Kanäle gepumpt. Nach Inkubations- und Waschschrinen wurden die Mikropartikel in der Durchflussszelle mit der VideoScan-Technologie gemessen. Die Intensität der Oberflächenfluoreszenz ist das Ergebnis einer molekularen Wechselwirkung der Zielmoleküle mit den Detektormolekülen und wird als referenzierte mittlere Fluoreszenzintensität (refMFI) ausgedrückt. Die Daten können dann mit der entwickelten Digilogger-Software ausgewertet werden.

### 2.6.2 Kopplung der Biomarker an carboxylierte Mikropartikel

Unabhängig voneinander wurden die Proteine CRP, BNP, LDL und Streptavidin mit Hilfe des Vernetzers 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) kovalent an carboxylierte Mikropartikel gebunden (171) (Tabelle 11). Streptavidin wurde für die Immobilisierung von biotinylierten DNA-Sonden verwendet. Pro Population wurden  $10^5$  Mikropartikel zunächst mit 200  $\mu$ l 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure 0,1 M (MES, pH 4,6) gewaschen. Anschließend wurden die Carboxylgruppen durch 20-minütiges Schütteln bei 28 °C und 1.200 rpm mit einer EDC-Lösung (25 mg/ml, gelöst in MES) aktiviert. Es folgte ein Waschschrin mit 0,05  $\times$

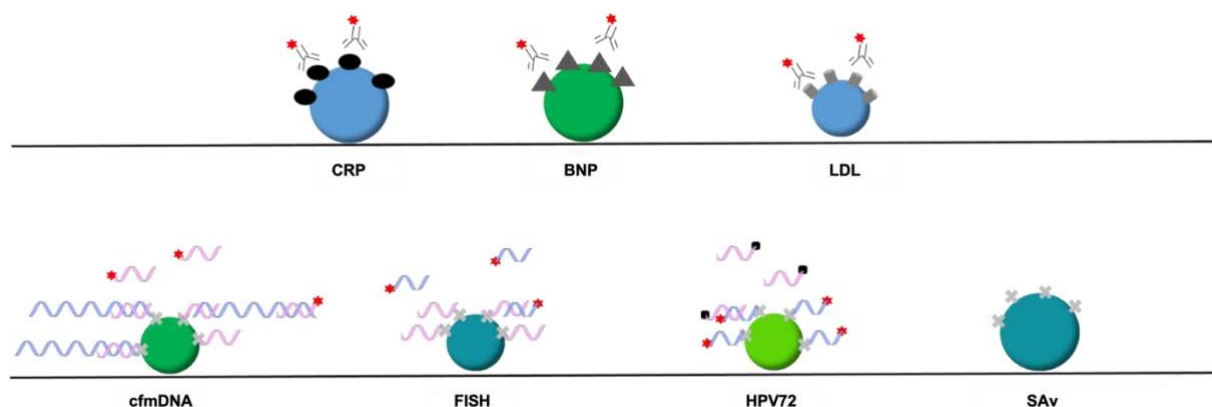
phosphate buffered saline (PBS) und eine Inkubation durch Schütteln (3 h bei 28 °C und 1.200 rpm) mit dem entsprechenden Protein (300 µg/µl, gelöst in 0,05 × PBS). Die Mikropartikel wurden dreimal mit 200 µl tris buffered saline mit 0,1 % Tween® 20 (TBS-T\*) gewaschen. Die Mikropartikel wurden entweder bei 4 °C gelagert oder für den Nachweis weiterverwendet.

**Tab. 11: Beladung der carboxylierten Mikropartikel**

Mikropartikelpopulationen	Durchmesser	Beladung
CO430	11,2 µm	CRP
CO431	11,1 µm	BNP
CO432	11,0 µm	LDL
CO434	11,2 µm	cfmDNA
CO426	15,0 µm	Streptavidin
CO427	15,4 µm	FISH (EUB338)
CO433	12,3 µm	HVP72

### 2.6.3 Kopplung der Fängersonden an carboxylierte Mikropartikel

Die biotinylierten Nukleinsäurefängersonden für cfmDNA, EUB338 (unabhängige interne Kontrolle) und HPV72 (unabhängige interne Kontrolle) wurden separat voneinander an mit Streptavidin beschichtete Mikropartikel (Tabelle 11, Abb. 7) in einer Konzentration von 50 nM gekoppelt (1 h bei 28 °C und 1.200 rpm). Anschließend wurden die Mikropartikel dreimal mit 200 µl TBS-T\* gewaschen, um ungebundene Fängersonden zu entfernen.



**Abb. 7: Beladung carboxylierter Mikropartikel**

Jede Mikropartikelpopulation kodiert für ein Zielmolekül CRP, BNP, LDL und cfmDNA. Diese Zielmoleküle werden durch fluoreszenzmarkierte Antikörper oder DNA-Sonden nachgewiesen. Drei Mikropartikelpopulationen sind mit unabhängigen internen Kontrollen beladen, zwei Positivkontrollen (FISH, HPV72) und eine Negativkontrolle (SAv).

\* TBS-T mit 0,1 % Tween® 20

Alle beschichteten Mikropartikelpopulationen wurden zu gleichen Teilen zusammengefasst. Eine Suspension mit etwa 2.000 Mikropartikeln wurde mit der Immobilisierungslösung auf der Oberfläche der Durchflusszelle auf dem Mikrofluidikchip immobilisiert und über Nacht bei RT getrocknet. Die Multiwellplatte musste nicht vorbereitet werden.

#### 2.6.4 Immobilisierung von Mikropartikeln im Mikrofluidikchip

Zur Immobilisierung der Mikropartikel wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Die Trocknung, die Poly-L-Lysin Beschichtung und die Immobilisierungslösung der Firma Medipan GmbH.

##### 2.6.4.1 *Trocknung der Suspension*

Die zu immobilisierende Mikropartikelsuspension (10 µl) wurde auf die Durchflusszelle pipettiert und über Nacht der überschüssige Puffer weggetrocknet.

##### 2.6.4.2 *Immobilisierung mit Poly-L-Lysin*

Die Durchflusszelle des Mikrofluidikchips wurde mit 20 µl einer 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin (PLL) Lösung in Wasser für 1 h bei RT inkubiert. Das PLL wurde abgesaugt und 1 x mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 10 µl der zu immobilisierenden Mikropartikelsuspension auf die Durchflusszelle pipettiert und über Nacht der überschüssige Puffer weggetrocknet.

##### 2.6.4.3 *Verwendung der Immobilisierungslösung*

Die Durchflusszelle des Mikrofluidikchips wurde mit 20 µl der Immobilisierungslösung (Medipan GmbH) für 1 h bei RT beschichtet. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 1 x mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT getrocknet. Die zu immobilisierende Mikropartikelsuspension (10 µl) wurde auf die Durchflusszelle pipettiert und der überschüssige Puffer über Nacht weggetrocknet.



### 2.6.5 Durchführung des Proteinassays – Imitierung von Autoantikörpern

Für den Proteinnachweis im Mikrofluidikchip wurden die Reagenzienreservoirs mit TBS-T\* und 20 ng/µl des entsprechenden Antikörpers (Anti-CRP-Antikörper, Cy5 konjugiert; Anti-BNP-Antikörper, Cy5 konjugiert; Anti-BNP-Antikörper, Cy5 konjugiert, Tabelle 4) gefüllt. Zunächst wurde TBS-T\* durch die Durchflusszelle gepumpt, um eine feuchte Umgebung zu schaffen. Es folgte eine Ausgangsmessung der Mikropartikel mit der VideoScan-Technologie (167). Dann wurde die Antikörperlösung durch die Durchflusszelle gepumpt und 1 h lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Um den Überschuss an Antikörpern in der Durchflusszelle zu entfernen, wurden die Mikropartikel einmal mit TBS-T\* gewaschen, gefolgt von einer abschließenden Fluoreszenzmessung mit der VideoScan-Technologie. Für den Proteinnachweis in der Multiwellplatte wurde der Assay in der gleichen Reihenfolge wie im Chip durchgeführt. Allerdings wurde der Mikropartikelmix mit dem entsprechenden Antikörper 1 h bei RT und 1.200 rpm im Thermoschüttler inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T\* gewaschen. Ein Waschschrift bestand aus einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 10.000 rpm), dem Absaugen des Überstands und der anschließenden Zugabe von 200 µl TBS-T\*. Die Mikropartikel wurden dann auf eine Multiwellplatte übertragen und mit der VideoScan-Technologie gemessen. Für die Verdünnungsreihen der Biomarker wurde der Test mit verschiedenen Konzentrationen (0,2 ng/µl bis 100 ng/µl) des entsprechenden Antikörpers durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Biomarker in humanem Serum in einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 50 ng/µl gespiked und mit Hilfe der vorbereiteten Mikropartikel sowohl im Chipassay als auch in Multiwellplatten nachgewiesen.

### 2.6.6 Durchführung des DNA-Assays für cfmDNA

Die Reagenzienreservoirs des Mikrofluidikchips wurden mit TBS-T\*, cfmDNA (10 ng/µl) und der Nachweissonde für cfmDNA (50 nM, Cy5 konjugiert) gefüllt. Wie im vorangegangenen Unterabschnitt *Durchführung des Proteinassays – Imitierung von Autoantikörpern* beschrieben, wurde die Methode bis zum Schritt der Ausgangsmessung der Mikropartikel gleich durchgeführt. Die cfmDNA-Lösung wurde durch die Durchflusszelle gepumpt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Um den Überschuss an cfmDNA in der Durchflusszelle zu entfernen, wurden die Mikropartikel

\* TBS-T mit 0,1 % Tween® 20

einmal mit TBS-T\* gewaschen. Anschließend wurde die Lösung der cfmDNA-Nachweissonde durch die Durchflusszelle gepumpt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS-T\* wurde das Fluoreszenzsignal mittels VideoScan-Technologie gemessen. In der Multiwellplatte wurde der Assay in der gleichen Reihenfolge wie im Chip durchgeführt. Die Inkubationsschritte mit der zu detektierenden cfmDNA und cfmDNA Nachweissonde erfolgten für 1 h bei RT und 1.200 rpm im Thermoschüttler, unterbrochen von jeweils dreimaligem Waschen mit TBS-T\*. Die Mikropartikelsuspension wurde dann in eine Multiwellplatte überführt und mit der VideoScan-Technologie gemessen. Für Verdünnungsreihen wurde der Test mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 bis 100 ng/ $\mu$ L) der cfmDNA durchgeführt. Darüber hinaus wurde die cfmDNA in humanem Serum in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 50 ng/ $\mu$ L gespiked und mithilfe der vorbereiteten Mikropartikel im Chipassay sowie in der Multiwellplatte nachgewiesen.

### 2.6.7 Datenanalyse des Mikrofluidikchips

Die Bilder der Versuche wurden mit der VideoScan-Plattform aufgenommen und die Bilddaten mit der FastFluoScan-Software analysiert (Einzelheiten siehe Rödiger 2012 (167)). Der lineare Bereich der Fluoreszenzintensität wurde durch einen adaptiven Algorithmus bestimmt. Alle Rohdaten wurden mit der statistischen Programmierumgebung R (172) ausgewertet. Nichtlineare kinetische Kurvendaten wurden mit dem drc-Paket (173) angepasst und mit dem 95 %-Konfidenzintervall aufgetragen. Die biomolekulare Interaktion wird als refMFI (referenzierte Fluoreszenzintensität, für weitere Einzelheiten Rödiger 2012 (167)) angegeben. Die Präzisionsmedizin liefert eine große Menge an Daten, die die menschliche Fähigkeit, sie zu verstehen, übersteigt (174). Daher besteht ein zunehmender Bedarf an einer speziellen Software, die den Kern der Daten erfassen kann. Für diesen Bedarf wurde von Michał Burdukiewicz die grafische Benutzeroberfläche *Digilogger* als R-Paket entwickelt (175), welche die visuelle Darstellung der Daten erleichtert.

## 2.7 Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays

Die zu charakterisierenden hydrophoben Mikropartikel (Tabelle 1) wurden von der Firma PolyAn GmbH in Anlehnung an Kao et al. 2017 (176) hergestellt. Arbeiten, wie die Kontaktwinkelmessungen und Messungen am Flowzytometer wurden durch mich bei der PolyAn GmbH durchgeführt werden.

### 2.7.1 Charakterisierung der Mikropartikel

#### 2.7.1.1 *Stabilität der Mikropartikel in organischen Lösungsmitteln*

Um die Stabilität der Mikropartikel in organischen Lösungsmitteln (Ausnahme Wasser) zu analysieren, wurden diese in 200 µl verschiedener Lösungen (Wasser, Aceton, Aceton/Methanol 1:2, Aceton/Methanol 1:5, Chloroform, Chloroform/Methanol 1:2, Chloroform/Methanol 1:5 und Methanol) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mittels VideoScan-Technologie analysiert.

#### 2.7.1.2 *Verhalten in Puffersystemen und pH-abhängige Aggregationsneigung*

Die hydrophoben Mikropartikel wurden in 200 µl verschiedener, für den späteren Einsatz der Mikropartikel wichtiger Puffer (Tab. 22, Anhang) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend ihr Verhalten darin analysiert.

#### 2.7.1.3 *Mikropartikelgrößen und die Einordnung in Populationen*

Um die Größe der Mikropartikel, ihre Größenverteilung, ihre Fluoreszenzintensität und -verteilung sowie die Einordnung der Mikropartikel in Populationen vorzunehmen, wurden die Mikropartikel mit Hilfe der VideoScan-Technologie eingemessen und ihnen eine Pop-ID zugewiesen.

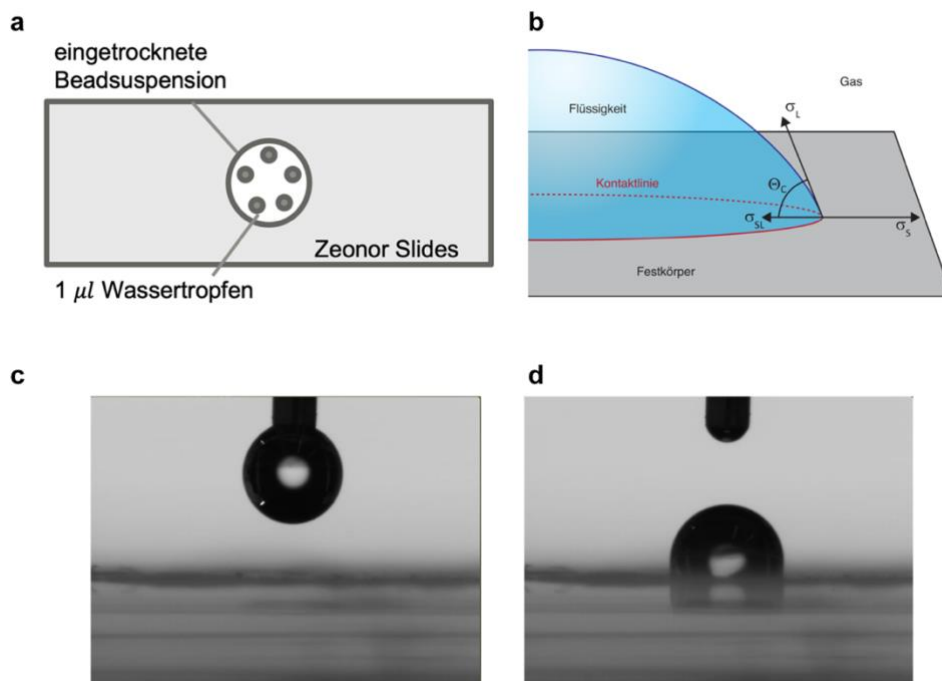
#### 2.7.1.4 *Bestimmung der Hydrophobizität der Mikropartikel*

Zur Bestimmung der Hydrophobizität und etwaiger Unterschiede in der Oberflächenmodifikation der Mikropartikel wurden sowohl mit Hilfe eines Kontaktwinkelmeters der Kontaktwinkel eines Wassertropfens zur

Mikropartikeloberfläche bestimmt als auch die Mikropartikeloberfläche mit CellBrite® Red angefärbt.

### Kontaktwinkelmessung der Mikropartikeloberfläche

Für die Kontaktwinkelmessung wurden gekoppelte und unbeladene transparente Mikropartikel (HVMP75-C3-C18, Tabelle 1, Abb. 8) auf einen hydrophoben Objektträger (Zeonor; 200 µl) getropft. Diese Mikropartikel wurden über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend wurde auf die getrocknete Mikropartikelsuspension über ein Kontaktwinkelmeter ein 1 µl großer Wassertropfen aufgesetzt und der Kontaktwinkel durch die Software automatisch bestimmt.



### **Abb. 8: Kontaktwinkelbestimmung der Mikropartikeloberfläche**

In der Abbildung ist die Durchführung der Kontaktwinkelmessung dargestellt. **a** Auf Zeonor-Slides der Firma PolyAn GmbH wurde eine Mikropartikelsuspension eingetrocknet und anschließend mittels Kontaktwinkelmeter mehrere Tropfen auf die Oberfläche getropft und der Kontaktwinkel gemessen. **b** Der Kontaktwinkel  $\theta_c$  wird über ein vektorielles Kräftegleichgewicht zwischen der Festkörperoberflächenenergie  $\sigma_s$ , der fest-flüssig-Grenzflächenenergie  $\sigma_{sl}$  und der Oberflächenspannung der Flüssigkeit gemessen. Dieses Gleichgewicht kann durch die Young-Gleichung  $\sigma_L \cos\theta_c = \sigma_s - \sigma_{sl}$  beschrieben werden. Der Kontaktwinkel wird mittels Bildverarbeitungssoftware SCA 20 berechnet (177,178). **c** 1 µl Wasser wird Software-gesteuert auf die Oberfläche der eingetrockneten Mikropartikelsuspension mittels Kanüle getropft. **d** Anhand des Verhaltens des Tropfens auf der Oberfläche kann der Kontaktwinkel bestimmt werden.

### Färbung der hydrophoben Mikropartikeloberfläche mit CellBrite® Red

Für die Färbung der hydrophoben Oberfläche der Mikropartikel wurden die Mikropartikelpopulationen HVMP75-C3-C18/HVMP81-C3-C18 genutzt. CellBrite® Red wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Mikropartikel angewendet (Verdünnungsreihe 1:100.000 bis 1:50 in TBS-T\*\* (0,01 % Tween® 20) für 3 h bei 28 °C und 1.200 rpm inkubiert und im Anschluss 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und anschließend die fluoreszenzkodierten Mikropartikel mittels VideoScan-Technologie analysiert. Die Auswertung der transparenten Mikropartikel erfolgte manuell über das CamMicControl.

#### *2.7.1.5 Immobilisierbarkeit der Mikropartikel auf verschiedenen Oberflächen*

Für die Immobilisierung von hydrophoben Mikropartikeln wurden verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurden verschiedene Multiwellplatten von unterschiedlichen Anbietern getestet und zum anderen wurden Protokolle ausprobiert, die zur Immobilisierung von carboxylierten Mikropartikeln verwendet werden, wie bspw. die Immobilisierungslösung der Firma Medipan GmbH, der UV-Kleber der Firma attomol GmbH oder die Immobilisierung über Poly-L-Lysin (PLL).

Die zu immobilisierende Mikropartikelsuspension (50 µl) wurde in die Wells der zu testenden Multiwellplatten (Tab. 23, Anhang) pipettiert und für 20 – 30 min absinken gelassen. Im Anschluss wurde die Platte gemessen, 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und erneut gemessen. Durch das Messen vor und nach dem Waschen konnte eine Recovery Rate errechnet werden.

### Verwendung einer Immobilisierungslösung

Die Wells einer Polystyrol-Multiwellplatte wurden für 1 h mit 50 µl der Immobilisierungslösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells mit 200 µl PBS gewaschen, die Platte getrocknet und bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert. Die zu immobilisierende Mikropartikelsuspension wurde in die Wells pipettiert und über Nacht bei RT im Dunkeln eingetrocknet. Im nächsten Schritt wurde Puffer auf die Mikropartikel gegeben und diese mittels VideoScan-Technologie gemessen. Anschließend wurde die Platte 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und erneut gemessen.

\*\* TBS-T mit 0,01% Tween® 20

### Immobilisierung mit UV-Kleber

Die Wells einer Polystyrol-Multiwellplatte wurden mit 10 µl des UV-Klebers benetzt. Im Anschluss wurden 50 µl der zu immobilisierenden Mikropartikelsuspension in das Well pipettiert und für 20 min absinken lassen. Die Platte mit den Mikropartikeln wurde dann in einer UV-Bestrahlungskammer mit 1,5 µS bestrahlt (je nach Kammer bis zu 3 min) und mittels VideoScan-Technologie gemessen. Im Anschluss wurde die Platte 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und erneut gemessen.

### Oberflächenbeschichtung mit Poly-L-Lysin

Die Wells einer Polystyrol-Multiwellplatte wurden mit 50 µl einer Poly-L-Lysin Lösung (80 µg/µl in PBS) über Nacht in einer feuchten Kammer beschichtet. Nach der Inkubation wurde die Platte 5 x mit PBS gewaschen und für 2 h bei 40 °C getrocknet. Die zu immobilisierende Mikropartikelsuspension wurde in die Platte pipettiert und die Mikropartikel für 20 bis 30 min absinken gelassen. Im Anschluss wurde die Platte gemessen, 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und erneut gemessen.

## 2.7.2 Kopplung relevanter Biomoleküle an die Mikropartikeloberfläche

### 2.7.2.1 *Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche*

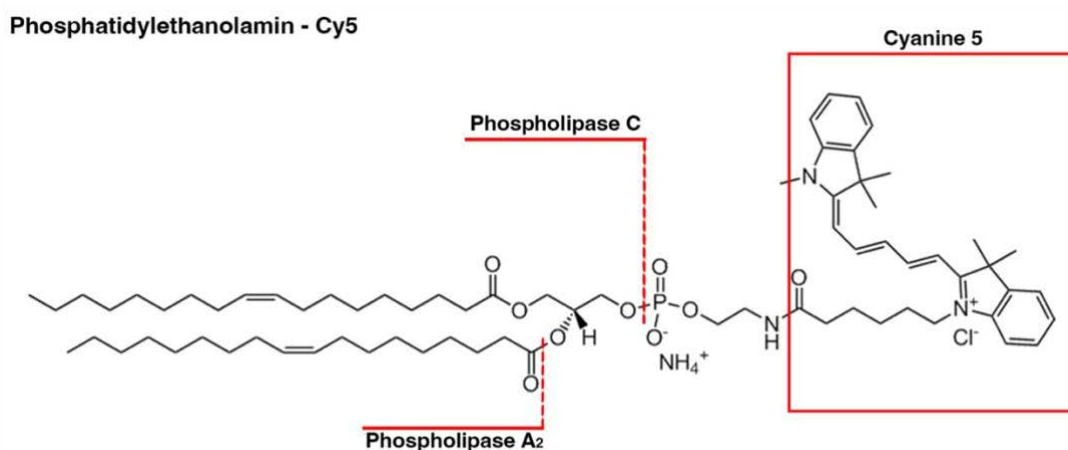
Unabhängig voneinander wurden fluoreszenzmarkierte Phospholipide CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 an die hydrophobe Oberfläche der Mikropartikel durch passive Adsorption gekoppelt. Pro Population wurden  $10^5$  Mikropartikel mit 200 µl 80 %igem Methanol gewaschen und anschließend mit einer Endkonzentration von 20 µg/µl (in 80 %igem Methanol) für 3 h bei 1.200 rpm und 28 °C inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte mit TBS-T\*\* für jeweils 1 min bei 13.000 rpm. Für die Verdünnungsreihen wurde die Kopplung mit verschiedenen Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten Phospholipide CL-Cy5 und PE-Cy5 (0,1 µg/µl bis 100 µg/µl) durchgeführt.

### 2.7.2.2 Kopplung unkonjugierter Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche

Unabhängig voneinander wurden die unkonjugierten Phospholipide CL, PS, PE, PC und PI an die hydrophobe Oberfläche der Mikropartikel durch passive Adsorption gekoppelt. Pro Population wurden  $10^5$  Mikropartikel mit 200  $\mu$ l 80 %igem Methanol gewaschen und anschließend bei einer Endkonzentration von 1 mg/mL (in 80 %igem Methanol) für 3 h bei 1.200 rpm und 28 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBS-T\*\* für jeweils 1 min bei 13.000 rpm. Anschließend wurden die gekoppelten Mikropartikel in 200  $\mu$ l TBS-T\*\* resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

### 2.7.3 Überprüfung der gerichteten Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide

Um die gerichtete Bindung der Phospholipide zu überprüfen, wurden Phospholipasen eingesetzt (Abb. 9), die die Phospholipide an verschiedenen Positionen hydrolisieren. Mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden gekoppelte Mikropartikel wurden jeweils mit 1 U einer Phospholipase (Phospholipase A<sub>2</sub> in TBS mit 20 mM CaCl<sub>2</sub> und Phospholipase C in TBS) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal der Mikropartikel wurde alle 40 Sekunden innerhalb 1 h über eine Kinetik mittels VideoScan-Technologie gemessen.



**Abb. 9: Schnittstellen der Phospholipasen am Beispiel von Phosphatidylethanolamin - (PE-Cy5)** Phospholipide bestehen aus einer Phosphatgruppe, einem Glyceringrundgerüst und unpolaren Kohlenwasserstoffketten. Sie können durch Phospholipasen an verschiedenen Positionen geschnitten werden. Die Phospholipase A<sub>2</sub> katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung der zweiten Fettsäurekette an der sn-2-Position. Die Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zum Glycingrundgerüst (179,180).

### 2.7.3.1 Präparation der hydrophoben Mikropartikel für STED-Aufnahmen

Für die Präparation der Mikropartikel im Mikroskop wurden 10 µl einer zu untersuchenden Mikropartikelsuspension mittig auf einen Objektträger getropft. Die Mikropartikel wurden für 10 min absinken gelassen und im Anschluss mit einem Tropfen Solid Mount und einem Deckgläschen gedeckelt und mit Nagellack versiegelt, damit es nicht zu Austrocknungen kommt. Aufnahmen dieser Mikropartikel wurden mittels *Stimulated Emission Depletion* (STED) erstellt.

### 2.7.4 Stabilität der Biomarker an der Mikropartikeloberfläche

Die stabile Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche wurde durch die Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen und Puffern bestimmt. Die mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel wurden bei 4 °C, -21 °C und RT gelagert. Die Lagerungspuffer bestanden aus Methanol, Isopropanol oder TBS-T<sup>\*\*</sup>. Die Lagerbedingungen Temperatur und Puffer wurden unabhängig voneinander bestimmt. Die Lagerung der Mikropartikel erstreckte sich über 4 Wochen mit jeweils einem Messpunkt pro Woche.

### 2.7.5 Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays für Anti-Phospholipid-Antikörper

Zur Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays der gekoppelten Mikropartikel wurden verschiedene Methoden verwendet.

#### 2.7.5.1 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper im DotBlot

Als Kontrollen für die Durchführung des Phospholipidnachweises aus humanem Serum wurde der DotBlot durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Membranen (Nitrozellulose und PVDF) verwendet. Jeweils 1 µl einer Phospholipidsuspension wurde auf die Membran aufgetropft, für 1 h getrocknet und im Anschluss mit 2,5 % BSA TBS geblockt. Humanes Serum wurde 1:40 in 2,5 % BSA TBS verdünnt und für 1,5 h bei RT auf dem Vortex-Shaker rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Blots 3 x mit TBS-T<sup>\*\*</sup> á 10 min gewaschen und mit dem spezifischen Sekundärantikörper



(Anti-IgG oder Anti-IgM konjugiert 1:100 in 2,5 % BSA TBS-T\*\*) für 1 h bei RT auf dem Vortex-Shaker rotierend inkubiert. Die Blots wurden nach der Inkubation 3 x mit TBS-T\*\* gewaschen und mit dem Chemilumineszenz Imager analysiert.

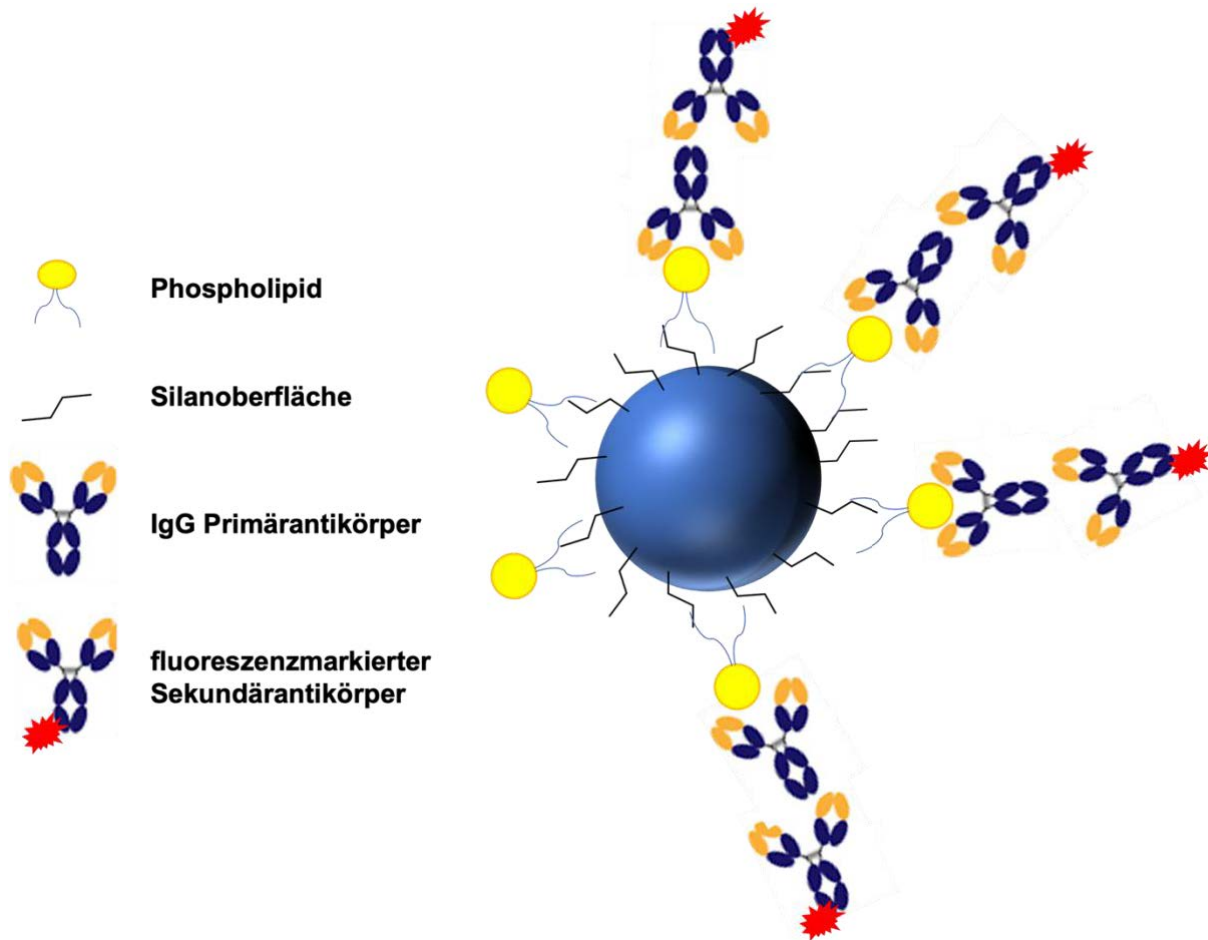
**Tab. 12: humane Seren**

Serum	Bezeichnung	Isoform IgG humanes Anti- Phospholipid	Isoform IgM humanes Anti- Phospholipid
S1	3991	positiv	-
S2	4624	positiv	-
S3	9528	positiv	-
S4	3992	-	positiv
S5	9526	-	positiv
S6	3632	-	-
S7	3636	-	-
S8	9524	-	-

Für den Membrannachweis des Lipoproteins  $\beta$ 2-GP1 wurde der DotBlot im Ablauf identisch durchgeführt. Zusätzlich wurden zu den eingesetzten Seren auch gereinigte Primärantikörper (1:100 in 2,5 % BSA TBS) verwendet.

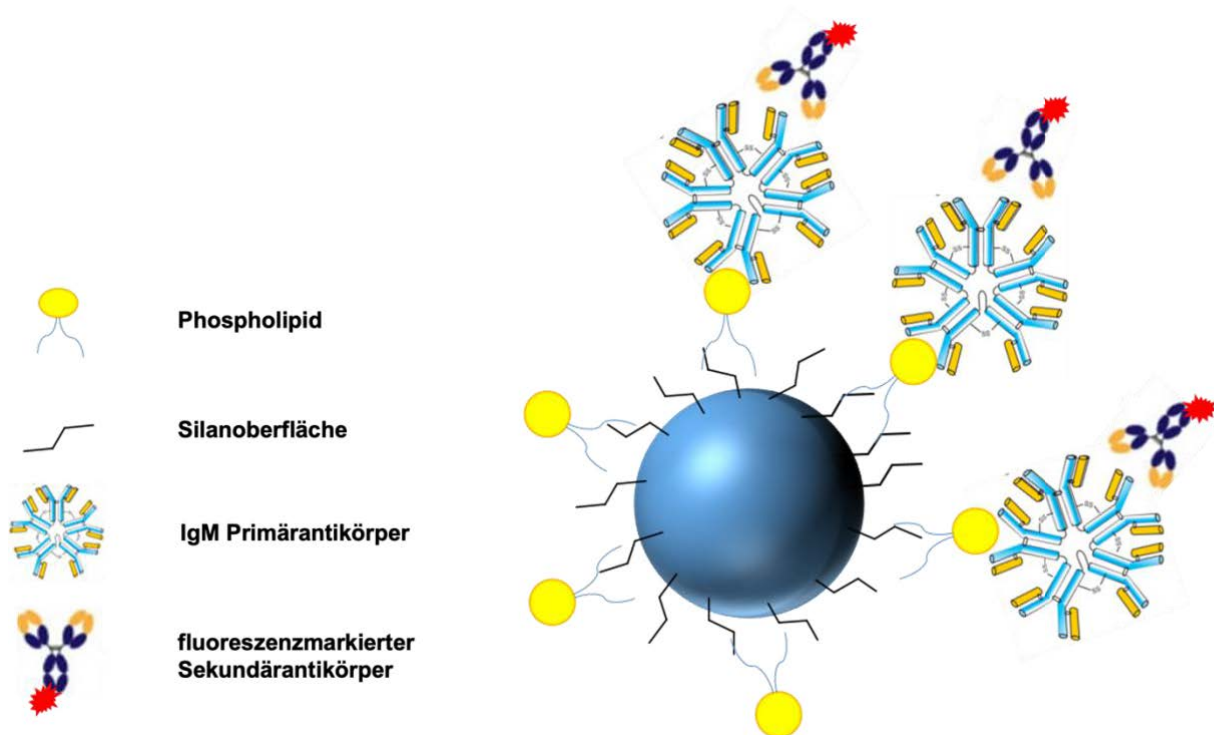
#### 2.7.5.2 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper in der VideoScan-Technologie

Die mit unkonjugierten Phospholipiden (CL, PS, PE, PC, PI) gekoppelten hydrophoben Mikropartikel wurden mit 1:40 verdünntem humanem Serum (in TBS-T\*\*, Tabelle 12) 1,5 h bei 28 °C und 1.200 rpm inkubiert und anschließend 3 x für jeweils 1 min bei 13.000 rpm mit TBS-T\*\* gewaschen. Anschließend wurden die mit Anti-Phospholipid-Antikörpern (aus Serum - Tabelle 12) gekoppelten Mikropartikel mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Anti-humanen-IgG (Abb. 10)/Anti-humanen-IgM (Abb. 11) - 1:100 - 7,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) für 1 h bei 1.200 rpm und 28 °C inkubiert und 3 x mit TBS-T\*\* für jeweils 1 min bei 13.000 rpm gewaschen. Das resultierende Fluoreszenzsignal wurde mit der VideoScan-Technologie gemessen.



**Abb. 10: Modell des Nachweises der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper am Mikropartikel**

An der durch Silane modifizierte, hydrophoben Mikropartikeloberfläche binden Phospholipide mit ihrem hydrophoben Teil, den Fettsäureketten. Der hydrophile Teil, der Kopf, ragt nach außen und kann somit von den Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern aus dem humanen Serum, über die Antigenbindungsstellen gebunden werden. Sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper weisen anschließend den gebundenen IgG-Primärantikörper über den Fc-Teil nach. Ein Fluoreszenzsignal kann mittels VideoScan-Technologie detektiert werden.



**Abb. 11: Modell des Nachweises der Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper am Mikropartikel**

An der durch Silane modifizierte, hydrophoben Mikropartikeloberfläche binden Phospholipide mit ihrem hydrophoben Teil, den Fettsäureketten. Der hydrophile Teil, der Kopf, ragt nach außen und kann somit von den Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern aus dem humanen Serum, über die Antigenbindungsstellen gebunden werden. Sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper weisen anschließend den gebundenen IgM-Primärantikörper über den  $Fc_{5\mu}$ -Teil nach. Ein Fluoreszenzsignal kann mittels VideoScan-Technologie detektiert werden.

### 2.7.5.3 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper in der Durchflusszytometrie

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurde der Assay zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern identisch zu Abschnitt *Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper in der VideoScan-Technologie* durchgeführt. Zur Messung im Durchflusszytometer wurden 1 ml Wasser in die Reaktionsgefäße vorgelegt und 10  $\mu$ l der Mikropartikelsuspension hinzugegeben. 250  $\mu$ l der Probe wurden in Probenröhrchen vorgelegt und 200  $\mu$ l mit einer Geschwindigkeit von 4  $\mu$ l/s mit den optischen Kanälen FL1 und FL6 gemessen. Der Überschuss an Probe wurde zur Vermeidung von Blasenbildung in den Kanälen verwendet. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Kanäle mit 200  $\mu$ l Sheath Fluid mit einer Geschwindigkeit von 8  $\mu$ l/s gewaschen.

## 2.7.6 Optimierungen zur Signalverstärkung

### 2.7.6.1 *Optimierung des Kopplungspuffers für die Bindung der Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche*

Um die optimalen Kopplungsbedingungen für Phospholipide herauszufinden, wurden verschiedene Puffer verwendet. Zum einen Puffer aus der Literatur zur Kopplung von Liposomen (Puffer 1-5) (164–166) und eine Alkoholreihe für Methanol und Ethanol (5, 10, 40, 60, 80 und 100 % in Wasser). Die Mikropartikel wurden wie in *Abschnitt Kopplung konjugierter und unkonjugierter Phospholipide*, gekoppelt.

### 2.7.6.2 *Optimierung des Waschpuffers für die Bindung der Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche*

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Waschpuffer wurden gekoppelte Mikropartikel mit unterschiedlichen Konzentrationen des Detergenz Tween® 20 (0,01 % und 0,05 %) und zwei verschiedenen Puffersystemen gewaschen (TBS und PBS).

### 2.7.6.3 *Einsetzen eines Blockierungspuffers zur Erhöhung der Spezifität beim Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper aus humanem Serum*

Zum Blocken der unspezifischen Bindungen an den Mikropartikeln wurde 2,5 % BSA in TBS eingesetzt. Die Kopplung der Mikropartikel mit Phospholipiden und die Durchführung des Assays wurde, bis auf den zusätzlichen Schritt des Blockens nach der Kopplung der Phospholipide, wie in den zuvor beschriebenen Abschnitten, durchgeführt. Das humane Serum und der Sekundärantikörper wurden in 2,5 % BSA TBS-T\*\* verdünnt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein - und DNA - basierten kardiovaskulären Biomarkern

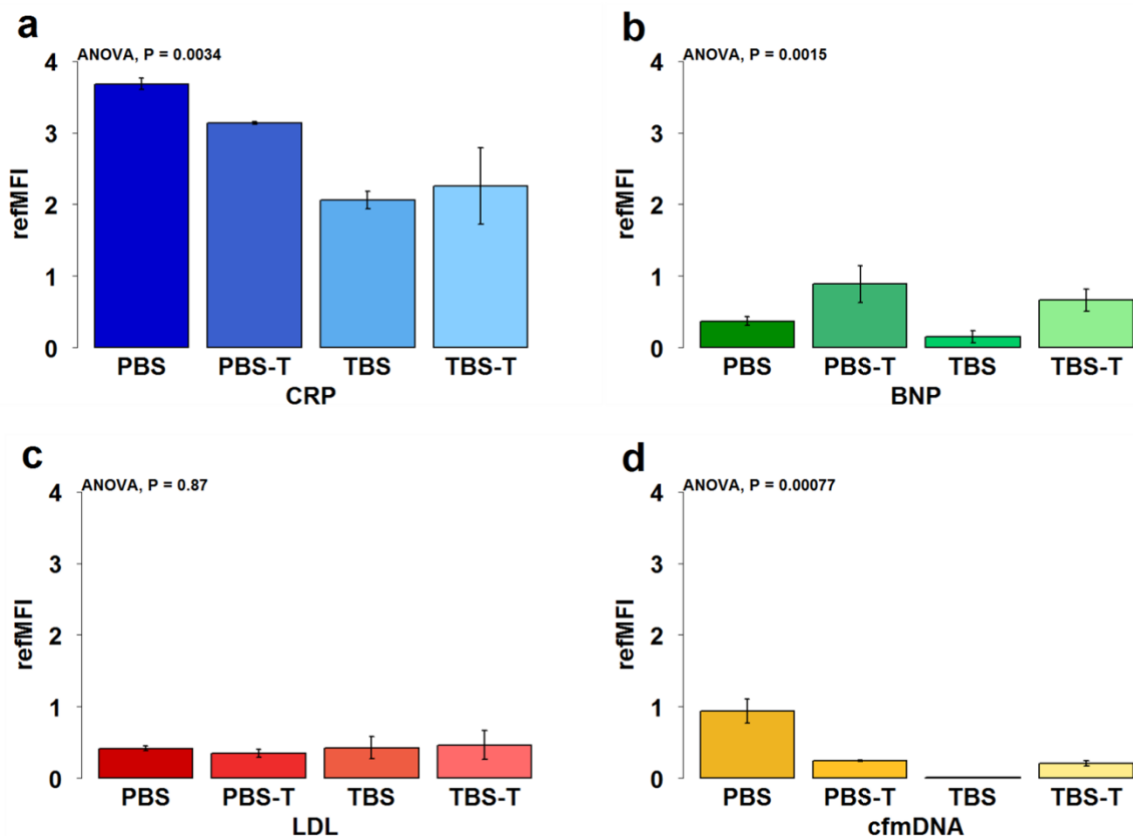
Ein Teilziel der Arbeit war es, ein mikropartikelbasiertes Chipsystem zum simultanen Nachweis von Protein- und DNA-basierten kardiovaskulären Biomarkern zu entwickeln. Traditionelle Methoden zum Nachweis von kardiovaskulären Biomarkern sind ELISA, PCR, Oberflächenplasmonresonanz (SPR), Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder Elektrochemilumineszenz (ECL) (21,181). Hier können jedoch entweder nur wenige Proben analysiert werden oder die Vorbereitung, Durchführung und der Aufbau dieser Methoden ist sehr zeitaufwändig und kostenintensiv (21,181). Wu et al. zeigt neue Methoden auf, wie den Einsatz von mikrofluidischen Systemen oder Sandwich-Assays an Mikropartikeln. Jedoch können auch hier nur Einzelnachweise, aber keine simultanen Nachweise von Protein oder genetisch basierten Biomarkern durchgeführt werden (21). Die Nachfrage nach kombinierten Nachweisverfahren steigt immer weiter an, denn Nachweise verschiedener Biomarkerklassen gleichzeitig liefern aussagekräftigere Aussagen und lassen die Ärzte präzisere Diagnosen stellen. Einzelne Biomarker können Hinweise auf verschiedene Krankheiten geben, sind jedoch nicht unbedingt spezifisch für eine Krankheit aussagekräftig (181). Für die Entwicklung eines kombinierten Nachweisassays wurden zwei verschiedene Plattformen verwendet. Zum einen eine 96-Well Greiner bio-one Polystyrol Platte mit flachem Boden und zum anderen ein Mikrofluidikchip (flex.Flow Slides) der Firma Bi.Flow Systems GmbH. Unter anderem sollten verschiedene Spezies von Biomarkern auf der Basis von Proteinen oder DNA gleichzeitig in eine Nachweisreaktion integriert werden. Die Auswahl der nachzuweisenden Biomarker anti-CRP, anti-LDL, anti-BNP und cfmDNA wurde aufgrund ihrer Bedeutung bzw. ihrer Neuheit in kardiovaskulären Erkrankungen getroffen (48,58–61).

Es wurden Experimente durchgeführt, um die Funktionalität des Modells zu demonstrieren, einschließlich der Optimierung des Systems durch ein geeignetes Puffersystem, eine geeignete Immobilisierungsmethode und die Analyse von Biomarkern in Humanserum.

### 3.1.1 Optimierung der Mikropartikelimmobilisierung und der Testumgebung

Optimale Assaybedingungen in einem Mikrofluidikchip beruhen neben bekannten Kriterien wie der Auswahl der Komponenten anhand von Assayleistung (umfasst Inkubationszeiten, Auswahl von richtigen Blockierungsreagenzien, Reduzierung von Kreuzreaktivitäten und unspezifischen Bindungen) und Assaykalibrierung (15,17,19,182,183), auch auf einer optimierten Immobilisierung der Mikropartikel und der Verwendung eines geeigneten Puffersystems. Immobilisierungen von Biomolekülen oder Assaykomponenten dienen zur Durchführung reproduzierbarer Messungen (19). Es gibt verschiedene Arten Komponenten zu immobilisieren, für kurze Zeit, lange Zeit oder permanent (184). Drei Optionen (Methode A, Immobilisierung durch Trocknung; Methode B, Poly-L-Lysin (PLL); Methode C, Immobilisierungslösung (Medipan GmbH)) für die permanente Immobilisierung von Mikropartikeln wurden getestet. Ausschlaggebend war der geringste Mikropartikelverlust nach allen Waschschritten. Die Immobilisierung der Mikropartikel durch Methode A zeigte mit 37 % den höchsten Verlust an Mikropartikeln. Methode B wies mit 6 % den geringsten Verlust an Mikropartikeln auf. Die Immobilisierung von Mikropartikeln mit PLL wurde in Rödiger et al 2012 (167) als die effektivste Methode beschrieben. Jedoch wurden unspezifische Bindungen der Oligonukleotide an die beschichtete Oberfläche beobachtet. Hierbei wurden Oligonukleotidsonden direkt an die beschichtete PLL-Platte gebunden und nicht an den zu bindenden Analyten. Dies führte zu falsch positiven Ergebnissen. Daher wurde die Methode B verworfen. Die Immobilisierung von Mikropartikeln mit Methode C führte zu einem Verlust von etwa 25 % der Mikropartikel. Bei der Verwendung dieser Methode wurden keine unspezifischen Bindungen der Oligonukleotide oder anderer Biomarker beobachtet. Aufgrund des geringeren Mikropartikelverlustes gegenüber Methode A wurde Methode C zur weiteren Immobilisierung der Mikropartikel auf der Chipoberfläche verwendet. Laut Rödiger et al. ist eine Recoveryrate von ~ 80% ausreichend (167). Eine weitere Voraussetzung für einen funktionierenden Assay sind optimale Pufferbedingungen. Falsch ausgewählte Puffer können durch Inhibierung von Antikörperbindungen zu falsch-negativen Ergebnissen führen (183). Gleichermaßen können falsche Pufferbedingungen auch durch Interaktion verschiedener Komponenten zu falsch-positiven Ergebnissen führen (183,185). Um dies herauszufinden wurden vier verschiedene Puffersysteme (PBS, PBS-T, TBS und TBS-T) verwendet. Anhand von Einzelmessungen aller Biomarker konnte ein geeignetes Puffersystem ausgewählt

werden (Abb. 12). Sowohl PBS-T als auch TBS-T erwiesen sich als geeignet für die weitere Verwendung. Bei der Verwendung von PBS und TBS ohne das Tensid Tween® 20 wurden nur geringe Signale erzielt oder die Mikropartikel aggregierten in der Durchflusszelle des Mikrofluidikchips. Auch Mahlawat und Goyal zeigen, dass durch die Verwendung von Tween® 20 Fluoreszenzsignale ansteigen können (186). Möglicherweise hält Tween® 20 die Reaktanden von der Wellwand entfernt, sodass diese ein besseres Bindungsverhalten zeigen. Außerdem ist Tween® 20 bekannt dafür Aggregationen in biologischen Systemen zu verhindern (187). Schließlich wurde TBS-T als Puffersystem für weitere Experimente ausgewählt, da die Verwendung phosphatgepufferter Systeme zu unspezifischen Bindungen führen kann (188), dies sollte von vornherein ausgeschlossen werden.



**Abb. 12: Pufferoptimierung für die Durchführung des simultanen Nachweises der Biomarker**  
 Alle Biomarker Anti-CRP (a), Anti-BNP (b), Anti-LDL (c) und cfmDNA (d) wurden in vier verschiedenen Puffern, PBS und TBS mit und ohne Tween® 20 (0,1 %), getestet, um optimale Pufferbedingungen für den simultanen Nachweis von Protein- und DNA- basierten Biomarkern zu schaffen.

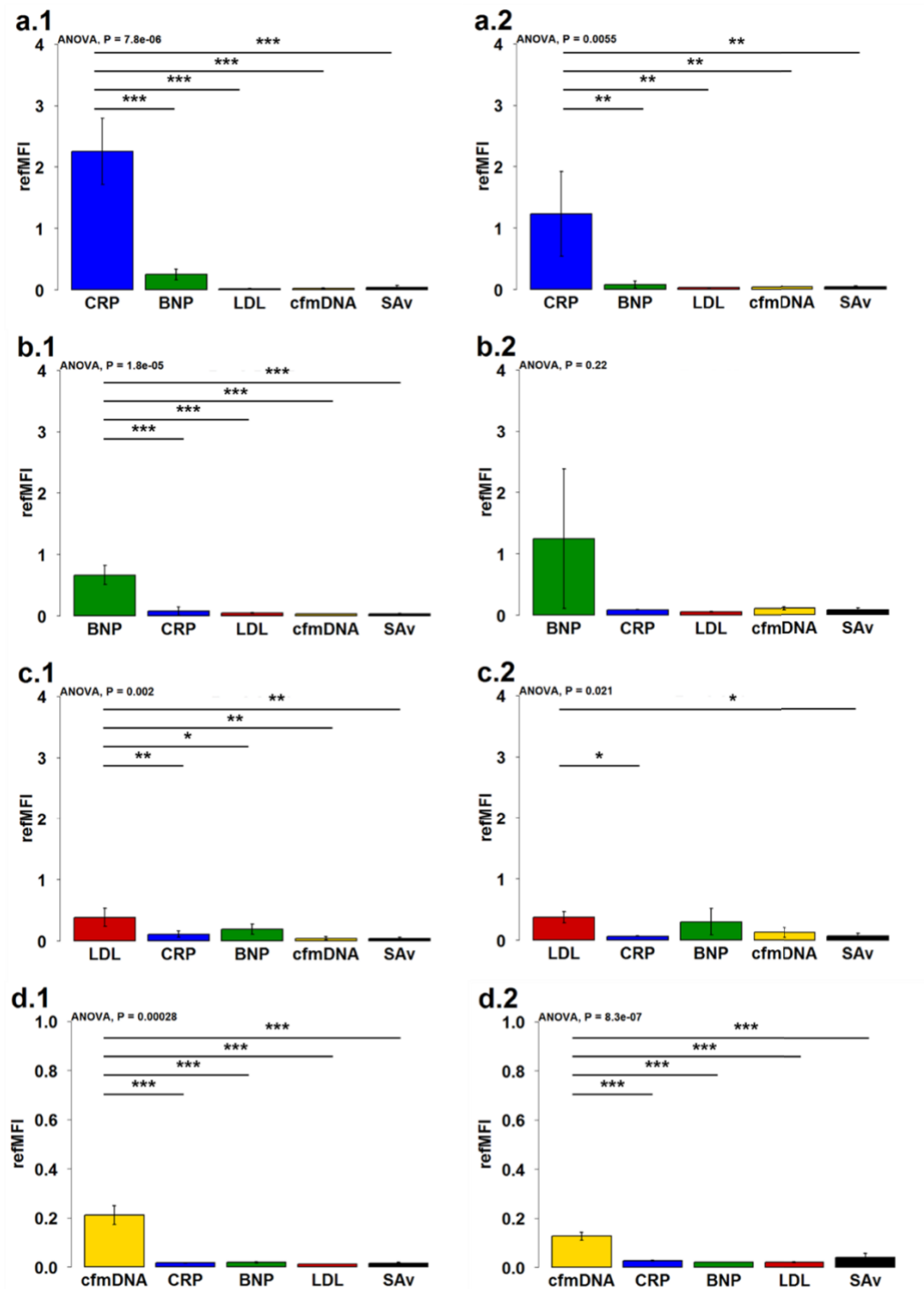
### 3.1.2 Nachweis von Biomarkern in einem mikropartikelbasierten Mikrofluidikchipsystem

Bei der Entwicklung eines Modellsystems für den gleichzeitigen Nachweis von Protein- und DNA-Biomarkern in einem mikropartikelbasierten Mikrofluidikchip wurden die Proteine CRP, BNP und LDL (Antigen) an entsprechende Mikropartikel gekoppelt und durch einen spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper (~Autoantikörper) nachgewiesen. Dieses System wurde zur Nachahmung von Autoantikörpern verwendet. Für den Nachweis des DNA-basierten Biomarkers wurde eine Fängersonde an eine Mikropartikelpopulation gekoppelt, die die cfmDNA einfängt und dann durch eine zweite fluoreszenzmarkierte Sonde nachgewiesen wird (Abb. 44). Die Validität eines neu entwickelten Assay gibt an, wie gut dieser auf die zu testenden Substanzen und sein Einsatzgebiet abgestimmt ist (189,190). Ein wichtiger Punkt, um eine genaue Aussage zur Validität des entwickelten Assays zu treffen ist die Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität (191). Um die Spezifität (Abb. 13) und Sensitivität (Abb. 14) der einzelnen Nachweismoleküle zu bestimmen, wurden alle Biomarker (Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL und cfmDNA) in Einzelreaktionen sowohl im Chip (Abb. 13a.1-d.1) als auch in der Multiwellplatte (Abb. 13a.2-d.2) nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung aus gleichen Teilen der gekoppelten Mikropartikelpopulationen (CO426-CO434, Beladung siehe Tab. 11) in entsprechenden Assays eingesetzt. Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL und cfmDNA waren in allen Einzelreaktionen im Chip spezifisch nachweisbar, aber sowohl der Anti-CRP-Antikörper als auch der Anti-LDL-Antikörper erkannten BNP unspezifisch. Ein möglicher Grund für die falsch-positiven Ergebnisse beim Einsatz der Anti-LDL- und Anti-CRP-Antikörper können Interaktionen zwischen den Komponenten sein, genauer gesagt Kreuzreaktionen (182,183,185). Alle eingesetzten Antikörper sind gegen humane Proteine gerichtet, wodurch es zu Interaktionen untereinander kommen kann. Ein Austausch der verwendeten Antikörper oder die Neujustierung der Assaykomponenten könnte das Auftreten der falsch-positiven Ergebnisse minimieren (19,182,183). Alle im Chipsystem erzielten Fluoreszenzwerte der nachzuweisenden Biomarker unterschieden sich signifikant (Signifikanzen angegeben als \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) von den Fluoreszenzwerten der Negativkontrollen/nicht nachzuweisenden Biomarker. Wohingegen die erzielten Fluoreszenzwerte des BNP-Nachweises aus der Multiwellplatte keine signifikanten Unterschiede im Fluoreszenzsignal zeigten. Die Standardabweichung ist aufgrund zu unterschiedlicher



Fluoreszenzwerte der Einzelmessungen zu hoch. Der Nachweis von kardiovaskulären Biomarkern in der Multiwellplatte ist spezifisch, mit Ausnahme des Nachweises von LDL, bei dem BNP durch den Anti-LDL-Antikörper nachgewiesen wurde und keinen signifikanten Signalunterschied zum nachgewiesenen LDL aufwies. Im Vergleich zur Messung in der Multiwellplatte werden mit einem Chipsystem um den Faktor von 1,9 für CRP und um den Faktor von 1,7 für cfmDNA höhere Ligandenwerte erzielt. Die Ligandenwerte für den Nachweis von LDL unterscheiden sich im Vergleich der beiden Methoden kaum, während BNP in der Multiwellplatte einen 1,7-fach höheren Ligandenwert erreichte, allerdings mit einer hohen Standardabweichung. Das geringe Signal beim Nachweis von Anti-LDL-Antikörpern muss nicht an der Antigen-Antikörper-Bindung oder an der zu geringen Anzahl an Antikörpern liegen. Möglicherweise wird das Lipoprotein LDL in der wässrigen Umgebung nicht richtig und in ausreichender Menge an die Mikropartikeloberfläche gebunden. Hier würden sich Mikropartikel mit einer anderen Oberfläche anbieten, wie z.B. hydrophobe Mikropartikel. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Sensitivität eines Tests ist die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Hierbei wird das Verhältnis zwischen dem Nutzsignale (Signal der Probe) und dem Rauschsignal (Signal der Negativkontrolle) gebildet. Die Formel zur Berechnung des SNR ist  $SNR = 10 \log_{10} \frac{Signal}{Hintergrundsignal}$  (192). Ergebnisse des Signal-Rausch-Verhältnisses können in Dezibel (dB) angegeben werden (192). Betrachtet man nun die errechneten SNRs so zeigt das Chipsystem ein sensitiveres Ergebnis, da alle Signale einen höheren dB-Wert aufwiesen. CRP (Chip, 16,96 dB; Platte, 15,67 dB), BNP (Chip, 13,84 dB; Platte, 12,04 dB), LDL (Chip, 13,19 dB; Platte, 7,93 dB), und für cfmDNA (Chip, 11,46 dB; Platte, 5,85 dB). Hier zeigt sich ein Vorteil im geringeren Hintergrundsignal des Chips im Vergleich zur Multiwellplatte. Je höher der SNR-Wert desto niedriger das Hintergrundsignal. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, sollte das Signal-Rausch-Verhältnis so hoch wie möglich sein (193). Anhand von Verdünnungsreihen wurde die Spezifität jedes einzelnen Detektionsmoleküls sowohl im Chip als auch in der Multiwellplatte getestet (Abb. 13). Die Nachweisgrenze für den Anti-CRP-Antikörper beträgt 0,2 ng/µl (refMFI 0,137) im Chip und 0,5 ng/µl (refMFI 0,1) in der Multiwellplatte. Dies entspricht einer Nachweisgrenze, die um den Faktor 25 (Chip) bzw. 10 (Platte) niedriger ist als die Werte des Herstellers (Biozol, 5 ng/µl). Die Nachweisgrenzen für BNP und LDL im Chip betragen jeweils 3,33 ng/µl (BNP-refMFI 0,134, LDL- refMFI 0,14) und 1 ng/µl in der Platte (BNP-refMFI 0,5, LDL-refMFI 0,163), was 1,5-mal (Chip) bzw. 5-mal

niedriger ist als vom Hersteller angegeben (Biozol, 5 ng/μl). Die angegebene Nachweisgrenze des Herstellers Biozol bezieht sich auf die maximale Verdünnung, in der der Antikörper eingesetzt werden soll. Mit diesem Wert garantiert der Hersteller noch eine Signalgebung. Die Nachweisgrenze für den DNA-basierten Biomarker cfmDNA beträgt 0,5 ng/μl (refMFI 0,09) im Chip und 0,1 ng/μl (refMFI 0,09) in der Multiwellplatte. Die Verdünnungsreihe der cfmDNA wurde nur als Beispiel durchgeführt und ist daher im Anhang dargestellt (Abb. 45). Im Vergleich zu den vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenzen kann ein mikropartikelbasiertes System mit höheren Antikörperverdünnungen sowohl im Chip als auch in der Multiwellplatte eingesetzt werden. Daher scheint das Testsystem gegenüber herkömmlichen Nachweismethoden wie ELISA, Western Blot oder Immunfluoreszenz ein vielversprechendes Werkzeug für Autoantikörpertests gegen CRP, BNP und LDL zu sein (194).

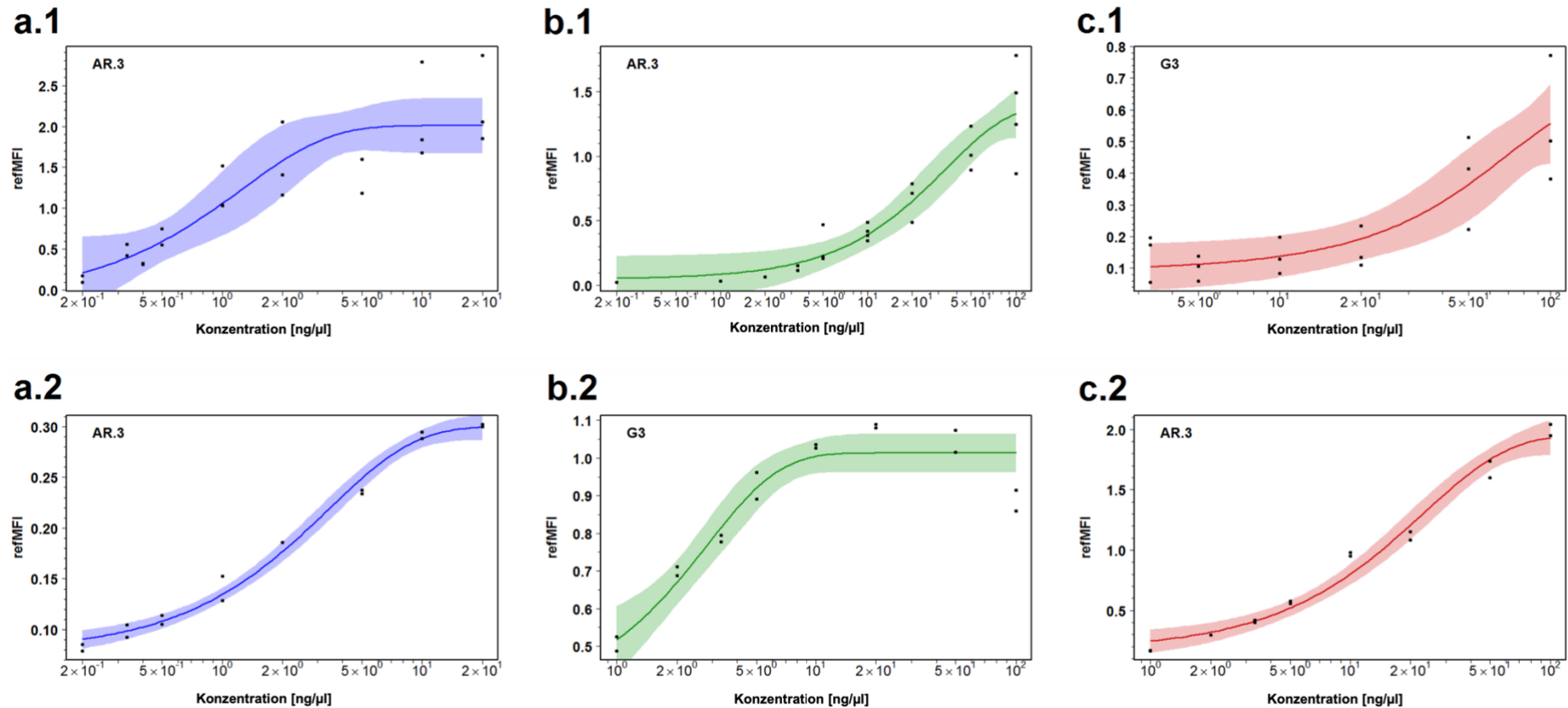


**Abb. 13: Einzelmessungen zum Nachweis von CRP, LDL, BNP und cfmDNA**

Die Spezifität der einzelnen Biomarker Anti-CRP (a), Anti-BNP (b), Anti-LDL (c) und cfmDNA (d) wurde in Einzelmessungen im Chipsystem (a.1 - d.1) sowie in einer Multiwellplatte (a.2 - d.2) bestimmt. Es wurde ein Mikropartikelmix aller gekoppelten Mikropartikelpopulationen verwendet und mit dem jeweiligen Biomarker inkubiert. Alle Ergebnisse sind mit Signifikanzen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) in der Abbildung dargestellt.

Weiterhin wurden die Biomarker simultan in einer Verdünnungsreihe nachgewiesen (Abb. 46, Anhang). Dabei zeigte sich, dass die Werte im Chip bei der simultanen Messung für Anti-CRP (simultan, refMFI 1,32; separat, refMFI 0,65) und Anti-BNP (simultan, refMFI 0,36; separat, refMFI 0,13) etwa dreifach so hoch sind wie bei den Einzelmessungen, während die Werte für Anti-LDL sowohl bei der Einzelmessung als auch bei der simultanen Messung nahezu identisch sind (simultan, refMFI 0,14; separat, refMFI 0,14). Auch hier könnte eine falsche Kopplungsumgebung für LDL der Grund sein. Die in der Multiwellplatte erhaltenen Werte zeigten keine Unterschiede im Vergleich der beiden Methoden, Anti-CRP (simultan, 0,19; separat, refMFI 0,1), Anti-BNP (simultan, refMFI 0,82; separat, refMFI 0,78) und Anti-LDL (simultan, refMFI 0,18; separat, refMFI 0,16). Die höheren Fluoreszenzwerte im Mikrofluidikchip könnten zum einen aufgrund der geringeren Raumkapazität im Vergleich zur Multiwellplatte, als auch aufgrund der mobilen Phase gegeben sein. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich spezifische Komponenten wie Antigen und Antikörper begegnen ist höher (195). Im Labor werden Assays unter optimalen Bedingungen entwickelt, jedoch entsprechen diese Bedingungen meist nicht der Realität bei der Anwendung von Patientenproben in der Diagnostik (196). Bei der Verwendung von humanem Serum kann es entweder zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, in dem Komponenten des Serums andere Assayskomponenten, wie Antikörper inhibieren können. Zum anderen kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, in dem eine falsche Interaktion zwischen den einzelnen Assayskomponenten stattfindet (183).

Um die Funktionalität des Assays unter nicht optimalen Bedingungen zu testen, wurde Humanserum mit Antikörpern gegen die Proteine CRP, BNP, LDL und Fängersonden gegen cfmDNA versetzt. Alle Biomarker konnten auf den jeweiligen Mikropartikel ohne unspezifische Bindung nachgewiesen werden. Auch hier wurden Unterschiede im Fluoreszenzsignal zwischen dem Chipsystem und der Multiwellplatte festgestellt. Die zuvor gezeigten Ergebnisse unter optimalen Pufferbedingungen konnten mit Humanserum bestätigt werden (Abb. 12). Trotz des Einsatzes von humanem Serum, kam es im Vergleich zu anderen Ergebnissen zu keinen zusätzlichen unspezifischen Bindungen.



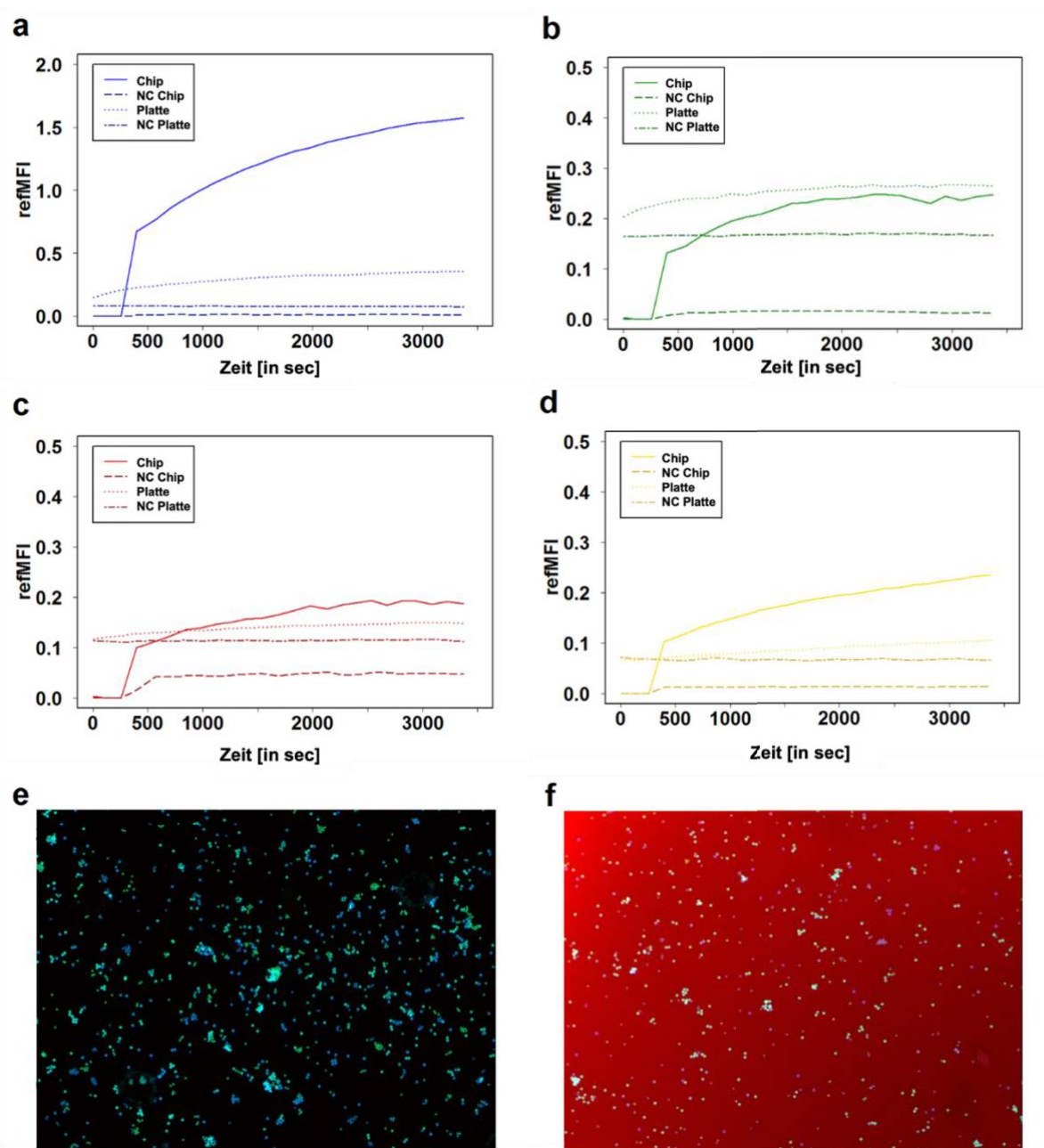
**Abb. 14: Verdünnungsreihen der Biomarker CRP, BNP und LDL**

Die Empfindlichkeit aller Nachweismoleküle wurde durch Verdünnungsreihen im Chip (a.1 - c.1) und in der Multiwellplatte (a.2 - c.2) bestimmt. Es wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen von 0,2 ng/μl bis 100 ng/μl verwendet. Die Darstellung der Kurven (95 % Konfidenzintervall) erfolgte mit den statistischen Modellen Gompertz (G3) und asymptotische Regression (AR.3).

### 3.1.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit

Kinetikexperimente dienen dazu, die Dynamik in jedem biologischen System zu charakterisieren. Dabei wird die Interaktion zwischen den Komponenten analysiert und die Frage geklärt ab wann und wie schnell Komponenten miteinander reagieren (197). Hier diente die Kinetik zur Dokumentation des zeitlichen Verlaufs des Signalanstiegs des Assays (Abb. 15). Die Fluoreszenzintensität der Mikropartikel wurde über einen Zeitraum von 1 h im Abstand von 3 min gemessen. Für den Chip wurde eine erste Messung durchgeführt, bevor das Detektionsmolekül durch die Kapillare des Chips gepumpt wurde. Nach einer Pumpzeit von 400 s wurde die Messung der Fluoreszenzintensität wiederholt. Im Anschluss wurde der Chip jeweils alle 3 min bis zum Ende der Inkubationszeit von 1 h gemessen. Bei allen Einzelnachweisen der Biomarker wurde nach jeweils 400 s etwa die Hälfte der maximalen Fluoreszenzintensität erreicht und es war ein zeitabhängiger Signalanstieg zu beobachten. Der Nachweis von Anti-CRP erreichte nach 1 h Inkubation eine maximale Fluoreszenzintensität von refMFI 1,57, Anti-BNP von refMFI 0,24, Anti-LDL von refMFI 1,96 und cfmDNA von refMFI 0,23. Die Fluoreszenzintensität der Mikropartikel in der Multiwellplatte wurde ausgehend vom Nullwert in 3 min Intervallen über einen Zeitraum von 1 h gemessen. Im Vergleich zu den Messungen im Chip wird hier kein Anfangswert von Null erreicht, was auf ein hohes Hintergrundsignal und einen niedrigen SNR hinweist. Auch die Zunahme der Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit ist nicht sichtbar. Maximale Fluoreszenzsignale für die Biomarker lagen bei Anti-CRP refMFI 0,37, Anti-BNP refMFI 0,26, Anti-LDL refMFI 0,14 und für cfmDNA refMFI 0,1. Das hohe Hintergrundsignal könnte durch statisches Waschen (Zugabe des Waschpuffers und kurzes Vortexen) verursacht worden sein. Möglicherweise wurden nicht alle Mikropartikel mit Waschpuffer benetzt oder umschlossen. Mehrmaliges und sorgfältiges Waschen zwischen einzelnen Inkubationsschritten ist für die Signalausbeute von essenzieller Bedeutung (198). Bei der Verwendung des mikrofluidischen Chips besteht eine mobile Phase und der Waschpuffer wird durch das kontinuierliche Pumpen an allen Mikropartikeln vorbeigeführt. Die geringeren Fluoreszenzwerte bei der Durchführung des Assays in der Platte können aufgrund der Reduzierung der Reaktanden an der Mikropartikeloberfläche und der damit verbundenen Diffusionsbegrenzung entstanden sein (199). Die Mikropartikel werden zwar durch einen Schüttler in Bewegung gehalten, jedoch kann es sein, dass die

Fängerkomponenten nicht in die Nähe der Antigene/DNA kommen und somit ein geringeres Signal an der Mikropartikeloberfläche entsteht.



**Abb. 15: Vergleich Multiwellplatte und Mikrofluidikchip**

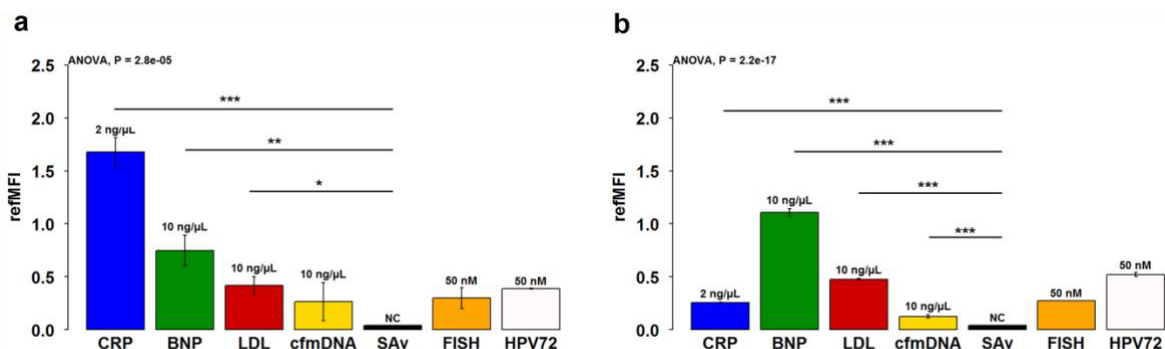
Zeitabhängiger Nachweis der Biomarker Anti-CRP (a), Anti-BNP (b), Anti-LDL (c) und cfDNA (d) im Vergleich im Mikrofluidikchip und in der Multiwellplatte. Der Bereich der Chipmessung von 0 bis 400 Sekunden zeigt die Injektion der Testkomponenten in die Durchflusszelle an. Die während der Messung aufgenommenen Bilder zeigen die Durchflusszelle des (e) Chips sowie (f) der Multiwellplatte. Die rote Färbung in Abbildung f stellt das hohe Hintergrundsignal in der Multiwellplatte dar.

### 3.1.4 Simultaner Nachweis von Protein- und DNA-basierten Biomarkern in einem Mikrofluidikchip

Um eine schnelle und präzise Diagnose zu gewährleisten, müssen mehrere Biomarker gleichzeitig in einer Probe nachgewiesen werden können (14). Darüber hinaus ist es von Vorteil, den Nachweis von zwei verschiedenen Molekülklassen (Protein und DNA) zu vereinen, um die Vielfalt der Biomarker zu erweitern und Probenmaterial zu sparen (200). Der kombinierte Nachweis von Protein und genetisch basierten Biomarkern führt in der Medizin zu einer zeitigeren und damit verbundenen sensitiveren und spezifischeren Krankheitsdiagnose. Des Weiteren kann durch mehrere Biomarker gleichzeitig ein Krankheitsstatus erstellt und das Ansprechen der Therapie dokumentiert werden (201). Um erfolgreich einen Multiplexassay mit verschiedenen Molekülklassen entwickeln zu können, muss die Assaykonfiguration genauesten validiert sein. Alle Einzelkomponenten müssen aufeinander abgestimmt sein, um so Messungengenauigkeiten zu minimieren (19). Neben den Vorteilen des Multiplexens wie Effektivität bei den Kosten und beim Einsatz von Probenmaterial im Labor und der schnellen Analyse (202), gibt es aber auch Probleme, die auftreten können. Dazu zählen, wie bereits in anderen Abschnitten erwähnt, Kreuzreaktivitäten, die zu falsch-positiven Ergebnissen und unspezifischen Bindungen führen können. Je mehr Komponenten in einem Assay vorhanden sind, desto häufiger kann es zu Komplikationen kommen. Ein weiterer Punkt ist das Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen durch inhibierende Komponenten in Puffern oder Seren. Außerdem kann die noch in Einzelmessungen erreichte Sensitivität und Spezifität in einem multiplexen Ansatz verringert werden (182,183,185). Alle zuvor einzeln getesteten Biomarker (Antikörper Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL und cfmDNA) sowie die zusätzlichen DNA-Kontrollmoleküle HPV72 und EUB338 (FISH) wurden gleichzeitig im Chip und in einer Multiwellplatte nachgewiesen (Abb. 16). Bei den DNA-Kontrollmolekülen handelt es sich um interne Kontrollsysteme zum Abgleich der Funktionalität des Assays. Der gleichzeitige Nachweis der Biomarker bestätigt die Tendenz der Ergebnisse der Einzelnachweise (Abb. 13) sowohl aus dem Chip als auch aus der Multiwellplatte. Mit Anti-CRP-Antikörpern wird das Protein CRP mit einem 6,5-fach höheren Fluoreszenzsignal im Chip als in der Multiwellplatte nachgewiesen. Anti-BNP weist das Protein in der Multiwellplatte mit einem 1,6-fach höheren Fluoreszenzsignal als im Chip nach. Der Nachweis von LDL erzielt mit beiden Methoden nahezu identische Ergebnisse. Die cfmDNA wird über die Nachweissonde im Chip mit einem doppelt so



hohen Fluoreszenzsignal nachgewiesen wie in der Multiwellplatte. Die Ergebnisse für Anti-BNP, Anti-LDL und cfmdDNA sind im direkten Vergleich zu den Einzelmessungen der Biomarker nahezu identisch. Man kann sagen, dass der Nachweis einzelner Biomoleküle nicht durch den gleichzeitigen Nachweis von sechs verschiedenen Molekülen in einer Kavität beeinträchtigt wird, wie auch in Abb. 55 (Anhang) zu sehen ist. Eine Frage wird aufgeworfen, ob ein verbessertes Bindungsverhalten aufgrund der vorherrschenden Konkurrenz der einzelnen Moleküle sowie die hohe Bindungsaffinität von Antikörpern an das spezifische Antigen und DNA an die DNA mögliche Gründe für ein höheres Fluoreszenzsignal sein können. Die Bindungsaffinität zu Störeffekten ist geringer als zum spezifischen Molekül, dadurch kann es beim Einsatz von komplexeren Lösungen zu höheren Signalen kommen (203). Mit dem hier gezeigten Chipsystem ist es möglich vier verschiedene kardiovaskuläre Biomarker gleichzeitig in einer Reaktion nachzuweisen. Dies ist im Gegensatz zu anderen wie *Yin et al.* mit drei gleichzeitig nachgewiesenen proteinbasierten Biomarkern ein höherer Multiplexgrad (204).



**Abb. 16: Simultaner Nachweis der Biomarker im Mikrofluidikchip**

Der gleichzeitige Nachweis der Biomarker CRP, BNP, LDL und cfmdDNA in einem Chip (a) und in der Multiwellplatte (b) wurde durch die DNA-basierten Nachweismoleküle und internen Kontrollen EUB338 (FISH) und HPV72 ergänzt. Alle Ergebnisse sind mit Signifikanzen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) in der Abbildung dargestellt.

### 3.1.5 Vergleich des Mikrofluidikchips und einer Multiwellplatte

Beim Vergleich des Nachweises von Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL und cfmdDNA im mikropartikelbasierten Mikrofluidikchip und in der Multiwellplatte zeigt die Verwendung des Chips mehr Vorteile als die Multiwellplatte. Im Chip werden geringere Volumina verwendet, so dass Patientenmaterial eingespart werden kann. Der Chip ist vollständig automatisiert (z. B. reproduzierbare Volumenströme) und beseitigt menschliche

Fehler. Außerdem werden im Chip trotz weniger Waschschriffe geringere Hintergrundsignale als in der Multiwellplatte beobachtet. Der geringere Hintergrund ist darauf zurückzuführen, dass das Fluoreszenzsummensignal im Chip (300 µm Kammerhöhe) geringer ist als in der Multiwellplatte (2.000 µm Flüssigkeitssäule). Die Kinetik zeigte, dass etwa 50 % der maximalen Fluoreszenzintensität nach einer Inkubationszeit von 7 Minuten erreicht wird. Die Signale in der Multiwellplatte benötigten 1 h. Im Laboralltag hat der Mikrofluidikchip einen Nachteil in Bezug auf Kosten und Handhabung. Der Chip kann im Vergleich zur Multiwellplatte nur einmal verwendet werden. Die Multiwellplatte hingegen hat die Möglichkeit 96 unterschiedliche Reaktionen ablaufen zu lassen. Zum Zusammenbau des Chips werden mehrere manuelle Vorbereitungsschritte benötigt, die bei der Multiwellplatte hingegen nicht benötigt werden. Beide Faktoren können jedoch im späteren Hochdurchsatzverfahren minimiert werden. Denn die mikrofluidischen Chips sind in einem größeren Maßstab kostengünstiger. Auch der Aufwand bei den Vorbereitungsschritten kann durch einen Dispenser und das automatische Befüllen der Chips reduziert werden. Ein Vergleich zwischen Chip und Multiwellplatte findet sich in Tabelle 13. Ein weiteres mikrofluidisches Detektionssystem zum multiplexen Nachweis ist von Yin *et al.* aus dem Jahr 2021. Hier werden selbstdesignte Mikrofluidikchips benutzt, auf denen kardiovaskuläre Biomarker immobilisiert sind. Der Nachweis erfolgt durch ein spezifisches Antikörpersystem und es können drei proteinbasierte Biomarker gleichzeitig innerhalb von 15 min detektiert werden (204). Im direkten Vergleich beider mikrofluidischer Systeme kann festgestellt werden, dass unser entwickeltes Nachweisverfahren durch in Theorie 11 weitere Biomarker ergänzt werden kann. Wohingegen der entwickelte Mikrofluidikchip von Yin *et al.* auf einen bestimmten Platz (hier 9 Spots) begrenzt ist. Diese 9 Spots werden für Dreifachbestimmungen genutzt (204). Desto mehr Biomarker in den Nachweis integriert werden sollen, desto größer müsste der Chip werden. Somit ergibt sich auch hier, aufgrund der Verwendung von Mikropartikeln, für unseren entwickelten Nachweis ein Vorteil gegenüber anderen Systemen. Mani *et al.* zeigen, dass die Entwicklungen von multiplexen Nachweisverfahren in den letzten Jahren vorangeschritten sind. Die Tendenz der Multiplexassays führt hin zu einfachen und schnell durchführbaren Tests wie Lateral Flow Assays und weg von Blutproben. Es wird kein geschultes Personal benötigt und erste Ergebnisse können direkt patientennah erzielt werden und benötigen kaum Zeit (205).

**Tab. 13: Vergleich Mikrofluidikchip und Multiwellplatte**

Mikrofluidikchip		Multiwellplatte	
Vorteile	Nachteile	Vorteile	Nachteile
geringes Hintergrundsignal	teuer (kleiner Maßstab)	billig	hohes Hintergrundsignal
schnelle Reaktion	zeitaufwändige Vorbereitung (nicht automatisiert)	hoher Durchsatz	viele (manuelle) Waschschrte
kleine Reaktionsvolumen	geringer Durchsatz (zeitaufwändiger)	schnelle Vorbereitung	
wenige Waschschrte			
hohes Oberflächen-Volumen Verhältnis			
erhöhte Sensitivität			

### 3.1.6 Schlussfolgerungen

Ein Modellsystem für den gleichzeitigen Nachweis von Protein- und DNA-basierten kardiovaskulären Biomarkern ist erfolgreich entwickelt worden. Dieses System kann z. B. für den Nachweis von Autoantikörpern sowie für die Bestimmung von Antikörpertitern verwendet werden. Der Nachweis von Biomarkern in einem mikrofluidischen Mikropartikelchip hat Vorteile gegenüber Messungen im Multiwellformat, wie geringe Hintergrundsignale, kleine Reaktionsvolumina und eine schnellere Reaktion. Bisher wurde kein Blockierungsschritt für die Reduktion unspezifischer Bindungen im Chip, wie sie von anderen beschrieben wurde (59), eingesetzt. Aufgrund seiner einfachen Struktur ist das System leicht zusammenzubauen bzw. abzuwandeln und kann daher für neue Tests angepasst werden. Für das Auslesen der Bilddaten wurde die FastFluoScan-Software der VideoScan-Technologie verwendet. Alternative Auslesemethoden stellen Open-Source-Bioimage-Informatik-Softwarepaket (206) und smartphonebasierte Systeme (200) dar. Um das System besser nutzbar zu machen, müssen weitere Optimierungen vorgenommen werden. Dazu gehören die Verbesserung der Reproduzierbarkeit der cfDNA-Detektion und die Reduzierung der Gesamtkosten eines Chips (einschließlich Mikropartikel, Biomarker und Detektionsmoleküle). Außerdem könnten für weitere Experimente ein Sekundärantikörper oder Aptamere (207) zur Signalverstärkung in das System integriert werden. Das System sollte mit weiteren Patientenprobenmaterial validiert werden. Weitere Biomarker sollten in das System integriert werden, da die verwendete Technologie es theoretisch erlaubt, bis zu 18 verschiedene Mikropartikelpopulationen gleichzeitig zu verwenden.

### 3.2 Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays

Lipide und lipidähnliche Strukturen können aufgrund ihrer unpolaren Beschaffenheit und ihrer Hydrophobizität häufig nur in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Chloroform oder Ethanol gelöst werden (74,208). Die im ersten Teil der Arbeit verwendeten carboxylierten Mikropartikel sind weder in organischen Lösungsmitteln stabil, noch weisen sie aufgrund ihrer carboxylierten Oberfläche eine hydrophobe Struktur für die Bindung von Lipiden auf (209–211). Infolge ihrer genannten Eigenschaften können diese carboxylierten Mikropartikel nicht für die Entwicklung von Lipidassays eingesetzt werden. Für dieses Anwendungsgebiet werden hydrophobe, lösungsmittelstabile (in organischen Lösungsmitteln) Mikropartikel benötigt. Hydrophobe Mikropartikel werden auf vielen Gebieten der Diagnostik, Lebensmittelindustrie oder Wasseraufreinigung eingesetzt (212–215). Der Einsatz erfolgt meist noch in Verbindung verschiedenster Chromatographietechniken, in denen es keine Möglichkeit zur automatisierten Messung und Analyse gibt (83,100). Unter Verwendung anderer Nachweismethoden wie ELISA oder Streifentests können Lipide nachgewiesen werden (104–108,216). Viele dieser Methoden ermöglichen es nicht, mehrere Lipide gleichzeitig aus einer Patientenprobe zu analysieren, ohne dabei eine große Menge an Patientenmaterial zu benötigen. Hierbei zeigt sich der Bedarf an hydrophoben Mikropartikeln, welche vollautomatisiert messbar sind und mit deren Einsatz möglichst wenig Patientenmaterial gebraucht wird (217). Eine digitale, voll automatische Messung kann mittels VideoScan-Technologie durchgeführt werden. Hydrophobe Mikropartikel, welche fluoreszenzkodiert, stabil in organischen Lösungsmitteln sind und somit den Einsatz mehrere Mikropartikel gleichzeitig ermöglichen, mussten erst in Kooperation mit der Firma PolyAn GmbH entwickelt werden. Nähere Informationen zur Herstellung der hydrophoben Mikropartikel sind aufgrund von Patentbestrebungen nicht möglich. Mikropartikel mit derartigen Eigenschaften gab es bisher nicht und sind somit eine Neuheit. Für den Einsatz der hergestellten hydrophoben Mikropartikel mussten diese zuerst anhand der Kriterien Lösungsmittelstabilität, Hydrophobizität, Immobilisierbarkeit, Verhalten in Puffern und pH-abhängige Aggregation charakterisiert und analysiert werden. Es musste eine Möglichkeit gefunden werden, verschiedene Biomarker gerichtet und mit einer

geeigneten Beladungsdichte an die Mikropartikeloberfläche zu binden. Im Anschluss konnte dann ein Proof-of-Principle zum Nachweis der gebundenen Biomarker entwickelt und optimiert werden.

### 3.2.1 Charakterisierung der hydrophoben Mikropartikel

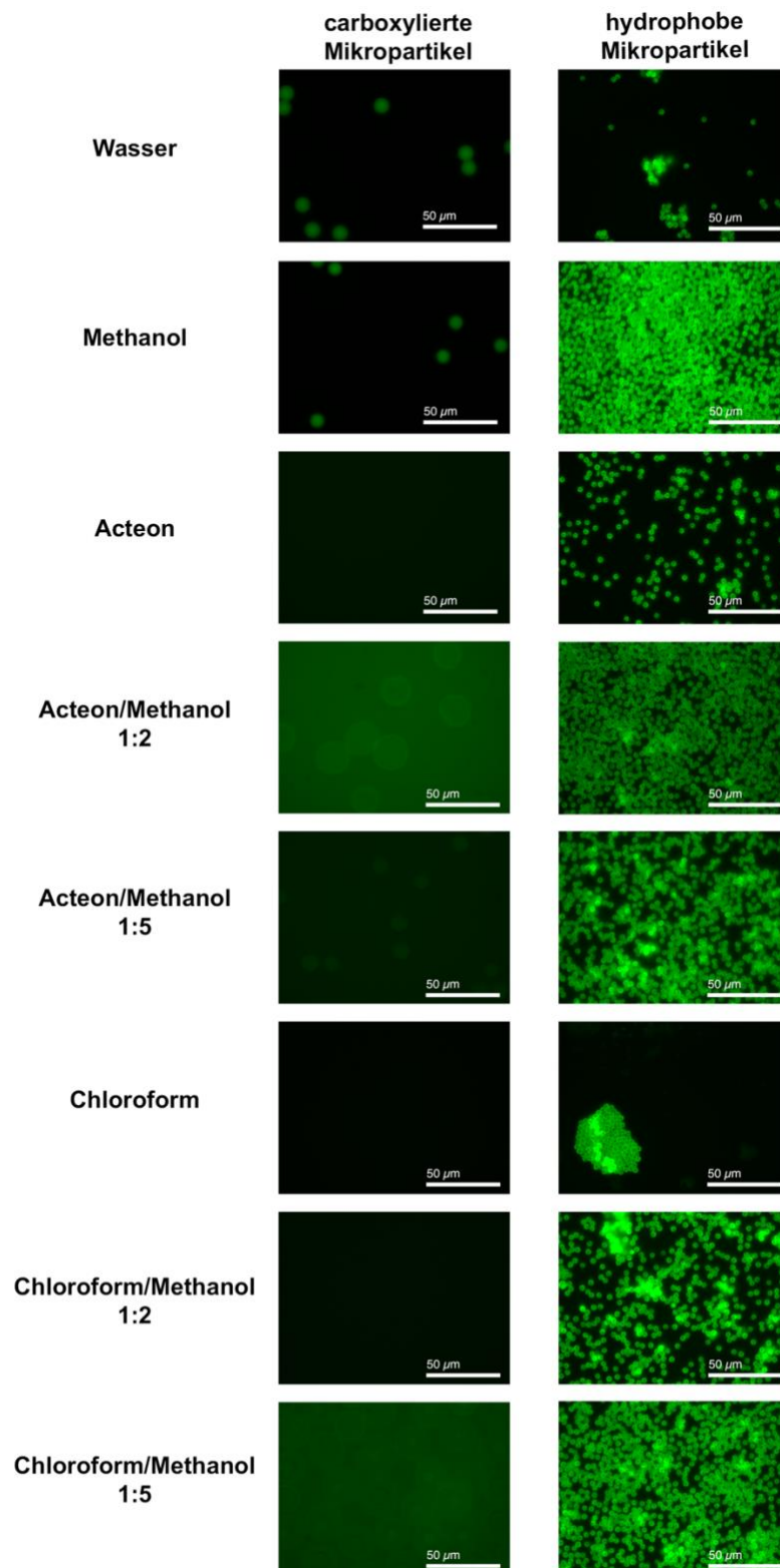
Die Herstellung neuer Mikropartikel setzt im Anschluss eine Charakterisierung dieser anhand verschiedener Kriterien wie Lösungsmittelstabilität, Aggregationsverhalten, Größenverteilung, Hydrophobizität und Immobilisierbarkeit sowohl vor als auch nach der Kopplung von Biomolekülen voraus. Die Kopplung von Biomolekülen an der Mikropartikeloberfläche kann die Eigenschaften der Mikropartikel verändern.

#### 3.2.1.1 Stabilität der Mikropartikel in Lösungsmitteln

Eine Anforderung an die hydrophoben Mikropartikel ist die Stabilität in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Aceton, Ethanol oder Methanol. Hierfür wurden die Mikropartikel in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen inkubiert und im Anschluss auf die Veränderungen wie Aufquellen, Farbverlust und Aggregation überprüft. Zum Vergleich der Lösungsmittelstabilität wurden sowohl carboxylierte Mikropartikel und die neu hergestellten hydrophoben Mikropartikel verwendet (Abb. 17). In der linken Spalte der Abbildung ist klar erkennbar, dass carboxylierte Mikropartikel in organischen Lösungsmitteln wie Aceton und Chloroform nicht stabil sind, aufquellen, ihre Farbkodierung verlieren oder sich komplett auflösen.

Hydrophobe Mikropartikel hingegen sind in allen Lösungsmitteln bis auf 100 % Chloroform stabil und zeigen keine Veränderungen in der Farbe oder Größe (rechte Spalte Abb. 17). Sichtbar ist eine Aggregation der hydrophoben Mikropartikel in Wasser. Hier lässt sich die Aggregation der Mikropartikel durch den hydrophoben Effekt erklären. Die Mikropartikel haben eine hydrophobe Oberfläche. Dabei aggregieren unpolare Moleküle (hydrophobe Mikropartikel) in polaren Lösungen (Wasser). Die polaren Moleküle können keine Wasserstoffbrückenbindungen zu den unpolaren Molekülen bilden und sind daher in ihrer Beweglichkeit stärker eingeschränkt und dadurch höher geordnet. Nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik kann die Entropie in einem geschlossenen System nicht abnehmen, sodass es zu einer Anhäufung von unpolaren Molekülen kommt. Dadurch wird die Oberfläche verkleinert, die Anzahl der geordneten polaren Moleküle nimmt ab und die

Entropie steigt (218–220). Der Unterschied zwischen den carboxylierten und hydrophoben Mikropartikeln ist der Herstellungsprozess. Beide Mikropartikelarten bestehen aus PMMA, jedoch sind die hydrophoben Mikropartikel mehr quervernetzt und somit kompakter (176). Die Struktur der Mikropartikel lässt sich nicht so leicht durch organische Lösungsmittel angreifen und die Fluoreszenzkodierung entfernen. Die hergestellten hydrophoben Mikropartikel eignen sich somit für die weitere Charakterisierung.



**Abb. 17: Lösungsmittelstabilität der carboxylierten und hydrophoben Mikropartikel**

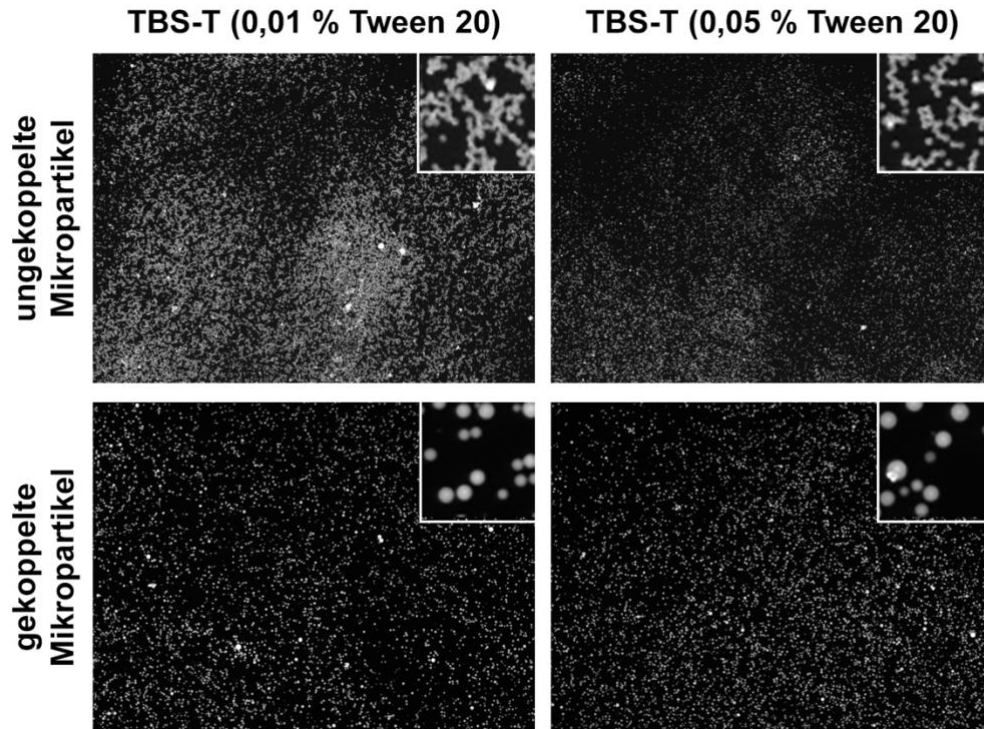
Die Stabilität carboxylierter und hydrophober Mikropartikel wurde in verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser, Methanol, Aceton, Chloroform) und Gemischen aus Lösungsmitteln getestet. Nicht stabile Mikropartikel quellen auf, verlieren ihre Fluoreszenzkodierung oder lösen sich komplett auf.

### 3.2.1.2 Verhalten der Mikropartikel in verschiedenen Puffern und die pH-abhängige Aggregationsneigung

Für die vollautomatische Analyse der Mikropartikel misst die VideoScan-Technologie jeden einzelnen Mikropartikel. Hierfür müssen die Mikropartikel rund sein und einzeln vorliegen. Jedes Mikropartikel, welches nicht der Form oder Farbe entspricht, wird durch einen Algorithmus als Artefakt ausgeschlossen (167). Mikropartikel können aufgrund ihrer Eigenschaften in Puffern mit unterschiedlichen Zusammensetzungen oder pH-Werten aggregieren und somit für die VideoScan-Technologie nicht mehr messbar und analysierbar sein. Um für die Entwicklung eines Assays geeignete Puffer zu verwenden, wurden die Mikropartikel in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und pH-Werten (Tab. 18) inkubiert und im Anschluss auf ihr Aggregationsverhalten analysiert. Betrachtet man alle getesteten Puffer gibt es trotz des großen pH-Bereiches (pH 4,6 bis pH 10,5) keine pH-abhängige Aggregation der Mikropartikel (Abb. 47 - 50 im Anhang). Inkubiert man jedoch die Mikropartikelpopulationen in Salzen wie NaCl oder MgCl<sub>2</sub> so bilden sie Aggregate, unabhängig ihrer Oberflächenbeschaffenheit. Positiv oder negativ geladene Ionen können an die Oberfläche der Mikropartikel binden und somit ihre Oberflächenladung verringern. Dies, wie auch zweiwertige Kationen und Anionen, führen zu Brückenbildungen zwischen den Mikropartikeln und können somit zu Aggregationen der Mikropartikel führen (221). Werden die hydrophoben Mikropartikel in Puffern mit Tween® 20 (0,01 oder 0,05 % Tween® 20) inkubiert, aggregieren hier Mikropartikel mit der Oberflächenbeladung C3 und C8, jedoch nicht mit den Alkylketten C10 und C18 an der Mikropartikeloberfläche. Tween® 20 hält die Mikropartikel von den Rändern der Multiwellplatte wie eine Art Seife entfernt. Hierbei kommt es dazu, dass die hydrophoben Mikropartikel mehr in räumlicher Nähe zueinander sind und über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren und somit aggregieren (221–223). Sobald jedoch die Mikropartikel mit Biomarker gebunden sind, kommt es zu einer Veränderung des Verhaltens in Tween® 20 haltigen Puffern. Durch die Bindung der Biomarker sind die Mikropartikel nicht mehr hydrophob, sondern zeigen eine hydrophile Oberfläche und interagieren nun nicht mehr durch hydrophobe Wechselwirkungen miteinander (Abb. 18). TBS-T ist ein Puffer, der häufig in Verbindung mit Antikörperassays verwendet wird (224). Die Entwicklung zum



Nachweis von Lipiden soll unter anderem spezifisch über Antikörper erfolgen. Somit wurde TBS-T-Puffer für weitere Entwicklungsversuche verwendet.



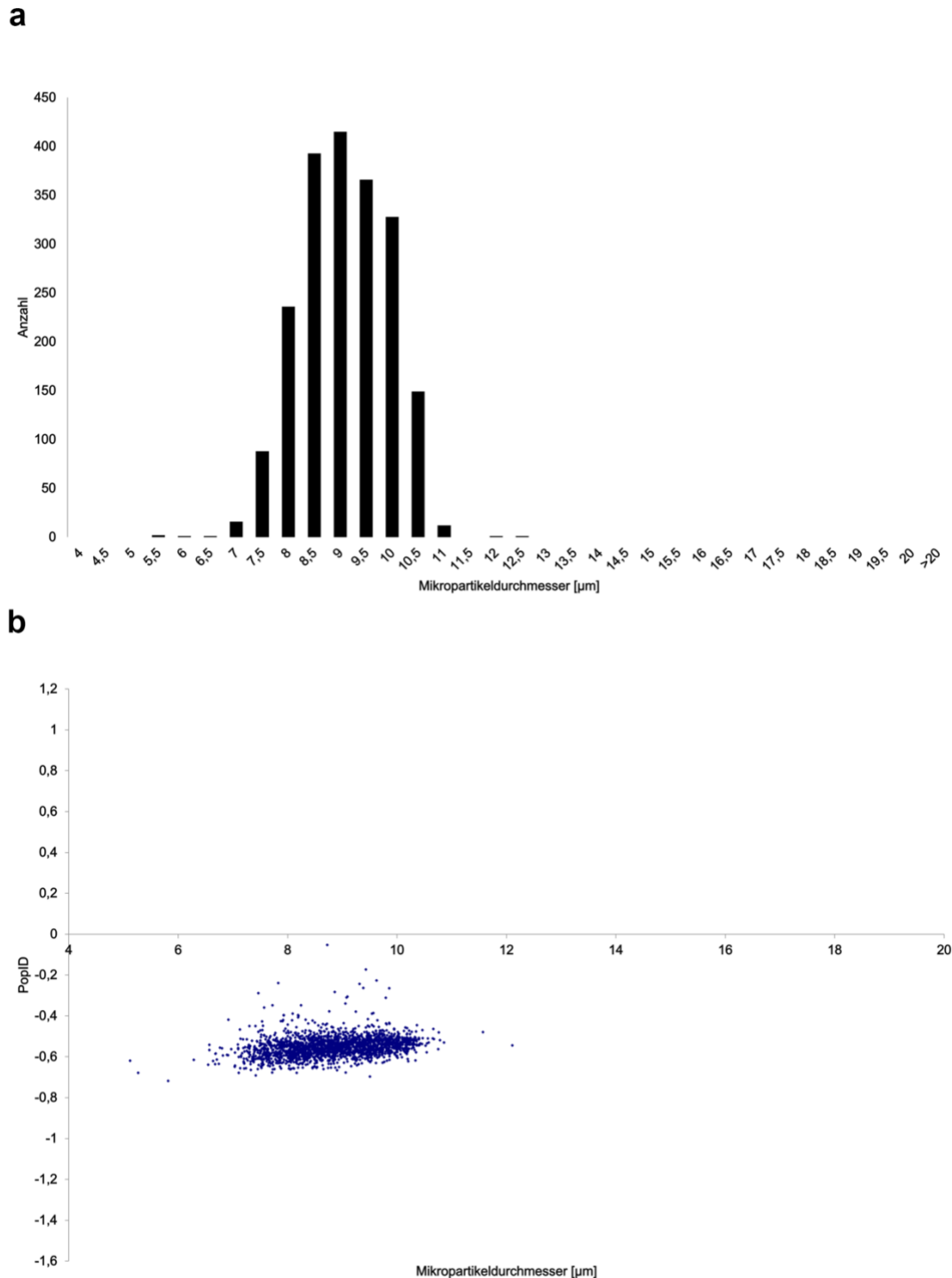
**Abb. 18: Vergleich unbeladener und gekoppelter Mikropartikel in TBS-T**

Die hydrophoben Mikropartikel wurden in TBS-T mit verschiedenen Konzentrationen von Tween® 20 vor und nach der Kopplung mit Phospholipiden inkubiert und mittels VideoScan-Technologie gemessen und ausgewertet. Unbeladene Mikropartikel lagern sich zu Dupletten, Triplets oder größeren Aggregaten zusammen. Mit Phospholipiden gekoppelte Mikropartikel liegen einzeln im Well vor.

### 3.2.1.3 Einteilung der Mikropartikel in Populationen

Bei der Herstellung der Mikropartikel, genauer gesagt bei der Polymerisierung und somit auch der Integration der Farbkodierung, entstehen viele verschiedene Größen von Mikropartikeln (176). Welche durch verschiedene Schritte gesiebt und somit auf einen Bereich von 5 bis 12  $\mu\text{m}$  eingegrenzt werden können. Für die spätere Verwendung der Mikropartikel ist es notwendig, dass die Mikropartikel sowohl eine einheitliche Durchschnittsgröße besitzen als auch eine einheitliche Farbkodierung pro Mikropartikelpopulation (167,217). Anhand der Größe und der Farbkodierung können Mikropartikel in Populationen (PopID) eingeteilt werden (167). Die Einteilung in Populationen ist wichtig, damit die VideoScan-Technologie die verwendeten Mikropartikel voneinander unterscheiden kann und es möglich ist, viele verschiedene Populationen gleichzeitig zu verwenden und somit mehrere Biomarker simultan

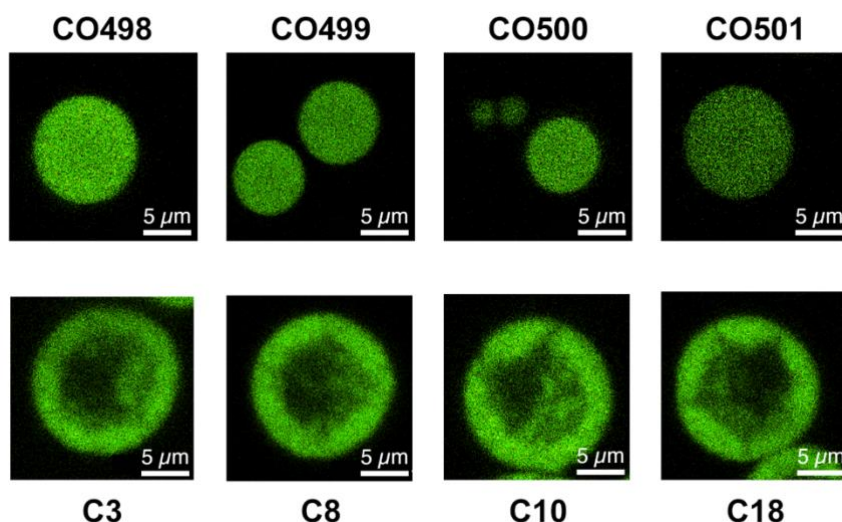
nachzuweisen. Wie zuvor erwähnt, spielt die Größe der Mikropartikel eine Rolle, denn in früheren Experimenten mit carboxylierten Mikropartikeln verschiedener Größen konnten abhängig von der Größe der Mikropartikel unterschiedliche Ergebnisse in der Bindung und dem Nachweis der Mikropartikel generiert werden (217). Für erste Versuche und die Entwicklung eines Proof-of-Principle zum Nachweis von Lipiden kann ein Bereich von 5 – 12,5 µm verwendet werden. Alle Mikropartikel konnten aufgrund ihrer Größe und Farbkodierung in Populationen eingeteilt werden. Beispielhaft dargestellt ist sowohl die Größenverteilung (Abb. 19a) als auch die Einordnung in eine Population (Abb. 19b) der Mikropartikelpopulation CO498. Die Größenverteilungen und Einteilungen in Populationen der Mikropartikel CO499 (Abb. 51), CO500 (Abb. 52) und CO501 (Abb. 53) sind im Anhang dargestellt.



**Abb. 19: Größenverteilung der Mikropartikelpopulation CO498**

Die hydrophoben Mikropartikel HVMP69-C3 wurden mittels VideoScan-Technologie eingemessen und in die Mikropartikelpopulation CO498 eingeteilt. **a** Hierbei kann man die Verteilung der Größe innerhalb der Mikropartikelpopulation feststellen. Die Größe variiert zwischen 5,5 µm und 12,5 µm. **b** Aufgrund der Größenverteilung der Mikropartikel und dem logarithmischen Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Coumarin und Rhodamin kann man die Mikropartikel in Populationen (entspricht PopID) einteilen, sodass die VideoScan-Technologie die Mikropartikel eindeutig zur Population CO498 zuordnen kann.

In Hinsicht auf die Einteilung der Mikropartikel in Populationen müssen diese auch bezüglich ihrer Fluoreszenzverteilung und ihrer Form analysiert werden. Hierfür müssen hochauflösende, konfokale Mikroskopieverfahren verwendet werden. Mikropartikel sollten hinsichtlich ihrer Form genau überprüft werden, da es bei der Herstellung zu Fehlern in den Mikropartikeln kommen kann und diese dann Löcher oder Kanäle aufweisen (Abb. 20). Nur Mikropartikel, die der zu erwartenden Form eines runden sphärischen Mikropartikels entsprechen und eine homogene Fluoreszenzverteilung haben, können für weitere Versuche verwendet werden. Mikropartikel wie in Abb. 20 im unteren Teil können nicht verwendet werden. Erste Herstellungsversuche der hydrophoben Mikropartikel scheiterten aufgrund der unten zu sehenden Löcher und Kanäle in den Mikropartikeln. Die Mikropartikel hatten keine Kugelform und keine homogene Fluoreszenzintensitätsverteilung. Durch die Entdeckung der fehlerhaften Mikropartikel konnten die Herstellungsprotokolle überarbeitet und optimiert werden, sodass verwendbare, kugelförmige Mikropartikel mit einer homogenen Fluoreszenzintensitätsverteilung entstanden.



**Abb. 20: Konfokale Aufnahme unbeladener hydrophober Mikropartikel**

Alle hergestellten Mikropartikelpopulationen wurden mittels konfokaler Mikroskopie anhand ihrer Form und Fluoreszenz untersucht. In der oberen Reihe sind Mikropartikel sichtbar, welche eine sphärische Form und eine gleiche Verteilung der Fluoreszenz aufweisen. Wohingegen die Mikropartikel im unteren Teil des Bildes Löcher und Kanäle zeigen und somit nicht verwendbar sind.

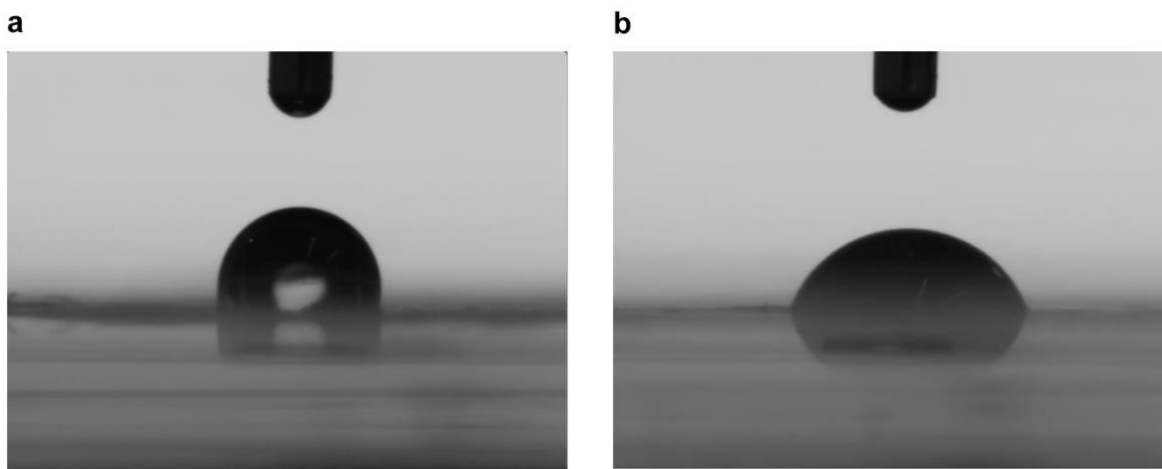
### 3.2.1.4 Bestimmung der Hydrophobizität der Mikropartikeloberfläche

Damit Lipide gebunden werden können, müssen die hergestellten Mikropartikel hydrophob sein. Um herauszufinden, wie hydrophob die Mikropartikeloberfläche ist, bzw., ob man zwischen den einzelnen Oberflächenmodifikationen (Alkylketten mit unterschiedlicher Anzahl von Kohlenstoffatomen: C3, C8, C10 und C18) einen Unterschied in der Hydrophobizität erkennen kann, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen die Bestimmung des Kontaktwinkels (178,225) einer Mikropartikelsuspension auf einem Objektträger und zum anderen die Färbung der Mikropartikeloberfläche mit einem Fluoreszenzstoff, der hydrophobe Bestandteile einfärbt, CellBrite® Red (226).

#### Kontaktwinkelmessung der Mikropartikeloberfläche

Zur Bestimmung des Kontaktwinkels wurde eine Mikropartikelsuspension transparenter PMMA-Mikropartikel auf einen Zeonor-Slide der Firma PolyAn GmbH getropft und über Nacht bei RT getrocknet. Im Anschluss wurden am Kontaktwinkelmeter jeweils 1 µl große Wassertropfen auf die Mikropartikeloberfläche getropft und mittels Software der Kontaktwinkel vom Wassertropfen zur festen Phase errechnet. Dies wurde sowohl für alle unbeladenen Mikropartikel als auch mit Phospholipiden gekoppelte Mikropartikel durchgeführt. Eine hydrophobe Oberfläche kann verschieden definiert werden. Laut Youngs Gleichung (225) ist eine Oberfläche ab einem Kontaktwinkel von 90° hydrophob, alle Oberflächen mit einem Kontaktwinkel darunter sind hydrophil. Im Vergleich dazu klassifizieren Chen et al., Si et al. und Wang et al. eine Oberfläche mit einem Kontaktwinkel unter 10° als superhydrophil, 10-65° als hydrophil, 65-150° als hydrophob und über 150° als superhydrophob (227–229). Aufgrund der genaueren Unterteilung des Kontaktwinkels, möchte ich mich im Weiteren auf die Definition von Cheng et al., Si et al. und Wang et al. beziehen. Unbeladene Mikropartikel sollten einen Kontaktwinkel über 65° aufweisen und aufgrund der silanisierten Oberflächenmodifikation der Mikropartikel hydrophob sein (227–229). Wohingegen gekoppelte Mikropartikel einen geringeren Kontaktwinkel und somit hydrophilere Eigenschaften aufgrund der Bindung der Phospholipide aufweisen sollten (225,230). Diese binden mit ihrem hydrophoben Teil an der Mikropartikeloberfläche und somit ragt der hydrophile Kopf der Phospholipide von der Mikropartikeloberfläche weg. Die Kontaktwinkelmessung hat die Theorie der

unbeladenen und gekoppelten Mikropartikel, wie in Tabelle 14 dargestellt, bestätigt. Unbeladene Mikropartikel weisen einen höheren Kontaktwinkel (z. B. HVMP75-C18 mit einem Kontaktwinkel von  $104,5^\circ$ ) und damit hydrophobe Eigenschaften auf. Wohingegen mit Phospholipiden gekoppelte Mikropartikel einen geringeren Kontaktwinkel (HVMP75-C18 mit CL-Cy5 mit einem Kontaktwinkel von  $82,5^\circ$ ) und somit hydrophilere Eigenschaften aufweisen. Abbildung 21 zeigt den Vergleich eines unbeladenen Mikropartikels links (Abb. 21a) und eines mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikels rechts (Abb. 21b).



**Abb. 21: Vergleich des Kontaktwinkels hydrophober und hydrophiler Oberflächen**

*Der Kontaktwinkel der hydrophoben Mikropartikel wurde vor und nach der Kopplung mit Phospholipiden bestimmt. a zeigt die Bestimmung des Kontaktwinkels bei unbeladenen Mikropartikeln. Zu sehen ist ein abgekugelter Tropfen und somit eine hydrophobe Oberfläche. b zeigt die Bestimmung des Kontaktwinkels der mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel. Zu sehen ist ein verlaufener Tropfen mit einem flachen Kontaktwinkel und somit eine hydrophile Oberfläche.*

Der Unterschied zwischen unbeladenen und gekoppelten Mikropartikeln trifft für alle gemessenen Mikropartikel zu. Vergleicht man die unbeladenen Mikropartikel miteinander kann man sagen, dass die Mikropartikelpopulation HVMP75-C18 ganz klar den größten Kontaktwinkel ( $104,5^\circ$ ) aufweist und somit laut Kontaktwinkelmessung die hydrophobste Oberfläche besitzt. Wohingegen die Mikropartikelpopulation HVMP75-C8 den geringsten Kontaktwinkel ( $83,1^\circ$ ) zeigt. Trotzdem lässt sich feststellen, dass an der Mikropartikeloberfläche hydrophobe Alkylketten gebunden sind, denn der Kontaktwinkel für reines PMMA liegt bei  $\sim 68^\circ$  (231). Der errechnete Kontaktwinkel ist weit größer als der von PMMA, somit ist die Oberfläche der Mikropartikel hydrophober. Zu sagen ist, dass die

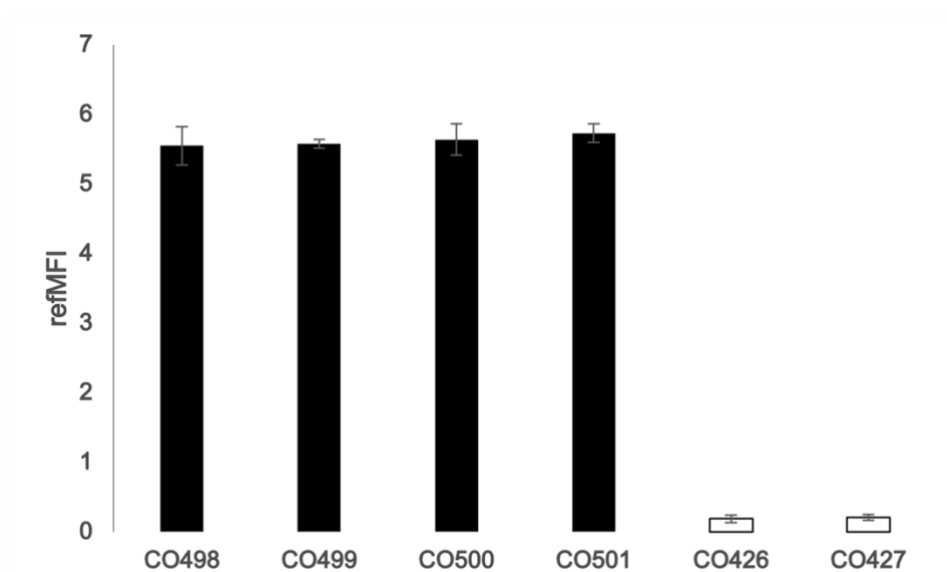
Kontaktwinkelmessung der Mikropartikel nur ein ungefährender Wert darstellt, da eine genaue Kontaktwinkelmessung nur mit planaren Oberflächen durchgeführt werden kann (232,233). Wie in Abschnitt *Einteilung der Mikropartikel in Populationen* gezeigt, variiert die Größe der Mikropartikel stark von 5,5 µm bis 12,5 µm. Durch die Größenunterschiede der Mikropartikel wie auch durch Unterschiede in der Verteilung der Mikropartikel auf der Oberfläche des Objektträgers kann es zu einer unebenen Fläche und somit zu einer Hysterese (178,234) kommen und die Kontaktwinkel können nicht richtig bestimmt werden. Somit ist der hier gemessene Kontaktwinkel ein Richtwert, jedoch kein genauer Wert.

**Tab. 14: Kontaktwinkelmessungen**

Mikropartikel	unbeladen	CL – Cy5	PE – Cy5	PC – Cy5
HVMP75-C3	94,1°	75,1°	74,6°	70,5°
HVMP75-C8	83,1°	78,6°	72,0°	70,3°
HVMP75-C10	91,9°	65,8°	60,5°	64,1°
HVMP75-C18	104,5°	82,5°	75,8°	79,7°

#### Färbung der hydrophoben Mikropartikeloberfläche mit CellBrite® Red

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität ist die Färbung der Mikropartikeloberfläche mit CellBrite® Red, einem Farbstoff der hydrophobe Strukturen unter anderem an Zellmembranen färbt (226,235). Mittels CellBrite® Red sollte gezeigt werden, dass es zwischen carboxylierten Mikropartikeln und hydrophoben Mikropartikeln einen Unterschied in der Hydrophobizität der Oberfläche gibt. Hierfür wurden sowohl carboxylierte Mikropartikel (CO426 und CO427) als auch hydrophobe Mikropartikel (CO498 bis CO501) mit einer 1:100 Verdünnung des Farbstoffs CellBrite® Red inkubiert und im Anschluss 3 x gewaschen. Dabei stellte sich heraus, dass alle hydrophoben Mikropartikel mit CellBrite® Red mit Werten von refMFI 5,55 bis 5,73 angefärbt werden konnten, die carboxylierten Mikropartikel jedoch nicht (refMFI 0,19 bis 0,21; Abb. 22). Dieses Ergebnis bestätigt die hydrophobe Oberfläche der hergestellten Mikropartikelpopulationen CO498 bis CO501.

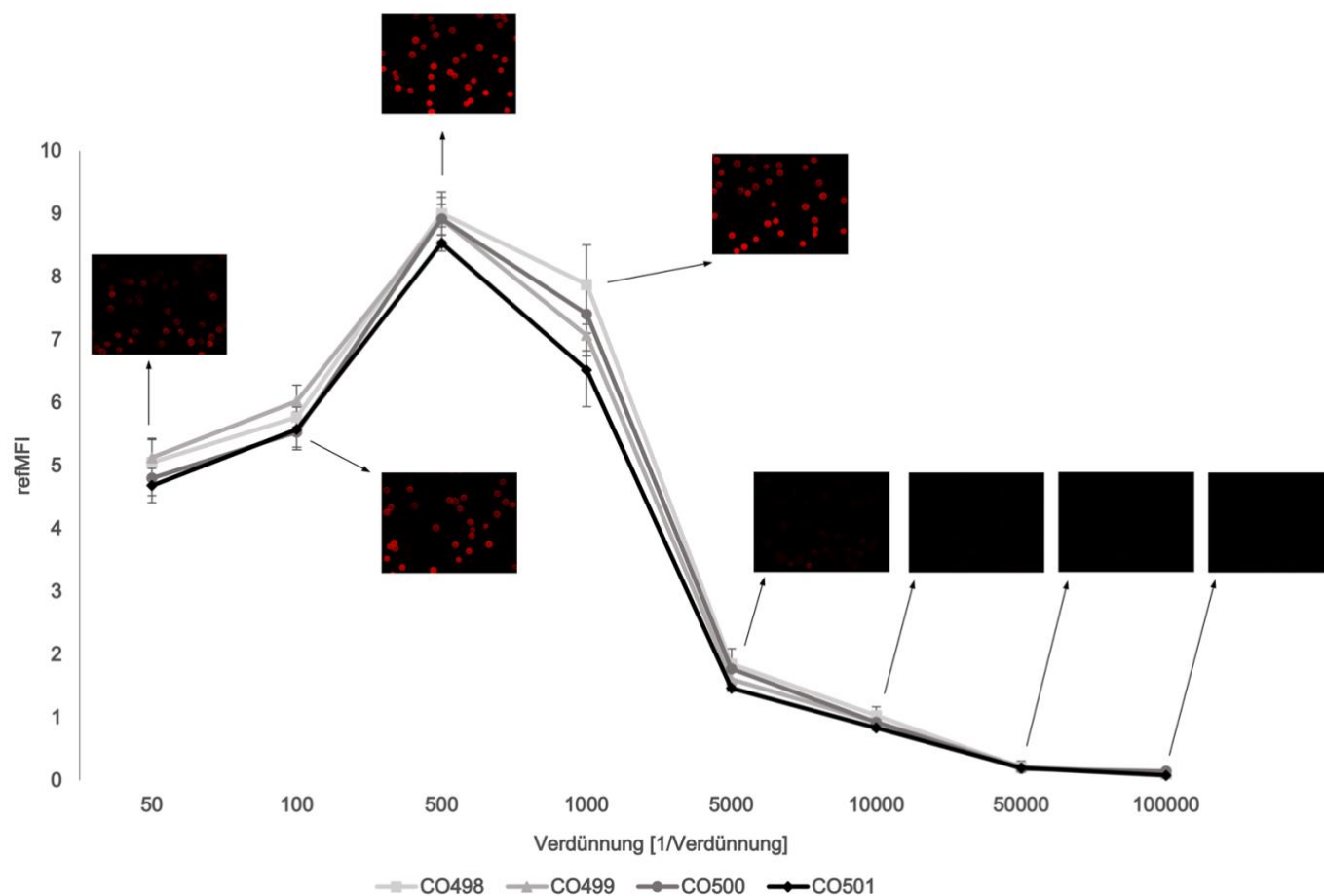


**Abb. 22: Färbung der Mikropartikeloberfläche mit dem Farbstoff CellBrite® Red**

Carboxylierte und hydrophobe Mikropartikel wurden mit dem hydrophoben Farbstoff CellBrite® Red eingefärbt und das Fluoreszenzsignal über die VideoScan-Technologie bestimmt. Die Oberfläche der hydrophoben Mikropartikel lässt sich mittels CellBrite® Red einfärben, die Oberfläche der carboxylierten Mikropartikel hingegen nicht. Dies lässt sich durch die gemessenen Fluoreszenzwerte bestätigen. Die hydrophoben Mikropartikel haben im Durchschnitt eine Ligandenfluoreszenz von 5,61 refMFI und die carboxylierten Mikropartikel von 0,19 refMFI.

Um zu bestätigen, dass es sich beim gemessenen Signal nicht um eine willkürliche Färbung der Oberfläche handelt, wurden die hydrophoben Mikropartikel erneut mit CellBrite® Red in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:50 bis 1:100.000) inkubiert und analysiert. Die Inkubation mit einer 1:50 Verdünnung des CellBrite® Red Farbstoffes zeigt sowohl in den Fluoreszenzwerten (Abb. 23a) als auch in der visuellen Darstellung (Abb. 23b) ein geringeres Signal als die Inkubation mit einer 1:500 Verdünnung. Jede Verdünnungsstufe niedriger als 1:500 weist einen geringeren Fluoreszenzwert auf, dies kann an Self-Quenching Effekten des Farbstoffes liegen. Aufgrund einer zu hohen Fluoreszenzintensität löscht der Fluoreszenzfarbstoff sich selbst aus (236–239). Die Verdünnungsreihe des Farbstoffes CellBrite® Red zeigt an den Mikropartikelpopulationen einen klaren Glockenverlauf und weist somit nicht auf willkürlich, unspezifische Bindungen hin. Die visuelle Darstellung bestätigt den Kurvenverlauf der Daten. Jedoch ist mit dem bloßen Auge ab einer Verdünnungsstufe von 1:5.000 kaum noch ein Signal zu erkennen, wohingegen ab einer Verdünnungsstufe von 1:50.000 (refMFI 0,2) kaum noch ein Fluoreszenzsignal mehr messbar ist.





**Abb. 23: Verdünnungsreihe des Farbstoffes CellBrite® Red**

Eine willkürliche Färbung der Mikropartikeloberfläche wurde mittels Verdünnungsreihe des Farbstoffes CellBrite® Red (1:50 bis 1:100.000) überprüft. Aufgrund der Abstufungen des Fluoreszenzsignals an der Mikropartikeloberfläche konnte eine willkürliche Bindung des Farbstoffes CellBrite® Red ausgeschlossen werden. Das höchste Fluoreszenzsignal wird bei einer 1:500 Verdünnung erreicht, danach fällt das Fluoreszenzsignal stetig ab. Ab einer Verdünnung von 1:10.000 ist mit dem bloßen Auge kein Fluoreszenzsignal mehr erkennbar.

### 3.2.2 Immobilisierung der hydrophoben Mikropartikel auf verschiedenen Oberflächen

Die Immobilisierung von Mikropartikeln auf unterschiedlichen Materialien oder Trägern hat mehrere Vorteile. Die Anwendbarkeit eines Assays erhöht werden, in dem man mehrere Möglichkeiten wie Multiwellplatten oder Objektträger zur Verfügung hat. Mikropartikel werden an einem Platz fixiert, somit werden bei mehreren Messungen immer ein und dieselben Mikropartikel gemessen und es können direkte Vergleiche innerhalb des Versuches gezogen werden (167,240). Bei der Durchführung eines Assays können Zentrifugationsschritte sowie Zeit während des Waschens eingespart werden. Bei der Verwendung von 96-Well-Platten anstelle von Riegeln mit jeweils 8 Kavitäten kommt es zu einem höheren Durchsatz von Patientenproben und der Ersparnis von Material (240).

All diese Vorteile sprechen für eine Immobilisierung der Mikropartikel, um einen entwickelten Assay nutzerfreundlicher und anwendbar für die Praxis zu machen.

Für carboxylierte Mikropartikel gibt es verschiedene Methoden zur Immobilisierung, wie die Immobilisierungslösung (Medipan), die Verwendung von Poly-L-Lysin (PLL) (167) oder UV-Kleber (attomol GmbH). Für die Immobilisierung der hydrophoben Mikropartikel wurden mehrere Methoden verwendet. Zum einen wurden 11 Multiwellplatten mit verschiedenen Beschichtungen, unter anderem ausgelegt für Lipidbindungen (siehe Tab. 19, Anhang), verwendet. Die Mikropartikel sollten über eine Immobilisierungslösung, PLL oder UV-Kleber an die Multiwellplatten gebunden werden. Jedoch gab es aufgrund der hydrophoben Oberflächen-eigenschaften der Mikropartikel Probleme bei der Immobilisierung. Keine der verwendeten Methoden oder Platten konnte die hydrophoben Mikropartikel in einer Platte oder auf einem Objektträger fixieren. Die Mikropartikel sammelten sich am Rand oder in der Mitte des Wells. Wurden die „immobilisierten“ Mikropartikel gewaschen, konnte eine maximale Rückgewinnung der Mikropartikel von 20 % erreicht werden. Die vielversprechendste Methode war die Immobilisierung mit einem UV-Kleber. Hierbei wurde eine Rückgewinnung von 100 % erreicht, jedoch hat der UV-Kleber eine 70 %ige Isopropanol-Basis. Wie in Abschnitt *Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche* sichtbar, löst Isopropanol die Phospholipide schon ab einer Konzentration von 25 % ab. Somit kam auch diese Methode zur Immobilisierung der hydrophoben Mikropartikel nicht in Frage. Bisher konnte keine geeignete Methode zur

Immobilisierung der hydrophoben Mikropartikel identifiziert werden. In weiteren Versuchen könnten Platten mit Lipidresten über Micro-Spotting (241), eine Art Fat Blot Assay (242) oder über TLC Blotting (243) beschichtet und an diese die hydrophoben Mikropartikel gebunden werden. Hierbei kann es bei der Anwendung des Assay jedoch zu unspezifischen Bindungen durch den Einsatz von Patientenseren (244) kommen. Weiterhin könnten Mikropartikel mit anderen Eigenschaften in den Platten immobilisiert werden und diese binden aufgrund von Lipidresten oder anderen kovalenten Bindungen die hydrophoben Mikropartikel (245). Die hydrophoben Mikropartikel könnten in dreidimensionale Strukturen wie Hydrogele (246,247) im Well eingebettet werden. Hierbei müsste jedoch garantiert sein, dass die Poren des eingesetzten Hydrogels groß genug für die Diffusion der Assaybestandteile sind (248). Da Hydrogele mittels Zugabe von Wasser aufschwemmen (248), sollte sichergestellt sein, dass die hydrophoben Mikropartikel nicht aufgrund ihrer Eigenschaften und dem hydrophoben Effekt aggregieren. Sollte dies der Fall sein, sind die hydrophoben Mikropartikel zwar im Well gebunden, jedoch verliert der Assay seine Funktionalität (249).

### 3.2.3 Kopplung Biomarker an die Mikropartikeloberfläche

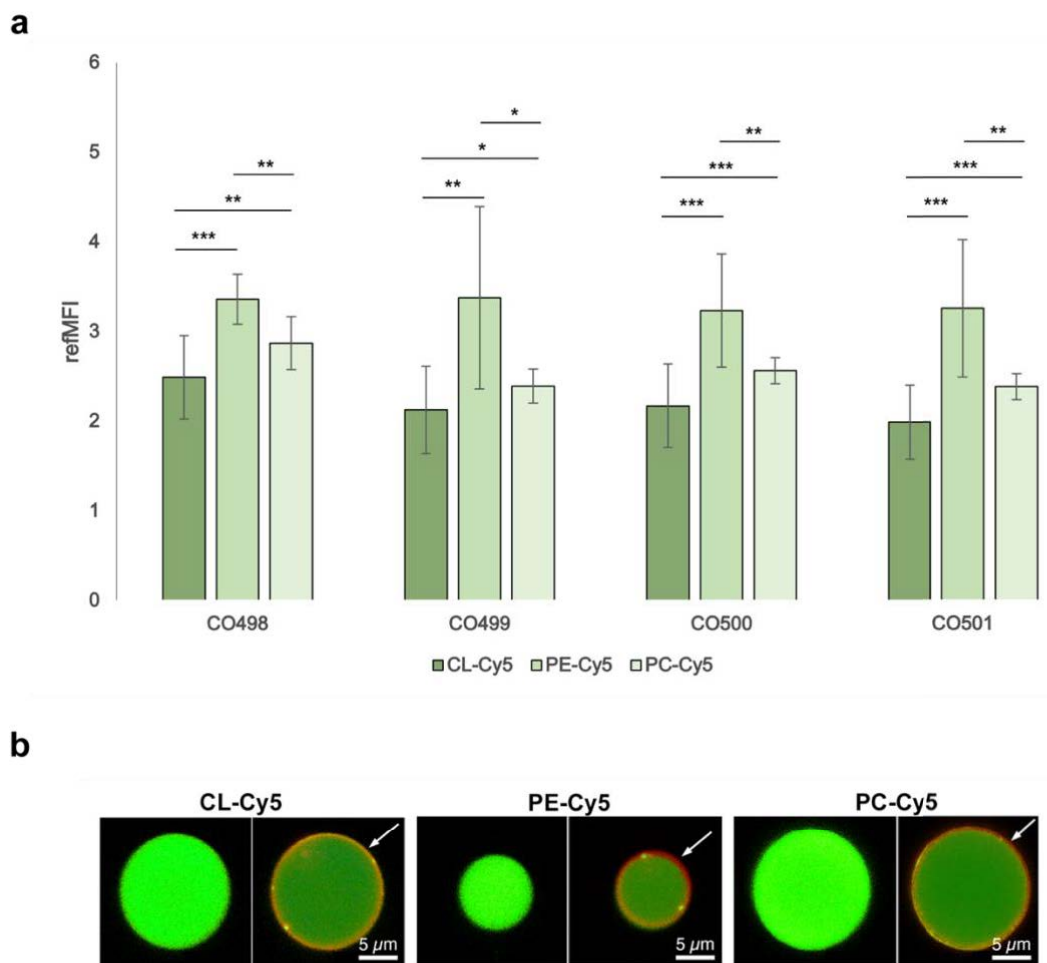
Nachdem die hergestellten Mikropartikel als lösungsmittelstabile und hydrophobe Mikrosphären mit einer homogenen Fluoreszenzverteilung charakterisiert und in Populationen eingeteilt wurden, konnten diese nun zur Kopplung diagnostisch relevanter Biomarker verwendet werden. Die verwendeten Biomarker Cardiolipin (CL), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatinositol (PI) und das Apolipoprotein H ( $\beta$ 2-GP1) wurden anhand der Literatur und in Absprache mit Diagnostikpartnern ausgewählt. Zur leichteren Überprüfung der gebundenen Phospholipide wurde zuerst mit den fluoreszenzmarkierten Phospholipiden CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 gearbeitet. Für die spätere Assayentwicklung wurden unkonjugierte Phospholipide verwendet. Die Kopplung der Phospholipide sollte mit Hilfe verschiedener Messsysteme bestätigt werden. Hierfür wurden zum einen die VideoScan-Technologie und die Durchflusszytometrie zur quantitativen Auswertung und zum anderen die STED-Mikroskopie für die qualitative Auswertung der Kopplung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche verwendet.

### 3.2.3.1 Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche

Für die Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide wurden anfänglich verschiedene Puffer (Borsäure, Methanol), Temperaturen (4 °C, RT, 28 °C, 37 °C) und Zeiten (1 h, 3 h, über Nacht) verwendet. Eine Kopplung bei 28 °C, 1200 rpm und 3 h und 80 % Methanol stellte sich als am effektivsten heraus. Hierbei konnten alle Phospholipide an die verwendeten Mikropartikel (CO498 bis CO501) mit Werten von refMFI 1,99 (CO501 – CL-Cy5) bis hin zu refMFI 3,37 (CO499 – PE-Cy5) gebunden werden (Abb. 24, Tab. 15).

**Tab. 15: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide [in refMFI]**

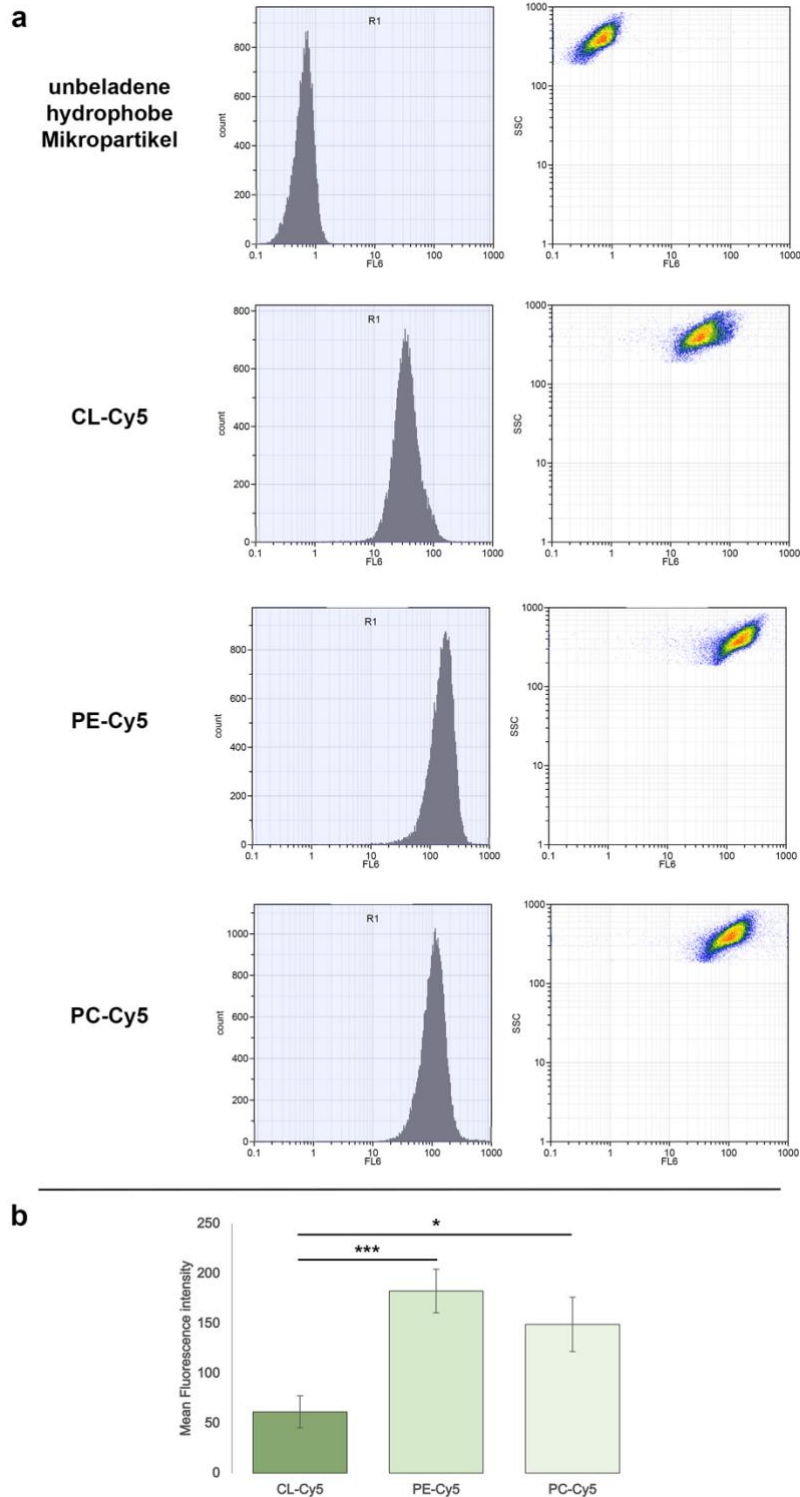
Mikropartikel	CL-Cy5	PE-Cy5	PC-Cy5
CO498	2,45	3,36	2,87
CO499	2,13	3,38	2,39
CO500	2,17	3,23	2,56
CO501	1,99	3,26	2,39



**Abb. 24: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide – VideoScan-Technologie**

Die hydrophoben Mikropartikelpopulationen CO498, CO499, CO500 und CO501 wurden mit drei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Phospholipiden (CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5; 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gekoppelt und mittels VideoScan-Technologie gemessen. **a** Zwischen den einzelnen Phospholipiden gibt es signifikante (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) Unterschiede in der Beladung der Mikropartikeloberfläche. **b** Diese Unterschiede sind auch in der visuellen Darstellung aufgrund einer eindeutigen Ringfluoreszenz (rot und mit einem Pfeil gekennzeichnet) um die Mikropartikel (Grundsignal der Mikropartikel links im Bild) sichtbar. Im rechten Bild scheint die Grundfluoreszenz der Mikropartikel dunkler, dies ist jedoch nur ein Artefakt aufgrund der Überlagerung der Bilder.

Die Kopplung der Phospholipide konnte sowohl mittels VideoScan-Technologie als auch mit der Durchflusszytometrie bestätigt werden. Bei den Messwerten aus der Durchflusszytometrie (Abb. 25, Tab. 16) handelt es sich um mittlere Fluoreszenzwerte im Bereich von 39,86 (CO499 – CL-Cy5) bis 207,60 (CO501 – PE-Cy5). Die Messung mittels VideoScan-Technologie erweist sich aufgrund des Ausschlusses von Störfaktoren wie Staub, Artefakten, Luftblasen und Aggregationen von Mikropartikeln, sowie die Möglichkeit der Mehrfachmessung von Proben als vorteilhafter (167).



**Abb. 25: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide - Durchflusszytometrie**

Die mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel wurden als Kontrolle in einem anderen System, der Durchflusszytometrie, gemessen. Auch hier ist ein Fluoreszenzsignal auf den gekoppelten Mikropartikeln im Gegensatz zu den unbeladenen Mikropartikeln deutlich sichtbar. Im Vergleich zur VideoScan-Technologie sind die Fluoreszenzwerte auch hier für CL-Cy5 am niedrigsten und für PE-Cy5 am höchsten. Mit beiden Technologien können vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Signifikanzen angegeben mit \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

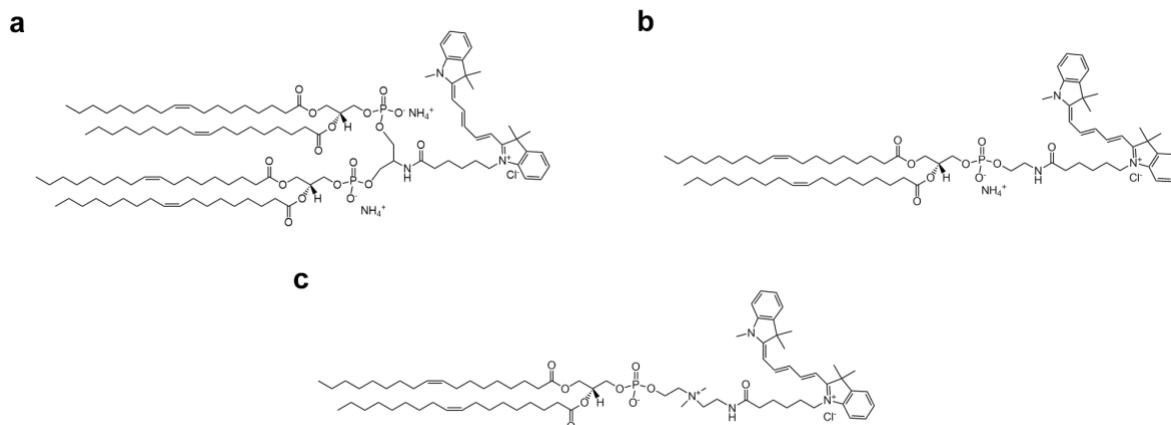
**Tab. 16: Kopplungswerte der Phospholipide [in mittlerer Fluoreszenzintensität]**

Mikropartikel	unbeladen	CL-Cy5	PE-Cy5	PC-Cy5
C498-CO501	0,71	61,48	182,28	149,05

Unterschiede in der Bindung der Phospholipide sind auch in der visuellen Darstellung und qualitativen Auswertung der Kopplung mittels STED-Mikroskopie sichtbar (Abb. 28). Das Phospholipid PE-Cy5 bindet in größerer Menge an die Mikropartikeloberfläche als die Phospholipide CL-Cy5 und PC-Cy5 und generiert eine stärkere Ringfluoreszenz um die Mikropartikel.

Vergleicht man die Strukturen der Phospholipide (Abb. 26) miteinander, liegt der größte Unterschied der Phospholipide in der Anzahl der Fettsäureketten. Die Phospholipide PE-Cy5 und PC-Cy5 besitzen typisch für Phospholipide (250) zwei Fettsäureketten, wohingegen das Phospholipid Cardiolipin vier Fettsäureketten (einzigartig für Phospholipide) (251) besitzt. PE und PC unterscheiden sich aufgrund ihrer zusätzlichen Cholin- oder Ethanolamingruppe am Phosphatrest der Kopfgruppe, voneinander (252). Das PE ist durch die fehlende Dreifachmethylierung am Aminostickstoffatom (253) kompakter in seiner Struktur als das PC und kann so möglicherweise besser an die Mikropartikeloberfläche binden als das PC. Weiterhin könnte der niedrigere Fluoreszenzwert von PC-Cy5 im Vergleich zu PE-Cy5 durch das Verhalten der PC-Moleküle in 80 % Methanol erklärt werden. Wenn die PC-Moleküle mit Wasser in Wechselwirkung treten, kommt es zur Hydratisierung des PC, was zu einer starken Abnahme der Löslichkeit des Moleküls führt (254). Hydratisierte PC-Moleküle neigen zur Aggregation und binden daher schlechter an die Oberfläche der Mikropartikel.

Eine Erklärung für die geringere Bindung und das damit verbundene geringere Fluoreszenzsignal des CL könnte die Form des Phospholipids aufgrund seiner vier Fettsäureketten darstellen. Die Struktur in Abb. 26 a zeigt die Zusammensetzung des CL mit zwei Phosphatresten am Kopf, dem GlycerinGrundgerüst und den vier Fettsäureketten (250). Das Phospholipid ist mit seiner kegelförmigen Anordnung breiter und braucht eine größere Fläche zur Bindung an der Mikropartikeloberfläche. Möglicherweise kommt es hier zu sterischen Effekten in Verbindung mit dem Hook-Effekt (255,256) der CL-Moleküle untereinander, somit wäre die geringe Bindung und die damit verbundene geringere Fluoreszenz zu erklären.



**Abb. 26: Strukturen der fluoreszenzmarkierten Phospholipide**

Dargestellt sind die Strukturen der Phospholipide Cardiolipin (**a**), Phosphatidylethanolamin (PE; **b**) und Phosphatidylcholin (PC; **c**). Die Phospholipide PE und PC unterscheiden sich anhand ihrer Anzahl an Fettsäureketten vom Phospholipid CL. PE und PC besitzen zwei Fettsäureketten, wohingegen CL vier Fettsäureketten besitzt. Der Unterschied zwischen PE und PC liegt in der Dreifachmethylierung des Aminostickstoffatoms des PC, dem sogenannten Cholin-Rest.

Die Bindung der Phospholipide findet über passive Adsorption an der Mikropartikeloberfläche statt. Die passive Adsorption beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen (Van-der-Waals, London-Kräfte) zwischen den Fettsäureketten der Phospholipide und der silanisierter Mikropartikeloberfläche (C3 - C18). Die Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten (Oberfläche und Fettsäurerest) kommen aufgrund des Strebens nach größtmöglicher thermodynamischer Stabilität zustande (257,258). Beruhen die Bindungen zwischen Biomarker und Mikropartikeloberfläche nicht ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, sondern auf ionischen Wechselwirkungen, kann die Umgebung des Absorptionspuffers, wie Salze oder der pH-Wert, die Bindung der Biomarker an der Oberfläche positiv oder negativ beeinflussen (259,260). Die Biomarker und eventuelle andere enthaltende Stoffe konkurrieren um die Bindung an der Mikropartikeloberfläche. Hierbei kommt es zu Affinitäts- und Konzentrationseffekten an der Oberfläche (261,262). Somit ist es von Vorteil, aufgereinigte Biomarker ohne Nebenprodukte an die Mikropartikeloberfläche zu bringen, um auszuschließen, dass eventuelle Bindungsstellen durch Verunreinigungen belegt werden und somit der relevante Biomarker nicht an der Mikropartikeloberfläche binden kann. Die verwendeten Phospholipide CL, PE und PC haben jeweils C18-Fettsäureketten, sogenannte Oleinsäuren (Ölsäuren). Aufgrund des zuvor genannten Strebens nach größtmöglicher thermodynamischer Stabilität, liegt die Hypothese nah, dass die

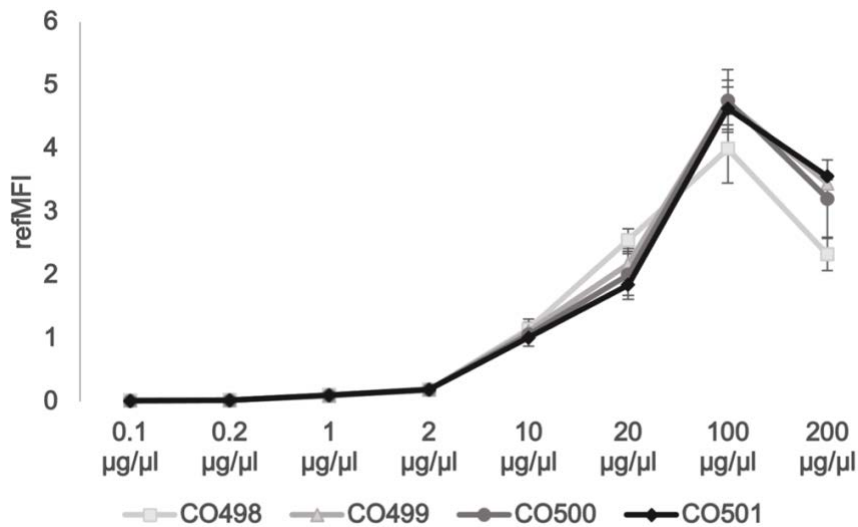


Phospholipide an der Mikropartikelpopulation CO501 mit einer C18 Oberfläche am stärksten binden. Jedoch ist diese Hypothese weder mittels VideoScan-Technologie noch durch Messung mittels Durchflusszytometrie zu bestätigen. Alle Phospholipide besitzen am 9ten C Atom eine Doppelbindung (Abb. 26). Durch die Doppelbindung vom 9ten zu 10ten C-Atom kommt es zu einem Knick in der Fettsäurekette (263–265). Möglicherweise beeinflusst der Knick die Zugänglichkeit zur Fettsäure und somit kommt es nur an den unteren 8 C-Atomen zu hydrophoben Wechselwirkungen mit den Alkylketten an der Mikropartikeloberfläche (263–265). Des Weiteren könnten die längeren C-Ketten (C10 und C18) auf der Mikropartikeloberfläche nicht mehr senkrecht nach oben stehen, sondern geknickt (263–265) und somit nicht mehr für die Fettsäurereste der Phospholipide zugänglich sein.

### *3.2.3.2 Die Bestimmung der Oberflächenbeladung der Mikropartikel*

Im Anschluss an die erfolgreiche Kopplung der Phospholipide CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 an die Mikropartikeloberfläche konnte die optimale Oberflächenbeladung der Mikropartikeloberfläche mit Phospholipiden bestimmt werden. Eine optimale Beladungsdichte der Mikropartikel ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung eines Assays und der damit verbundenen Reproduzierbarkeit (171,266,267). Die Beladungsdichte wurde mittels serieller Verdünnung der Phospholipide CL-Cy5 (Abb. 27) und PE-Cy5 (Abb. 54, Anhang) durchgeführt. Das Phospholipid PC-Cy5 konnte für die Verdünnungsreihe aufgrund von Konzentrationsunterschieden der Stocklösung (250 µg/ml) nicht wie die anderen Phospholipide (1 mg/ml) verwendet werden. Die Verdünnungsstufen 100 µg/µl und 200 µg/µl hätten aufgrund der Stockkonzentration fast unverdünnt eingesetzt werden müssen. Die Phospholipide befinden sich in einer Lösung von Chloroform mit 5 % Ethanol. Wie in Abb. 17 dargestellt, sind die Mikropartikel in Chloroform nicht stabil, erst ab einer Verdünnung von 1:2 mit Methanol kommt es zu keiner Aggregation der Mikropartikel. Die Phospholipide CL-Cy5 und PE-Cy5 wurden in den Konzentrationen 0,1 µg/µl bis 200 µg/µl auf die Mikropartikel gebunden. Das höchste Fluoreszenzsignal wurde nicht wie erwartet mit der höchsten Konzentration der Phospholipide erreicht (CL-Cy5 200 µg/µl und PE-Cy5 100 µg/µl), sondern mit jeweils der zweithöchsten Konzentration CL-Cy5 100 µg/µl und PE-Cy5 mit 20 µg/µl. Die höchste Konzentration der Phospholipide hat bei beiden zu einem Signalabfall oder einer sehr hohen Standardabweichung geführt (Abb. 61, Anhang). Dies könnte wie zuvor beschrieben

aufgrund sterischer Effekte der Moleküle und dem damit verbundenen Hook-Effekt (255,256,266,268) verursacht worden sein und somit die Bindung an der Mikropartikeloberfläche verhindert haben.



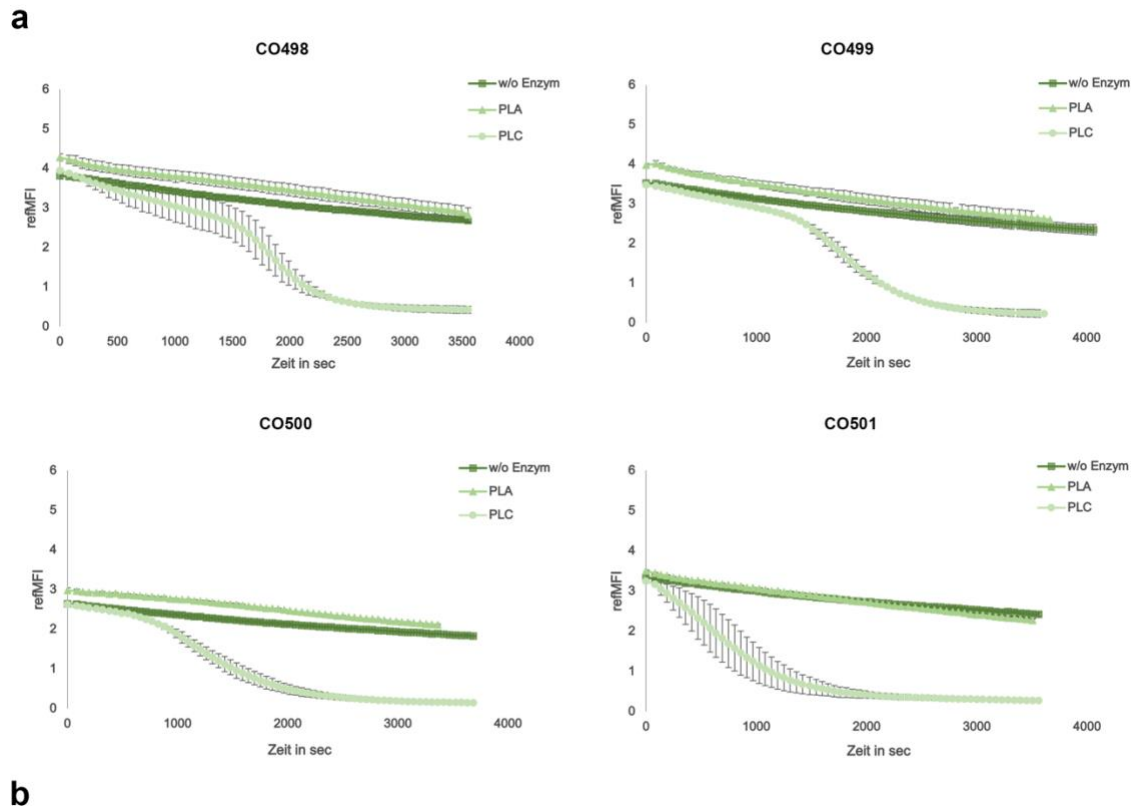
**Abb. 27: Oberflächenbeladung der Mikropartikel mit dem Phospholipid CL-Cy5**

Für die optimale Beladungsdichte der Mikropartikel wurden die Mikropartikel CO498, CO499, CO500 und CO501 mit unterschiedlichen Konzentrationen des Phospholipids CL-Cy5 (0,1 µg/µl bis 200 µg/µl) gekoppelt. Das höchste Fluoreszenzsignal wird mit einer Konzentration von 100 µg/µl des Phospholipids CL-Cy5 erreicht, eine höhere Konzentration führt bei allen Mikropartikel zur Reduktion des Signals.

### 3.2.3.3 Die gerichtete Bindung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche

Die verwendeten Phospholipide CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 sind am hydrophilen Teil, dem Kopf des Phospholipids, mit einem Cy5-Molekül markiert (Abb. 26). Nur aufgrund der Fluoreszenz an der Mikropartikeloberfläche lässt sich nicht sagen, mit welcher Ausrichtung das Phospholipid gebunden hat. Da die richtige Ausrichtung der Phospholipide jedoch für eine erfolgreiche Entwicklung eines Proof-of-Principle zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern zwingend erforderlich ist (269), musste eine Möglichkeit gefunden werden, die Ausrichtung der Phospholipide zu bestimmen. Infolge der Kontaktwinkelmessung (Abschnitt *Bestimmung der Hydrophobizität*) der Mikropartikel vor und nach der Bindung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche können schon Aussagen zur Ausrichtung der Phospholipide getroffen werden. Die Mikropartikel ohne Beladung sind hydrophob. Mikropartikel, die mit Phospholipiden gekoppelte sind, zeigen hingegen hydrophile Eigenschaften. Dies deutet darauf hin, dass die Phospholipide mit ihrem hydrophoben Teil, den

Fettsäureketten, an der Mikropartikeloberfläche gebunden sind und der hydrophile Teil, der Kopf, nach außen ragt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden enzymatische Experimente mit zwei unterschiedlichen Phospholipasen durchgeführt. Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung der zweiten Fettsäure an der sn-2-Position (179,180,270). Damit wird die zweite Fettsäure des Phospholipids entfernt. Wohingegen die Phospholipase C (PLC) die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zum Glyceringrundgerüst katalysiert (180,271,272) und somit den Kopf des Phospholipids entfernt. Sind die Phospholipide in gerichteter Weise mit ihrem hydrophoben Teil an die Mikropartikeln gebunden, sollte durch eine enzymatische Reaktion der PLC die Fluoreszenz über die Zeit abnehmen. Ob das Entfernen einer Fettsäurekette ausreicht, um das Phospholipid von der Mikropartikeloberfläche zu entfernen sollte über die enzymatische Reaktion mit der PLA<sub>2</sub> herausgefunden werden. Hierfür wurden alle Mikropartikel sowohl mit den Enzymen PLA<sub>2</sub> und PLC als auch ohne Enzym über 1 h inkubiert und mittels VideoScan-Technologie alle 40 s die Ligandenfluoreszenz der Mikropartikel gemessen. Die Reaktion ohne Enzym sollte zeigen, dass eventuell sichtbare Effekte nicht durch Bleaching des Farbstoffes (273,274), sondern durch die Enzyme selbst verursacht werden. Am Beispiel des Phospholipids PC-Cy5 ist in Abbildung 28 ersichtlich, dass das Fluoreszenzsignal für alle verwendeten Mikropartikel CO498, CO499, CO500 und CO501 (Abb. 28 a) über die Zeit reduziert wird (Tab. 17). Somit kann die Hypothese der gerichteten Bindung der Phospholipide mit ihren Fettsäureketten an der Mikropartikeloberfläche bestätigt werden. Diese gerichtete Bindung wird zum einen durch hydrophobe Wechselwirkungen des hydrophoben Teils des Phospholipids und zum anderen durch die gute Solvatisierung des polaren hydrophilen Teils des Phospholipids in Methanol erreicht (275). Methanol ist wie Wasser ein protisches Lösungsmittel und stellt somit Protonen zur Verfügung (276,277). Die abgegebenen Protonen wirken aufgrund ihrer elektrischen Ladung auf die Lösungsmitteldipole. Hierbei kommt es zu einer geordneten Struktur der Phospholipide im Lösungsmittel aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Kopf des Phospholipids (278,279). Die Hydrolyse der zweiten Fettsäurekette der Phospholipase A<sub>2</sub> bringt kaum eine Veränderung des Fluoreszenzsignals über die Zeit. Es reicht also nicht aus, eine Fettsäurekette zu entfernen, um die Bindung des Phospholipids zur Mikropartikeloberfläche umfangreich zu stören.



**Abb. 28: Gerichtete Bindung des Phospholipids PC-Cy5 an der Mikropartikeloberfläche**

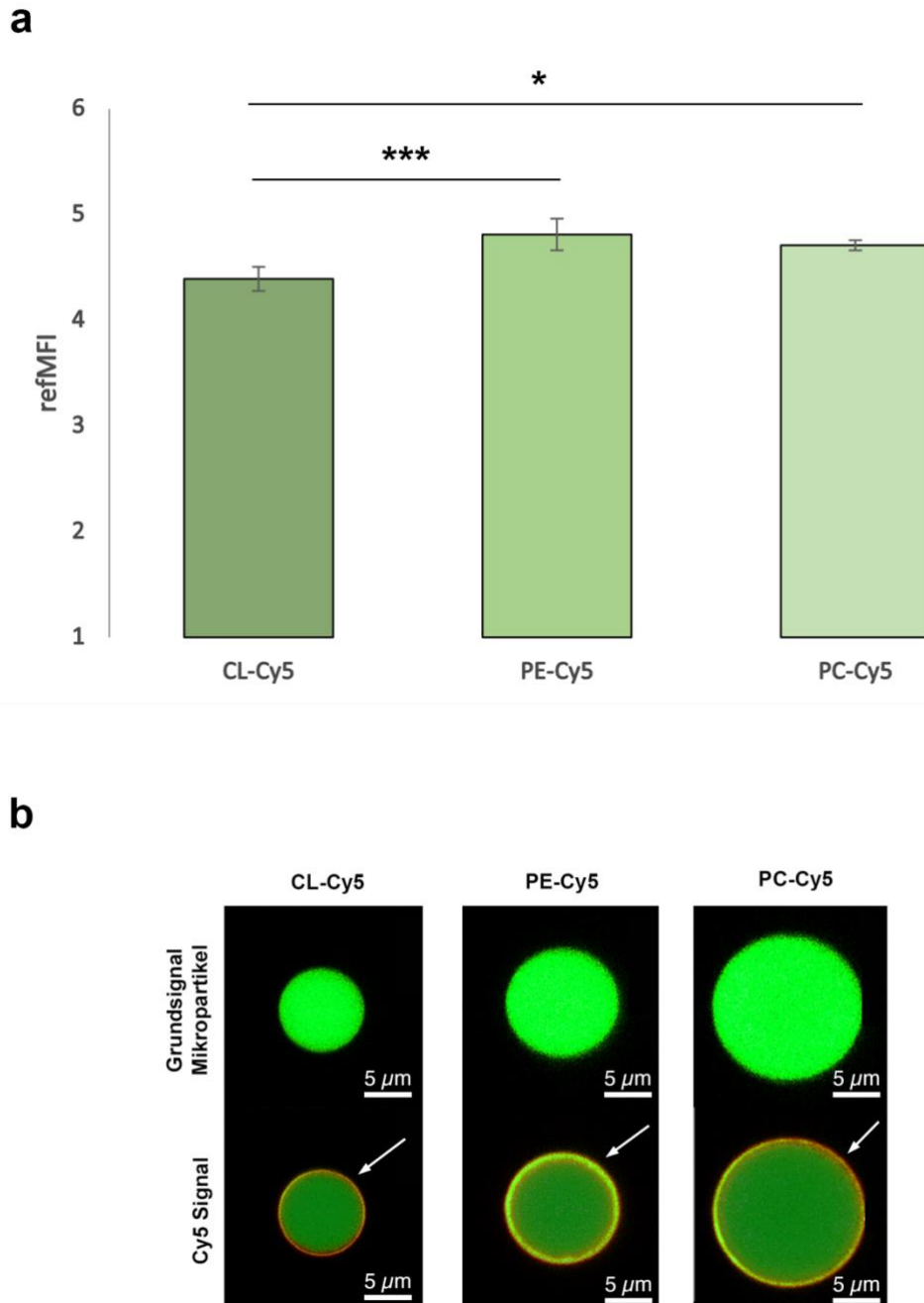
Zur Überprüfung der gerichteten Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide (Bindung mit dem hydrophoben Teil an der Mikropartikeloberfläche) wurden die gekoppelten Mikropartikel CO498, CO499, CO500 und CO501 mit zwei verschiedenen Phospholipasen  $PLA_2$  und PLC inkubiert. **a** Durch die Hydrolyse des hydrophilen Kopfes des Phospholipids vom GlycerinGrundgerüst entfernt die Phospholipase PLC das Fluorophor Cy5 vom Phospholipid, somit kommt es innerhalb 1 h zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals am Mikropartikel. Die Phospholipase  $PLA_2$  entfernt eine Fettsäurekette des Phospholipids, was nicht zur Reduktion der Fluoreszenz führt. Die Inkubation der mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel ohne Enzym zeigt, dass es sich nicht um Bleaching Effekte des Fluorophors Cy5 handelt. **b** Die visuelle Darstellung zeigt im oberen Teil der Abbildung das Grundsignal der Mikropartikel und im unteren Teil eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals der fluoreszenzmarkierten Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche. Im unteren Bild scheint die Grundfluoreszenz der Mikropartikel dunkler, dies ist jedoch nur ein Artefakt aufgrund der Überlagerung der Bilder.

Ebenso wenig bleached der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 über die Zeit so, dass eine Reaktion durch das Enzym PLC ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse konnten auch für die anderen beiden Phospholipide CL-Cy5 (Abb. 55, Anhang) und PE-Cy5 (Abb. 56, Anhang) bestätigt werden. Die visuelle Darstellung (Abb. 28 b) zeigt die enzymatische Reaktion mit den Phospholipasen PLA<sub>2</sub> und PLC. Auch hier ist mit dem bloßen Auge erkennbar, dass kaum ein Unterschied zwischen der Reaktion ohne Enzym (Links, unterer Teil des Bildes) und der Reaktion mit dem Enzym PLA<sub>2</sub> (Mitte, unterer Teil des Bildes) zu sehen ist. Betrachtet man jedoch den rechten Teil des Bildes, kann man eine Reduktion der Fluoreszenz klar und deutlich erkennen.

**Tab. 17: Messdaten der enzymatischen Reaktion der Phospholipase C**

Mikropartikel	CL-Cy5		PE-Cy5		PC-Cy5	
	P <sub>Anfang</sub>	P <sub>Ende</sub>	P <sub>Anfang</sub>	P <sub>Ende</sub>	P <sub>Anfang</sub>	P <sub>Ende</sub>
CO498	3,12	2,78	4,33	3,75	3,94	0,42
CO499	3,57	1,37	4,87	1,17	3,48	0,23
CO500	3,44	1,42	3,97	1,11	2,63	0,15
CO501	3,23	1,34	4,99	1,35	3,25	0,25

Die hydrophoben Mikropartikel werden stufenweise synthetisiert (176). Eine Vorstufe der Mikropartikel ist eine hydrophile poly-OH-Oberfläche ohne Silanisierung. Diese Vorstufe der Mikropartikel wurde verwendet, um ebenfalls die Phospholipide CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 zu binden. Die Mikropartikel wurden in gleicherweise wie die hydrophoben Mikropartikel für 3 h bei 28 °C und 1.200 rpm mit den Phospholipiden inkubiert. In Abbildung 29 ist ersichtlich, dass alle Phospholipide ebenfalls an dieser Vorstufe der Mikropartikel binden und ein Fluoreszenzsignal von mehr als einer refMFI 4 generieren. Im Vergleich dazu zeigt die visuelle Darstellung (Abb. 29) die Bindung der Phospholipide an der poly-OH-Oberfläche der Mikropartikel. Auch hier ist eine klare Ringfluoreszenz um die Mikropartikel erkennbar.



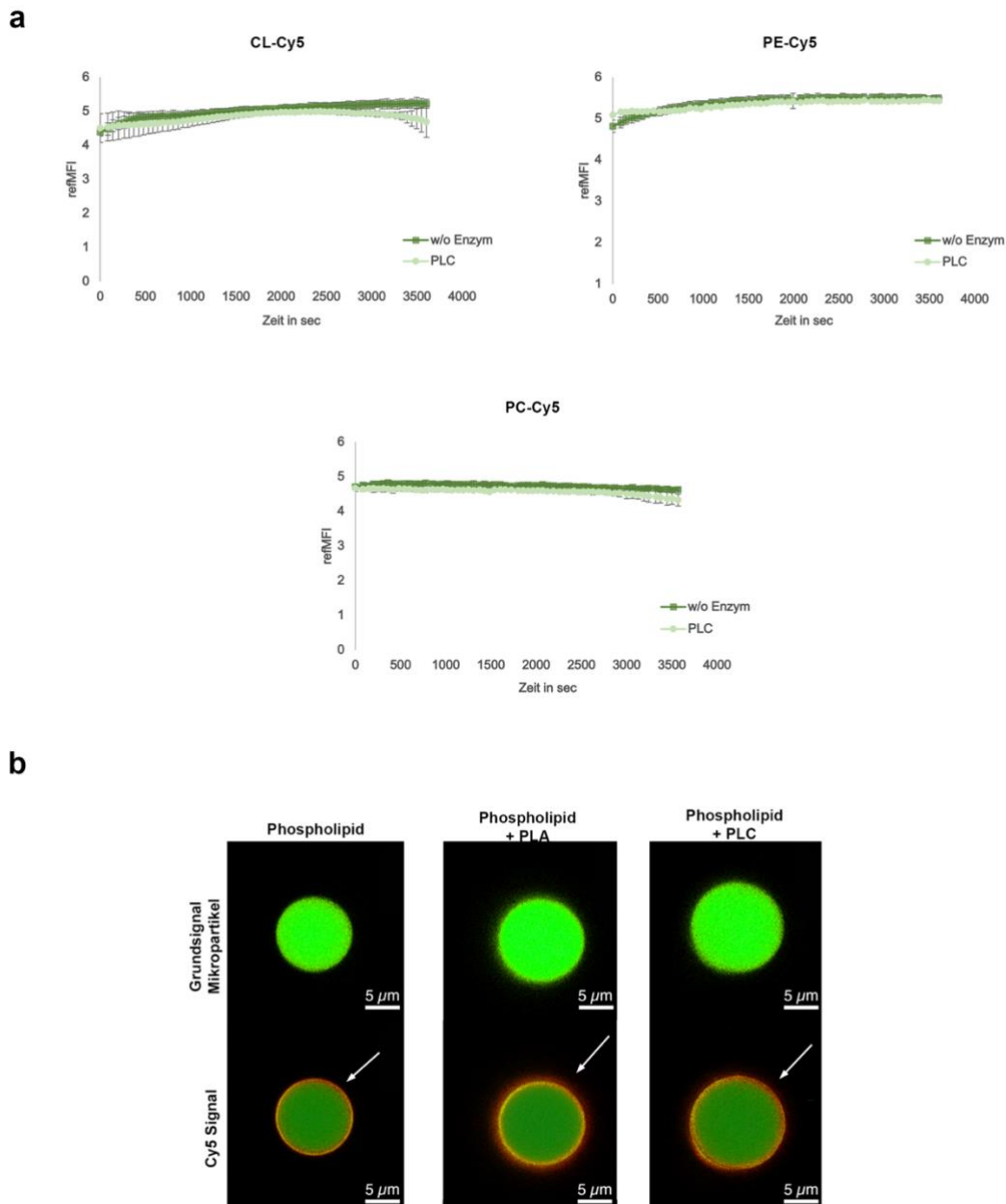
**Abb. 29: Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide an VMP69**

Mikropartikel mit einer poly-OH-Oberfläche wurden mit den fluoreszenzmarkierten Phospholipiden CL-Cy5, PE-Cy5 und PC-Cy5 gekoppelt. **a** Die Mikropartikel zeigen für alle Phospholipide ein Fluoreszenzsignal an der Mikropartikeloberfläche, somit konnten die Phospholipide erfolgreich an hydrophile Mikropartikel gebunden werden. **b** Die visuelle Darstellung der Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide an der poly-OH-Oberfläche von Mikropartikeln zeigt im oberen Teil des Bildes das Grundsignal der Mikropartikel. Im unteren Teil zeigen die Mikropartikel eine eindeutige Ringfluoreszenz und somit die gebundenen Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche. Signifikanzen sind mit \* angegeben (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Im unteren Bild scheint die Grundfluoreszenz der Mikropartikel dunkler, dies ist jedoch nur ein Artefakt aufgrund der Überlagerung der Bilder.

#### 3.2.3.4 *Wird für die gerichtete Bindung der Phospholipide eine hydrophobe Oberfläche benötigt?*

Anhand der zuvor dargestellten Ergebnisse der Bindung der Phospholipide auf der poly-OH-Oberfläche lässt sich die Hypothese aufstellen, dass für die gerichtete Bindung von Phospholipiden keine hydrophobe Oberfläche notwendig ist. Diese Hypothese galt es zu widerlegen. Wie bei der gerichteten Bindung gezeigt, kann durch die Phospholipase PLC der Kopf des Phospholipids und somit die damit verbundene Fluoreszenz entfernt werden. Sollte sich die Hypothese als richtig herausstellen, so müsste die erreichte Fluoreszenz an den Mikropartikel durch die Phospholipase PLC reduziert werden können. Wohingegen die Fluoreszenz nicht reduziert werden könnte, wenn die Phospholipide nicht gerichtet (mit ihren Fettsäuren) an der Mikropartikeloberfläche gebunden haben. Die mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel wurden mit der Phospholipase C für 1 h inkubiert und wiederum die Ligandenfluoreszenz alle 40 sec mit der VideoScan-Technologie gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz innerhalb 1 h nicht durch die enzymatische Reaktion der Phospholipase C reduziert werden konnte. Der Fluoreszenzwert bei der Reaktion mit und ohne Enzym blieb nahezu für alle drei Phospholipide identisch (Abb. 30 a). Die visuelle Darstellung der enzymatischen Reaktion bestätigte ebenfalls, dass es zu keiner Reduktion der Fluoreszenz kam. Die Mikropartikeloberfläche der VMP69 (Polymerisierungsvorstufe der Mikropartikel – poly-OH-Oberfläche) hat hydrophile Eigenschaften, der Kopf des Phospholipids mit der Fluoreszenz ebenfalls. In der Lösungsumgebung versuchen auch hier beide Komponenten die höchste thermodynamische Stabilität zu erreichen und bilden Wasserstoffbrücken aus (280,281). Somit kann die Hypothese, dass Phospholipide ohne die hydrophobe Oberfläche gerichtet binden, widerlegt werden. Für eine gerichtete Bindung der damit verbundenen Funktionalität des Assays ist es notwendig eine hydrophobe Mikropartikeloberfläche zu haben (269).

Auch durch die visuelle Darstellung der enzymatischen Reaktion (Abb. 30 b) kommt es zu keinen Unterschieden im Verhalten der Mikropartikel. Hier wird ebenfalls bestätigt, dass für eine gerichtete Bindung der Phospholipide eine silanisierte Oberfläche zwingend notwendig ist.



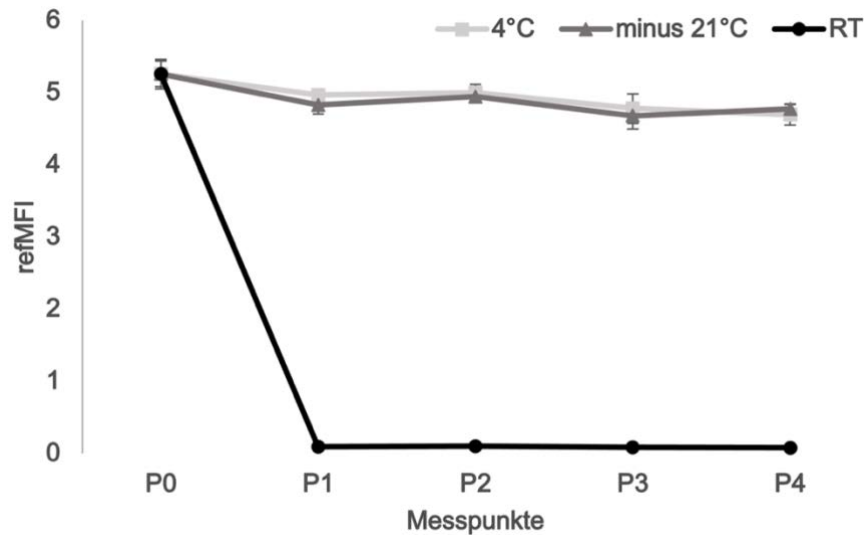
**Abb. 30: Verdau der Phospholipide mittels Phospholipasen – VMP69**

Mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden (CL-Cy5, PE-Cy5, PC-Cy5) gekoppelte poly-OH-Mikropartikel wurden mit der Phospholipase PLC für 1 h inkubiert. **a** Die Phospholipase PLC hydrolysiert den Kopf des Phospholipids vom GlycerinGrundgerüst. Es kommt zu keiner Reduktion der Fluoreszenz an der Mikropartikeloberfläche. Die Phospholipide binden mit ihrem hydrophilen Kopf an die poly-OH-Oberfläche der Mikropartikel und somit falsch herum. **b** Die visuelle Darstellung zeigt die Inkubation der gekoppelten poly-OH-Mikropartikel mit den Phospholipasen PLA2 und PLC im unteren Teil des Bildes. Hier ist ebenfalls keine Reduktion der Ringfluoreszenz an der Mikropartikeloberfläche sichtbar (gekennzeichnet durch einen weißen Pfeil). Der obere Teil des Bildes zeigt das Grundsignal der Mikropartikel. Im unteren Bild scheint die Grundfluoreszenz der Mikropartikel dunkler, dies ist jedoch nur ein Artefakt aufgrund der Überlagerung der Bilder.



### 3.2.4 Die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche

Die Stabilität der Biomoleküle auf der Mikropartikeloberfläche und die damit verbundene Reproduzierbarkeit des Assays ist ein wichtiger Punkt in der Entwicklung eines geeigneten Nachweises (269,282–285). Verschiedene Lagertemperaturen und -puffer können die Stabilität der Biomoleküle beeinflussen (286–288). Die gekoppelten Mikropartikel wurden in verschiedenen Puffern und Lösungen (TBS-T, Methanol, Ethanol, Isopropanol) inkubiert. Ebenso wurde die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, -21 °C, RT) bestimmt. Die Mikropartikel wurden nach der Kopplung in TBS-T (0,01% Tween® 20) über einen Zeitraum von 4 Wochen bei 4 °C, -21 °C und RT gelagert und jeweils die Fluoreszenzintensität mittels VideoScan-Technologie bestimmt. P0 stellt den Ausgangswert direkt nach der Kopplung der Mikropartikel und P1-P4 die Messung der Fluoreszenz nach je einer weiteren Woche dar. Erkennbar ist, dass die Signale bei den Phospholipiden CL-Cy5 (Abb. 31) und PE-Cy5 (Abb. 57, Anhang) mit der Zeit abnehmen. Das Phospholipid PC-Cy5 (Abb. 58, Anhang) hingegen zeigt einen Anstieg der Werte in den Folgewochen P1 und P2. Im Vergleich der Temperaturen von 4 °C (a) und -21 °C (b) lassen sich kaum Unterschiede feststellen. Wohingegen die Lagerung bei RT einen deutlichen Abfall des Fluoreszenzsignals bei allen Phospholipiden zur Folge hat. Den stärksten Signalabfall kann man beim Phospholipid CL-Cy5 (Abb. 31 c) erkennen. Hier wird das Signal um den Faktor 50 reduziert. Der geringste Signalabfall wird beim Phospholipid PE-Cy5 (Abb. 57 c, Anhang) erreicht, hier ändert sich das Signal um einen Faktor 3. Beim Phospholipid PC-Cy5 (Abb. 58 c, Anhang) kommt es zu einer Signaländerung um den Faktor 8.



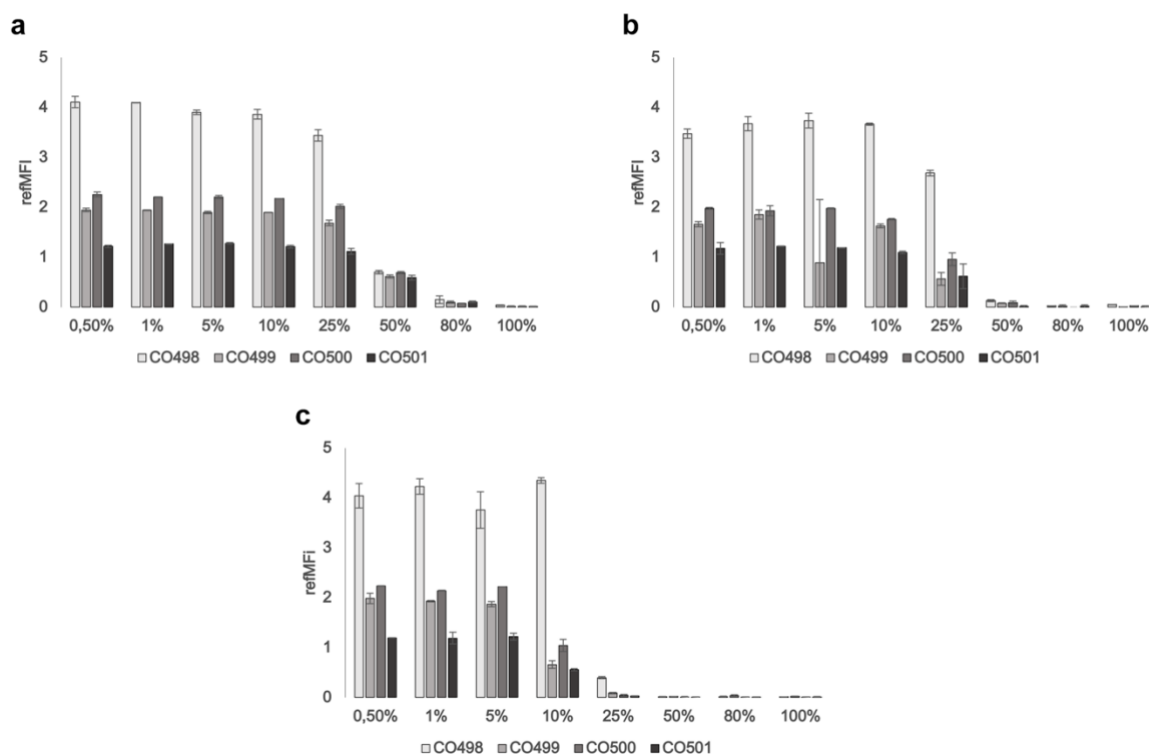
**Abb. 31: Stabilität des Phospholipids CL-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (CL-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen 4 °C, -21 °C und RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert von ungefähr 0.

Die Signalreduktion kann durch zwei verschiedene Gründe verursacht worden sein. Zum einen durch die überdurchschnittlich hohe RT (~26,8 °C) im Labor, aufgrund der Durchführung der Versuche im Sommer. Zum anderen kann das Fluoreszenzsignal durch die Erhöhung der Salz- bzw. Tween® 20-Konzentration im TBS-T-Puffer aufgrund von Verdunstungen des Puffers reduziert worden sein. Tween® 20 beeinflusst die Bindung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche negativ (289). Bei der Verwendung von TBS-T mit 0,05 % Tween® 20 anstelle von 0,01 % Tween® 20 beim Waschen der Mikropartikel nach der Kopplung der Phospholipide kommt es ebenfalls zu einem geringeren Fluoreszenzsignal (Faktor 1,5 geringeres Signal an Mikropartikeln mit TBS-T 0,05 % Tween® 20 gewaschen) an der Mikropartikeloberfläche. Die erhöhte Salzkonzentration kann die Bindung der Phospholipide an der Oberfläche beeinflussen. TBS besteht aus Natriumchlorid und TRIS. Sowohl Natrium-Ionen (Na<sup>+</sup>) als auch Chlorid -Ionen (Cl<sup>-</sup>) befinden sich in der Hofmeister-Reihe (290) jeweils ungefähr in der Mitte. Je weiter rechts die Anionen oder Kationen stehen, desto destabilisierende Wirkungen haben die chaotropen Ionen (291), wohingegen die weiter linksstehenden kosmotropen Ionen eine stabilisierende Wirkung besitzen (292). Die chaotropen Salze erhöhen die Löslichkeit der amphiphilen Moleküle im Wasser (293) und somit lösen sich die Phospholipide von der Mikropartikeloberfläche ab. Unter normalen Bedingungen des TBS-Puffers (NaCl

physiologische Bedingungen 100-500 mM) kommt es zu keiner oder nur einer sehr geringen Beeinflussung der Bindung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche (294), jedoch ist NaCl ein schwaches kosmotropes Salz (292). Wenn jedoch das Wasser im Puffer verdunstet, kommt es zu einer erhöhten Salzkonzentration und dies kann die Bindung der Phospholipide beeinflussen. Sowohl eine Temperatur von 4 °C oder -21 °C bietet sich für die Lagerung der gekoppelten Phospholipide an. Die Lagerung der Mikropartikel bei RT müsste durch weitere Versuche analysiert werden. Möglicherweise wird die Reduktion der Fluoreszenz beim Abdichten der Lagergefäße nicht verursacht. Unabhängig der verwendeten Mikropartikelpopulationen (CO512 - CO515 oder CO516 - CO519) zeigen diese ähnlichen Ergebnisse (Abb. 59 - 61, Anhang). Neben der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen sollte ebenfalls analysiert werden, wie sich die mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel in verschiedenen Alkoholen verhalten. Das Verhalten in Alkoholen ist dahingehend interessant, da die Phospholipide über den Alkohol Methanol an die Mikropartikel gekoppelt werden. Wichtig herauszufinden ist, ob die Phospholipide sich bei der Inkubation in verschiedenen Alkoholen ablösen und ob sie sich in allen verwendeten Alkoholen gleich verhalten. Hierfür wurden die Mikropartikel in Alkoholreihen (0,5 – 100 %) in Methanol, Ethanol und Isopropanol inkubiert (Abb. 32) und die Fluoreszenzintensität gemessen. Das Fluoreszenzsignal der gekoppelten Mikropartikel ist bei Konzentrationen bis zu 5 % in allen Alkoholen stabil, jedoch kommt es ab 10 % zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität bei Isopropanol (Abb. 32 c). Alkohole werden mit längeren Alkylketten immer hydrophober/unpolarer und somit unlöslicher in Wasser (281,295). Bei kurzkettigen Alkoholen dominiert die hydrophile OH-Gruppe (281). Möglicherweise spielt genau hier dieser Effekt schon bei den kurzkettigen Alkoholen Methanol, Ethanol und Isopropanol eine Rolle. Denn mit zunehmender Alkylkettenlänge (Methanol > Ethanol > Isopropanol) nimmt das Fluoreszenzsignal an den Mikropartikeln bei geringeren Prozentsätzen des Alkohols ab. Am Beispiel von Methanol, welcher der hydrophilste Alkohol in der homologen Reihe der Alkohole (281,295) darstellt, kommt es erst ab einem Prozentsatz von 50 % Methanol zu einer Reduktion der Fluoreszenz. Wohingegen es beim Isopropanol (der letzte Alkohol in dieser Reihe) schon ab einem Prozentsatz von 10 % zur Reduktion der Fluoreszenz kommt. Aufgrund des höheren Prozentsatzes des Alkohols in der Lösung kommt es zu einer stärkeren Interaktion zwischen dem Alkohol und den Phospholipiden, anstelle der Phospholipide und der Mikropartikeloberfläche. Das

bedeutet je unpolarer der Alkohol, desto stärker die Wechselwirkungen mit dem polaren Kopf des Phospholipids (296). Dadurch kann es zu einer anderen Anordnung der Phospholipidschwänze und somit zu einer geringeren Bindung an der Mikropartikeloberfläche kommen (297). Dieses Phänomen könnte die Reduktion der Fluoreszenz erklären. Obwohl das Fluoreszenzsignal in Methanol bis zu einer Konzentration von 50 % stabil scheint, ist es sinnvoller, die Mikropartikel in ihrem Waschpuffer (TBS – T, 0,01 % Tween® 20) zu lagern. Lagerungsexperimente mit Methanol über mehrere Wochen zeigten diffuse Änderungen der Fluoreszenzsignale über die Zeit. Die Signale sind beim ersten Messpunkt hoch und beim nächsten Messpunkt wieder niedrig. Dieses Auf und Ab lässt sich über mehrere Wochen beobachten (Daten nicht dargestellt). Hier könnte ebenfalls die Interaktion der Phospholipide mit den Alkoholen in Lösung und die damit verbundene Änderung des Prozentsatzes des Alkoholgehalts in der Lösung aufgrund von Verdunstungen eine Rolle spielen. Bei der Lagerung in TBS-T kommt es kaum zu Effekten der Fluoreszenzänderung innerhalb von vier Wochen. Möglicherweise ändert sich das Fluoreszenzsignal bei längerer Lagerung, dies müsste jedoch durch weitere Experimente herausgefunden werden.



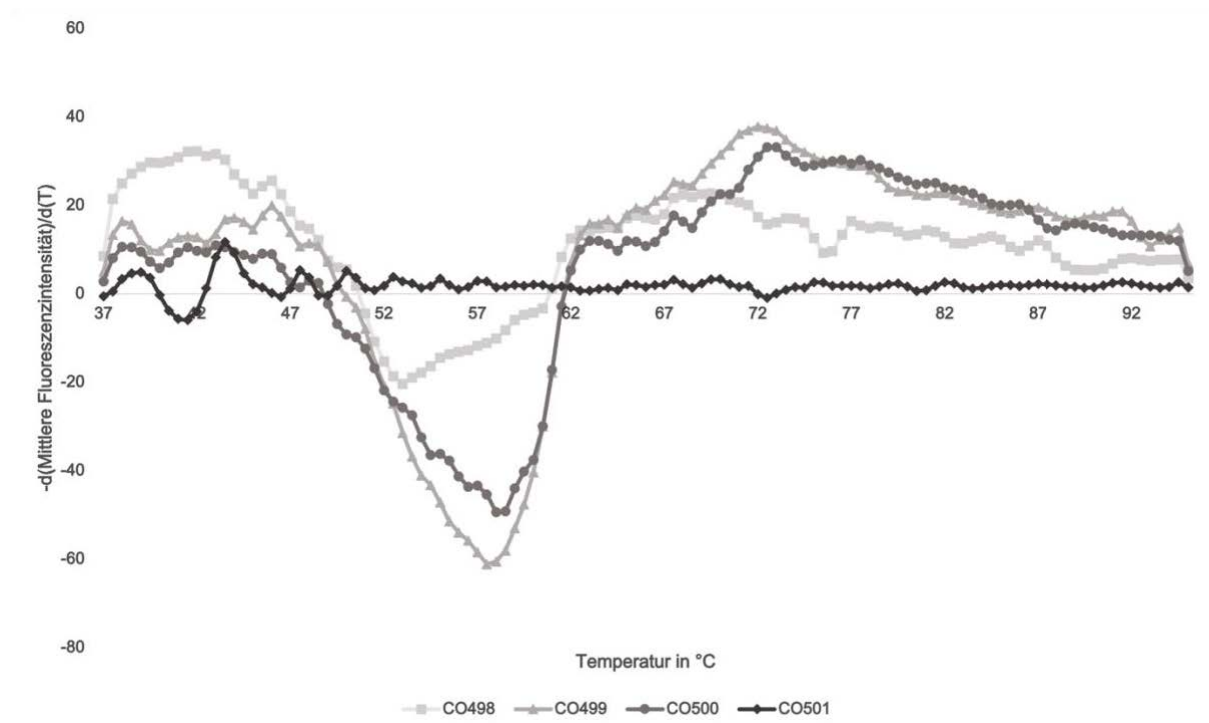
**Abb. 32: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche in Alkoholen**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (CL-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche wurde über die Lagerung in verschiedenen Alkoholen **a** Methanol, **b** Ethanol und **c** Isopropanol bestimmt. Die Mikropartikel wurden in verschiedenen Konzentrationen 0,5 % bis 100 % inkubiert. Die Phospholipide sind bis zu einer Alkoholkonzentration von 5 % stabil an der Mikropartikeloberfläche gebunden. Ab einer Konzentration von 50 % (Methanol), 25 % (Ethanol) und 10 % (Isopropanol) nimmt die Stabilität an der Oberfläche ab.

### 3.2.4.1 Abschmelzen fluoreszenzmarkierter Phospholipide von der Mikropartikeloberfläche

Ein weiterer Punkt, um die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche zu bestimmen, ist das Abschmelzen der Phospholipide mittels Schmelzkurvenanalyse. Der Schmelzpunkt symbolisiert den Zeitpunkt an dem 50% der Phospholipide vom Mikropartikel „abgeschmolzen“ und 50% an der Mikropartikeloberfläche gebunden sind (298). Die Fluoreszenzintensität der mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel wurde in 0,5 °C Temperaturschritten (37 °C bis 95 °C) gemessen, um so die Interaktion der Phospholipide mit der Mikropartikeloberfläche zu charakterisieren (260,299,300). Als Kontrolle, dass es nicht zum Bleaching des Farbstoffes Cy5 kommt, wurde das Phospholipid selbst, ohne Kopplung am Mikropartikel parallel gemessen. Die Kontrolle ist in Abb. 33 nicht dargestellt, da der Fluoreszenzwert sehr hoch, aber

konstant war. Wie in Abb. 33 ersichtlich, unterscheidet sich die Interaktion der Phospholipide mit der Mikropartikeloberfläche in Abhängigkeit der modifizierten Oberfläche. Das Phospholipid CL-Cy5 löst sich bereits bei einer Temperatur von 53 °C von der C3-modifizierten Oberfläche ab. Wohingegen das Ablösen des Phospholipids bei der C8- und C10-Modifizierung erst bei 58 °C erreicht wird. Ein Abschmelzen von der C18-Modifikation war jedoch nicht erkennbar, hierbei bleibt es bei einem konstanten Signal, welches jedoch sehr gering war. Beim Abschmelzen der anderen Phospholipide PE-Cy5 (Abb. 62, Anhang) und PC-Cy5 (Abb. 63, Anhang) kam es zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Weitere Versuche zur Bestätigung dieser Beobachtungen müssen noch durchgeführt werden.



**Abb. 33: Abschmelzen des Phospholipids CL-Cy5**

Um die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche zu bestimmen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse von 37 °C bis 95 °C für die Mikropartikelpopulationen CO499 bis CO501 durchgeführt. Die Mikropartikelpopulation CO499 zeigte eine Schmelztemperatur von 53 °C, CO499 und CO500 von 58 °C. An der Mikropartikelpopulation CO501 konnte kein Schmelzen beobachtet werden.

### 3.2.5 Assayentwicklung zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern

Aufgrund der Charakterisierung der Mikropartikel anhand verschiedener Kriterien wurden diese als hydrophobe, lösungsmittelstabile (organische Lösungsmittel)

Mikropartikelpopulationen klassifiziert. Fluoreszenzmarkierte Phospholipide binden aufgrund der modifizierten Mikropartikeloberfläche gerichtet. Im Anschluss an diese Voruntersuchungen konnte ein geeigneter Assay zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern entwickelt werden.

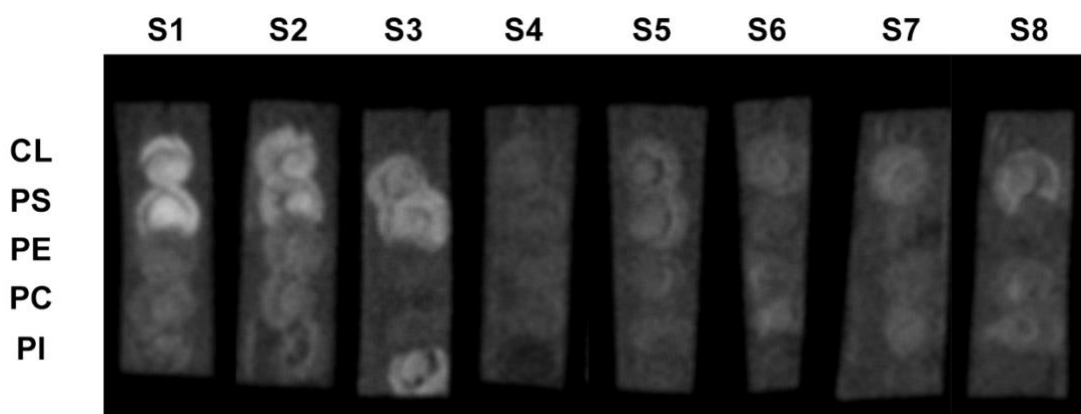
Anti-Phospholipid-Antikörper spielen bei Autoimmunerkrankungen wie dem Anti-Phospholipid-Syndrom eine Rolle (88,89,93,94). Für eine schnellere Diagnose soll hierfür ein geeigneter Nachweis an den Mikropartikeln entwickelt werden. Bisherige Methoden wie der Streifentest der Firma attomol GmbH benötigen unter anderem eine aufwendige Präparation der Membranen und viel Probenmaterial.

Als Vorstufe zur Entwicklung des Nachweises auf Mikropartikeln sollte ein geeigneter Assay zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern auf einer Membran etabliert werden. Dieser soll gleichzeitig als Kontrolle für spätere Versuchsdurchführungen am Mikropartikel dienen. Zur Entwicklung des Nachweises der Antikörper mussten eine geeignete Membran, geeignete Primärantikörper zum Nachweis der Phospholipide und fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper identifiziert werden. Sowohl Vorversuche als auch die Literatur zeigten, dass unbehandelte Nitrozellulosemembranen nicht für die Verwendung mit organischen Lösungsmitteln geeignet sind (301). Wenn diese mit organischen Lösungsmitteln in Kontakt kommen, lösen sie sich auf und sind nicht mehr verwendbar. Eine Alternative ist die low fluorescence Hybond PVDF-Membran. Diese ist sowohl hydrophob als auch lösungsmittelstabil (organische Lösungsmittel) und verhindert aufgrund ihrer Beschaffenheit ein hohes Hintergrundsignal bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (302). Der Proteinmakroarray, hier in Form eines DotBlots wird in der Molekularbiologie zum Nachweis von Biomolekülen eingesetzt (303). Verwendet wird dieser für die Identifikation, Analyse und den Nachweis von Proteinen. Für den hier verwendeten DotBlot wurden nicht wie bei Western Blots üblich, enzymkonjugierte Antikörper verwendet, sondern fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, da diese ebenfalls bei der Entwicklung des Nachweises an den Mikropartikeln eingesetzt werden sollten. Die Verwendung geeigneter Primärantikörper zum Nachweis der Phospholipide gestaltete sich als schwierig, da nur polyklonale Antikörper gegen das Modelbiomolekül Cardiolipin zu erschwinglichen Preisen zu beschaffen waren. Diese jedoch zeigten bei allen Vorversuchen unspezifische Bindungen sowohl an die Membran als auch in Verbindung mit den Sekundärantikörpern. Um trotzdem einen geeigneten Assay entwickeln zu können,

wurden Patientenserum (bereitgestellt durch die Firma attomol GmbH), positiv oder negativ auf Anti-IgG/IgM-Cardiolipin-Antikörper (Tab. 12), verwendet. Die verwendete geringe Anzahl an Seren ist aufgrund der geringen Betroffenheit von Patienten mit 0,3 – 1 % zu erklären (139,140). Im Weiteren wurden diese Seren ebenfalls zur Entwicklung eines Nachweises an den Mikropartikeln verwendet.

### 3.2.5.1 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper mittels DotBlot

Der DotBlot diente sowohl der Kontrolle als auch als Voraussetzung für den zu entwickelnden Nachweisassay am Mikropartikel. Für die Durchführung wurden acht verschiedene Seren getestet. Fünf der Seren S1-S8 sollten positiv auf IgG-Antikörper gegen Cardiolipin sein, drei der Seren sollten positiv auf IgM-Antikörper gegen Cardiolipin sein. Mittels DotBlot konnte gezeigt werden, dass die Seren S1 bis S3 positiv für Anti-IgG-Antikörper gegen die Phospholipide CL, PS und PI sind. Wohingegen alle anderen verwendeten Seren keine Signale in Verbindung mit dem Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern zeigten (Abb. 34, Tab. 18). Die Fluoreszenzsignale auf der Membran wurden mittels Densitometrie in ImageJ quantifiziert. In Tabelle 18 findet sich die Auswertung. Es wurde ein Schwellenwert von 90 für positive Signale festgelegt. Alle Signale unter 90 wurden als negatives Signal definiert.



**Abb. 34: DotBlot zum Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern**

Phospholipide (CL, PS, PE, PC und PI) wurden auf einer PVDF-Membran gespottet und mit 8 Patientenserum (S1-S8) und einem Anti-IgG-Antikörper Alexa Fluor® 647 inkubiert. Fluoreszenzsignale wurden mit der Software Densitometrie in ImageJ quantifiziert. Nur 3 der 8 Seren waren positiv für CL, PS (S1-S3) und PI (S3). Alles andere sind Hintergrundsignale.

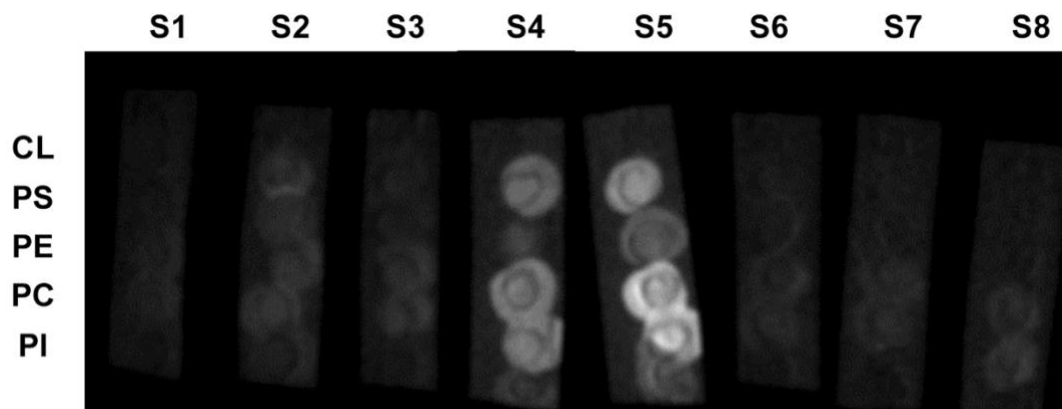


**Tab. 18: Grauwerte des DotBlots zum Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern**

Serum	CL	PS	PE	PC	PI
S1	137,38	147,99	79,95	80,55	72,21
S2	121,67	116,99	85,38	83,60	58,64
S3	105,42	118,34	58,19	56,669	95,84
S4	61,60	60,36	60,84	56,37	33,60
S5	72,26	78,93	65,98	64,22	53,86
S6	73,60	60,29	66,33	80,54	51,22
S7	84,06	57,00	68,34	79,08	54,55
S8	83,79	56,82	73,53	75,13	51,75

\*Grau schattierte Flächen zeigen Werte über dem Schwellenwert von 90 an. Ein Wert über 90 ist ein positives Signal.

Die gleichen Bedingungen und Schwellenwerte (< 90 negativ, > 90 positiv) wurden ebenfalls für den Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern angewendet. Hierbei zeigten zwei der acht Patientenserum (S4 und S5) positive Signale für den Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern gegen CL, PE und PC (Abb. 35, Tab. 19).

**Abb. 35: DotBlot zum Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern**

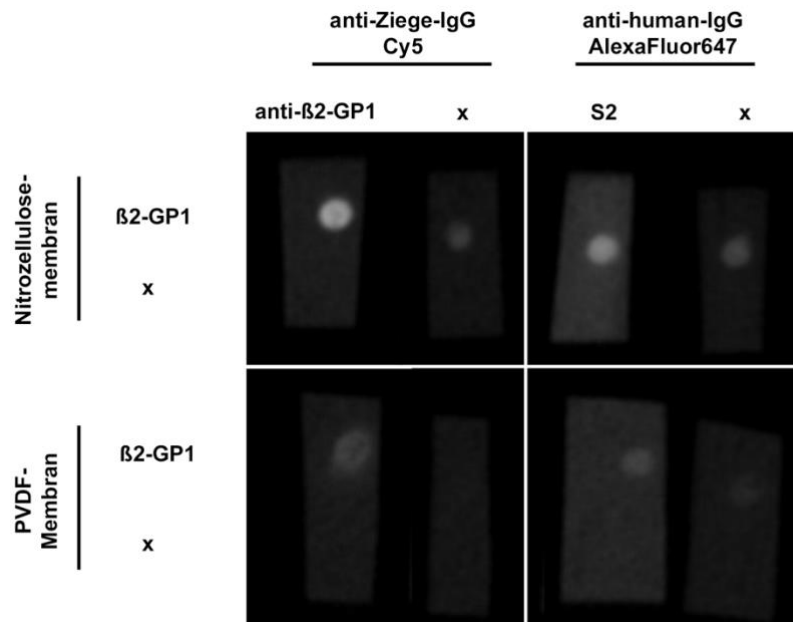
Phospholipide (CL, PS, PE, PC und PI) wurden auf einer PVDF-Membran gespottet und mit 8 Patientenserum (S1-S8) und einem Anti-IgM-Antikörper Alexa Fluor® 647 inkubiert. Fluoreszenzsignale wurden mit der Software Densitometrie in ImageJ quantifiziert. Nur 2 der 8 Seren waren positiv für CL, PE und PC (S4, S5). Alles andere sind Hintergrundsignale.

Tab. 19: Grauwerte des DotBlots zum Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern

Serum	CL	PS	PE	PC	PI
S1	18,92	20,44	26,87	28,49	18,38
S2	43,14	41,03	44,62	45,22	29,38
S3	27,55	26,54	38,48	43,59	22,87
S4	91,12	54,38	104,02	107,59	46,96
S5	125,15	81,80	167,91	158,88	69,38
S6	24,92	25,29	33,84	35,41	21,97
S7	23,66	24,09	35,96	36,18	18,96
S8	20,73	22,23	37,37	44,76	19,78

\*Grau schattierte Flächen zeigen Werte über dem Schwellenwert von 90 an. Ein Wert über 90 ist ein positives Signal.

Im Anschluss an die Detektion der Anti-Phospholipid-Antikörper über Patientenserum mittels DotBlot sollte ein weiteres wichtiges Lipoprotein, Apolipoprotein H ( $\beta$ 2-GP1), mit Hilfe eines aufgereinigten Primärantikörpers und eines Serums im DotBlot detektiert werden. Hierfür wurden sowohl eine Nitrozellulosemembran als auch die zuvor genannte PVDF-Membran verwendet. Um unspezifische Bindungen in der Detektion der Anti-Phospholipid-Antikörper ausschließen zu können, wurde in diesem DotBlot sowohl mit und ohne Primärantikörper detektiert (Abb. 36). Sowohl mit dem aufgereinigten Primärantikörper als auch mit dem Serum S2 konnte das Lipoprotein  $\beta$ 2-GP1 nachgewiesen werden. Dieses Serum konnte somit in künftigen Experimenten genutzt werden. Nur durch den Einsatz der PVDF-Membran konnten keine unspezifischen Bindungen detektiert werden. Wohingegen die Nitrozellulosemembran in allen Reaktionen unspezifische Bindungen aufweist, was wiederum an der hohen Bindungsaffinität der Membran liegen kann. Die verwendete Nitrozellulosemembran hat eine hohe Bindungskapazität für Proteine und Biomoleküle eines weiten Spektrums an Molekulargewicht (304). Auch hier zeigt sich die Verwendung der PVDF-Membran für die Durchführung eines DotBlots mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Verbindung mit Patientenseren als geeigneter als die Nitrozellulosemembran.



**Abb. 36: DotBlot zum Nachweis von β2-GP1**

β2-GP1 wurde sowohl auf einer Nitrozellulosemembran als auch auf einer PVDF-Membran mittels aufgereinigter Antikörper (Anti-β-2PG1) und einem Serum (S2) und entsprechenden Sekundärantikörpern (Anti-Maus-IgG Cy5 und Anti-human-IgG Alexa Fluor® 647) nachgewiesen. Auf der Nitrozellulosemembran sind unspezifische Signale für beide Sekundärantikörper sichtbar. Die PVDF-Membran zeigt nur spezifische Signale.

Nach der erfolgreichen Entwicklung eines Nachweises von Anti-Phospholipid-Antikörpern und dem Lipoprotein β2-GP1 konnte der Assay auf die Mikropartikel übertragen werden. Wie im Abschnitt *Kopplung von Biomarkern an die Mikropartikeloberfläche* beschrieben, können fluoreszenzmarkierte Phospholipide gerichtet (hydrophober Teil) und stabil an die Mikropartikeloberfläche gebunden werden. Eine gerichtete Bindung mit dem hydrophoben Teil des Phospholipids ist notwendig, damit eine immunogene Reaktion (305) stattfinden und so der Antikörper den Kopf des Phospholipids binden kann. Im Anschluss an die Bindung der Anti-Phospholipid-Antikörper aus dem Serum bindet der fluoreszenzmarkierte Antikörper den Primärantikörper und somit entsteht eine messbare Ringfluoreszenz um die Mikropartikel. Die Durchführung des Assays wurde sowohl mittels VideoScan-Technologie als auch mit der Durchflusszytometrie gemessen.

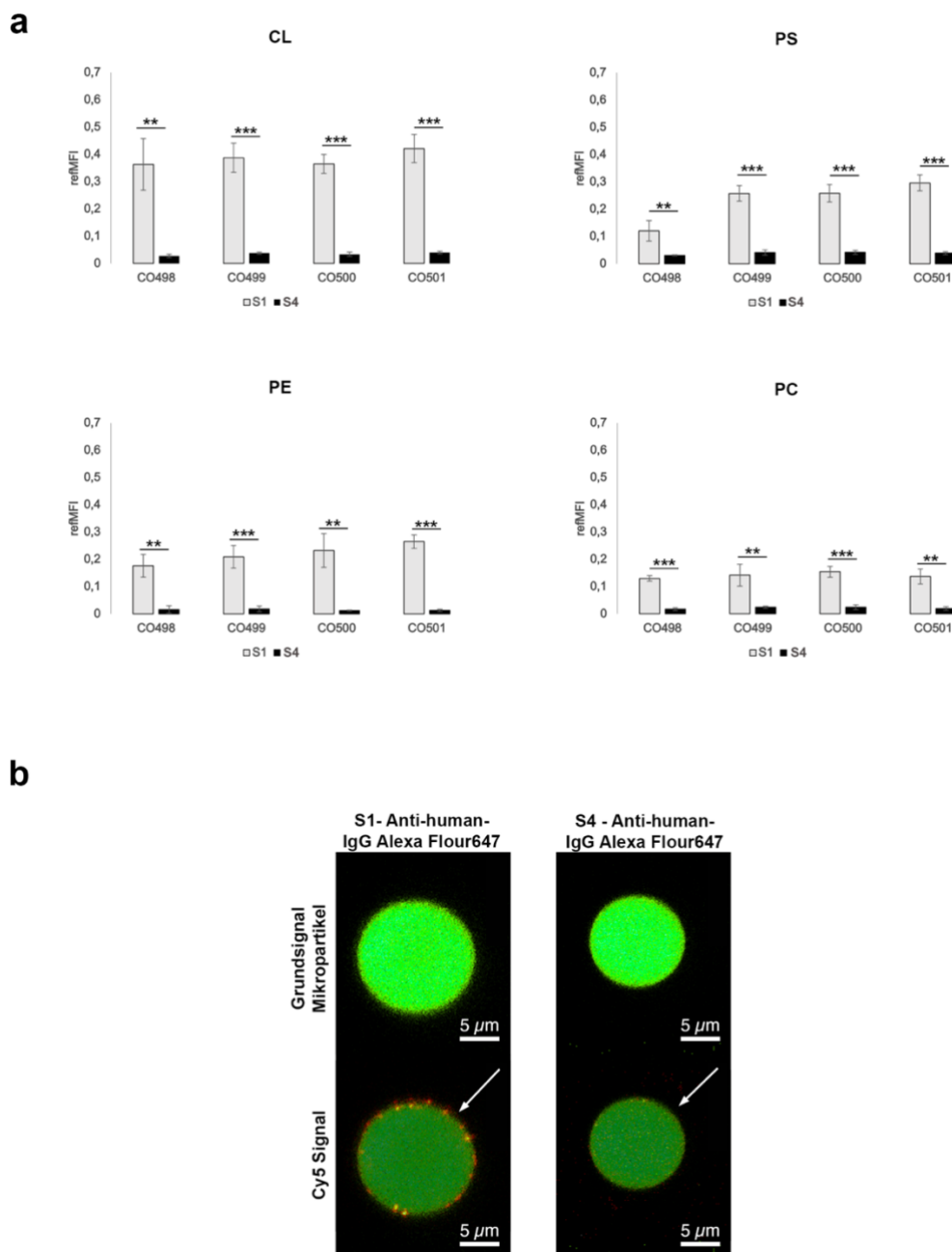
### 3.2.5.2 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper mittels VideoScan-Technologie

Durchgeführt wurde der Nachweis mit Anti-IgG/IgM-Phospholipid-Antikörpern aus den zuvor getesteten Patientenseren im DotBlot. Hierfür wurden jeweils ein IgG- und ein

IgM-positives Serum verwendet. Aufgrund der Rarität der positiven Seren (306) wurden für den Transfer des Assays und die damit verbundene Etablierung nur zwei Seren verwendet.

#### Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern in humanem Serum

In Einzelmessungen wurden jeweils die Phospholipide CL, PS, PE und PC (Abb. 37 a) mit Hilfe der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper aus dem Serum S1 an allen Mikropartikelpopulationen mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen (C3-C18) nachgewiesen. Das höchste Fluoreszenzsignal wurde beim Nachweis der Anti-Cardiolipin-Antikörper mit refMFI 0,42 an der Mikropartikelpopulation CO501 erreicht (Abb. 37a). Alle mit dem IgG-positiven Serum S1 erreichten Fluoreszenzwerte (Tab. 20) unterschieden sich signifikant (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) von den Werten des IgG-negativen Serum S4. Somit können die mit S1 erreichten Werte als positives Signal angesehen werden. Vergleicht man die erreichten Fluoreszenzsignale aus dem Mikropartikelassay mit den erreichten Ergebnissen aus dem DotBlot (Abb. 34), zeigen sich nur Übereinstimmungen beim Nachweis von Anti-Cardiolipin und Anti-Phosphatidylserin-Antikörpern im Serum, jedoch gibt es keine eindeutig positiven Signale für den Nachweis von Anti-Phosphatidylethanolamin und Anti-Phosphatidylcholin-Antikörpern. Die Fluoreszenzwerte vom Nachweis der Anti-Phosphatidylcholin-Antikörper zeigen einen Maximalwert von refMFI 0,154. Dieser Wert liegt unter refMFI 0,2 und kann somit auch als negatives Signal gewertet werden. In früheren Experimenten wurde eine refMFI über 0,2 als positives Signal gewertet, alle Werte unter 0,2 sind negative Signale. Für alle Messungen wurde ein Cut-off-Wert von refMFI 0,2 festgelegt (berechnet aus allen negativen Kontrollen). Nach dieser Einordnung würde es auch für den Nachweis von Anti-PC-Antikörpern eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem DotBlot geben. Beim direkten Vergleich der Fluoreszenzwerte von Anti-PS-Antikörpern und den Anti-PE-Antikörpern gibt es im Mikropartikelassay kaum einen Unterschied. Somit stimmen die Ergebnisse für den Nachweis der Anti-PE-Antikörper nicht mit den Ergebnissen aus dem DotBlot überein.



**Abb. 37: Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern mittels VideoScan-Technologie**

Die Phospholipide CL, PS, PE und PC wurden an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen (CO499 – CO501) gekoppelt und über zwei Seren (S1 und S4) und einem Anti-human-IgG-Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 nachgewiesen. **a** Alle Fluoreszenzsignale vom positiven Serum S1 unterscheiden sich signifikant (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) vom negativen Serum S4. Das höchste Fluoreszenzsignal zum Nachweis der humanen Anti-Phospholipid-Antikörper wird gegen CL erreicht. Die Messsignale wurden mittels VideoScan-Technologie generiert. **b** Die visuelle Darstellung des Nachweises der Anti-Phospholipid-Antikörper zeigt im oberen Teil das Grundsignal der Mikropartikel und im unteren Teil das entstandene Fluoreszenzsignal nach Durchführung des Assays. Nur für das Serum S1 ist eine Ringfluoreszenz (durch weißen Pfeil gekennzeichnet) sichtbar. Im unteren Bild scheint die Grundfluoreszenz der Mikropartikel dunkler, dies ist jedoch nur ein Artefakt aufgrund der Überlagerung der Bilder.

**Tab. 20: Fluoreszenzwerte des Nachweises der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper [in refMFI]**

Phospholipide/Seren	CO498		CO499		CO500		CO501	
	S1	S4	S1	S4	S1	S4	S1	S4
CL	0,36	0,03	0,39	0,04	0,37	0,03	0,42	0,04
PS	0,12	0,03	0,26	0,04	0,26	0,04	0,30	0,04
PE	0,18	0,02	0,20	0,02	0,23	0,01	0,27	0,01
PC	0,13	0,02	0,14	0,03	0,15	0,02	0,14	0,02

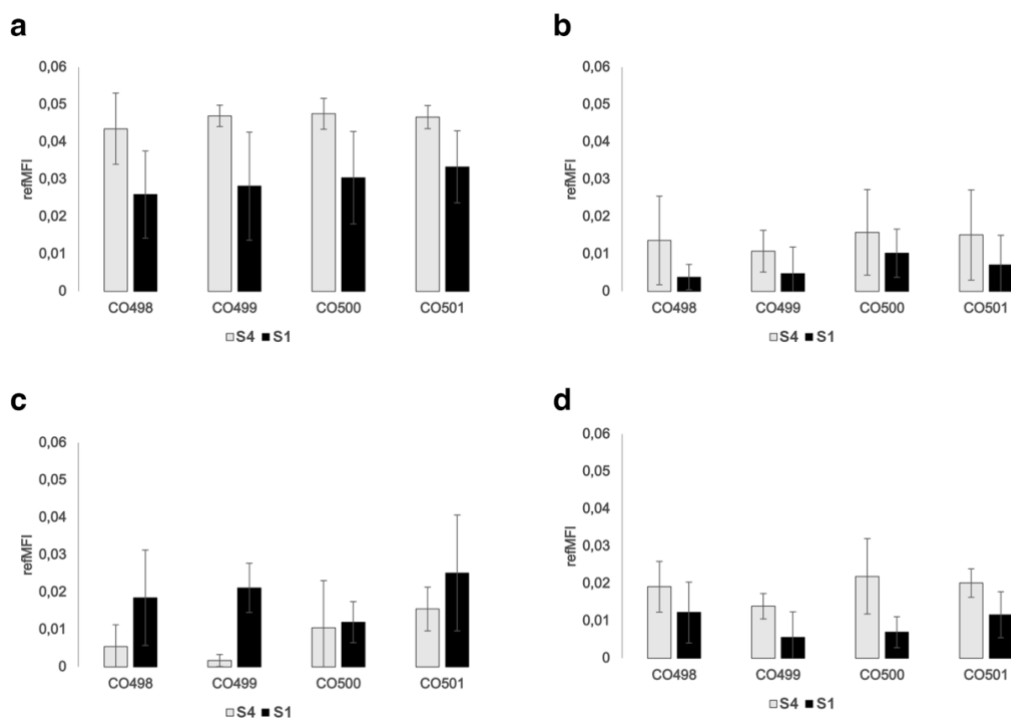
\*Grau schattierte Flächen zeigen positive Werte

Die visuelle Darstellung des durchgeführten Nachweises der Anti-Cardiolipin-Antikörper aus dem Serum S1 und dem Serum S4, zeigt ebenfalls nur ein Fluoreszenzsignal bei der Verwendung des Serums S1 (Abb. 37 b). Wohingegen beim Serum S4 nur eine Hintergrundfluoreszenz der Mikropartikelpopulation sichtbar wird, jedoch aber keine eindeutige Ringfluoreszenz. Die Färbung der Mikropartikeloberfläche ist aufgrund des niedrigen Fluoreszenzsignals gering. Ein Unterschied zum IgG-negativen Serum S4 ist jedoch sowohl mit dem bloßen Auge als auch mit der VideoScan-Technologie eindeutig erkennbar. Die Übertragung des Nachweises der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper vom DotBlot auf die Mikropartikel war erfolgreich. Für weitere Ergebnisse müssen mehr Patientenserum getestet und mittels DotBlot validiert werden.

#### Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern in humanem Serum

Der Nachweis der Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper sollte ebenfalls von der Membran auf die Mikropartikel übertragen werden. Die Vorgehensweise gestaltete sich identisch zur Übertragung des IgG-Nachweises. Jedoch wurden hier anstelle der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper mittels  $FC_{5\mu}$ -spezifischem Sekundärantikörper nachgewiesen. Bei der Übertragung des Assays auf die Mikropartikelpopulationen kam es jedoch zu Problemen. Keines der eingesetzten Phospholipide konnte, wie zuvor im DotBlot über Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper, am Mikropartikel nachgewiesen werden (Abb. 38, Tab. 21). Alle erzielten Werte lagen weit unter einer refMFI von 0,2. Im DotBlot konnten IgM-Antikörper gegen CL, PE und PC nachgewiesen werden. Im Mikropartikelassay konnte jedoch keines der Ergebnisse bestätigt werden. Als Ursache ausgeschlossen werden können die einzelnen Assaykomponenten selbst, da diese wie im funktionierenden Nachweis

durch den DotBlot auch im Mikropartikelassay eingesetzt wurden. Weiterhin ausgeschlossen werden kann das Konkurrieren zwischen IgG- und IgM-Antikörpern, sowie das Binden des Sekundärantikörpers an andere IgM-Antikörper im Serum. Das Serum S4 wurde im Nachweis gegen IgG-Antikörper negativ getestet und zeigte kein positives Fluoreszenzsignal (Abb. 37). Mögliche Ursachen für das Misslingen des Nachweises können sterische Effekte aufgrund der Größe der IgM-Antikörper sein (266,268). IgM-Antikörper besitzen eine Größe von 900 kDa, wohingegen ein IgG-Antikörper nur eine Größe von 150 kDa aufweist (307,308). Somit ist ein IgM-Antikörper 6x so groß wie ein IgG-Antikörper. Möglicherweise stören die IgM-Antikörper sich gegenseitig bei der Bindung an die Phospholipidköpfe. Sollten die Phospholipide nicht mit allen (2 oder 4) Fettsäuren an der Mikropartikeloberfläche gebunden haben, so kann es sein, dass diese nicht in der richtigen Ausrichtung von der Mikropartikeloberfläche weg ragen und somit die großen IgM-Antikörper nicht an die Phospholipide, ohne zu stören, binden können. Weiterhin kann es sein, dass die IgM-Antikörper die Phospholipide binden, jedoch der Sekundärantikörper nicht an die Bindungsstelle, welche sich am  $Fc_{5\mu}$  befindet, binden kann.



**Abb. 38: Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern mittels VideoScan-Technologie**

Die Phospholipide CL (a), PS (b), PE (c) und PC (d) wurden an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen (CO499 – CO501) gekoppelt und über zwei Seren (S1 und S4) und einem Anti-human-IgM-Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 nachgewiesen. Keines der Phospholipide wurde mittels Anti-Phospholipid-Antikörper gebunden und durch einen Anti-human-IgM-Sekundärantikörper nachgewiesen.

**Tab. 21: Fluoreszenzwerte des Nachweises der Anti-IgM-Phospholipid-Antikörper [in refMFI]**

Phospholipide/Seren	CO498		CO499		CO500		CO501	
	S4	S1	S4	S1	S4	S1	S4	S1
CL	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,01	0,01
PS	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01
PE	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,02	0,03
PC	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01

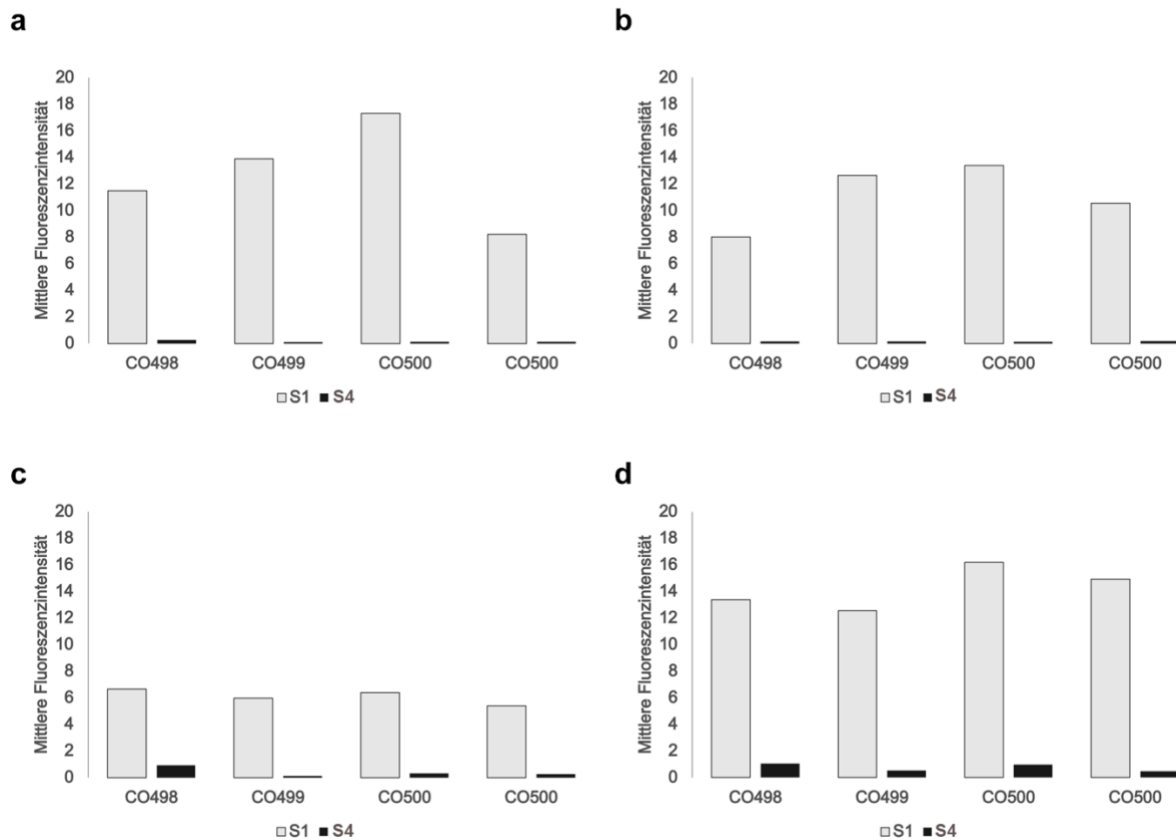
### 3.2.5.3 Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper mittels Durchflusszytometrie

Neben den zuvor genutzten Techniken des DotBlots und der VideoScan-Technologie sollte der Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper auch mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden.



### Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern in humanem Serum

Der Nachweis der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper aus dem Serum S1 konnte neben dem DotBlot und der VideoScan-Technologie auch mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden. Auch hier können Anti-CL-Antikörper (Abb. 39 a) und Anti-PS-Antikörper (Abb. 39 b) eindeutig nachgewiesen werden. Wohingegen der Nachweis der Anti-PE-Antikörper (Abb. 39 c) im Vergleich zur VideoScan-Technologie nicht möglich ist. Der Nachweis der Anti-PC-Antikörper zeigt in der Durchflusszytometrie im Gegensatz zur VideoScan-Technologie und dem DotBlot ein eindeutig positives Signal (Abb. 39 d). In Allen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Serum S1 positive Ergebnisse im Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper zeigt und das Serum S4 negative Ergebnisse. Wie zuvor beschrieben, könnten die gemessenen Signale beim Nachweis der Anti-PC-Antikörper falsch positive Signale aufgrund von Falschmessungen der Durchflusszytometrie sein. Bei der Durchflusszytometrie werden keine Artefakte wie zusammengelagerte Mikropartikel, Staub oder Luftblasen wie bei der VideoScan-Technologie von der Messung ausgeschlossen (167,309). Hierbei kann es zu falsch-positiven Ergebnissen gekommen sein. Um diese auszuschließen, müssen weitere Experimente mit der Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse dienen aufgrund ihrer zu geringen Wiederholungszahl allein der Veranschaulichung der Funktionsweise des Nachweises der Anti-Phospholipid-Antikörper am Mikropartikel.

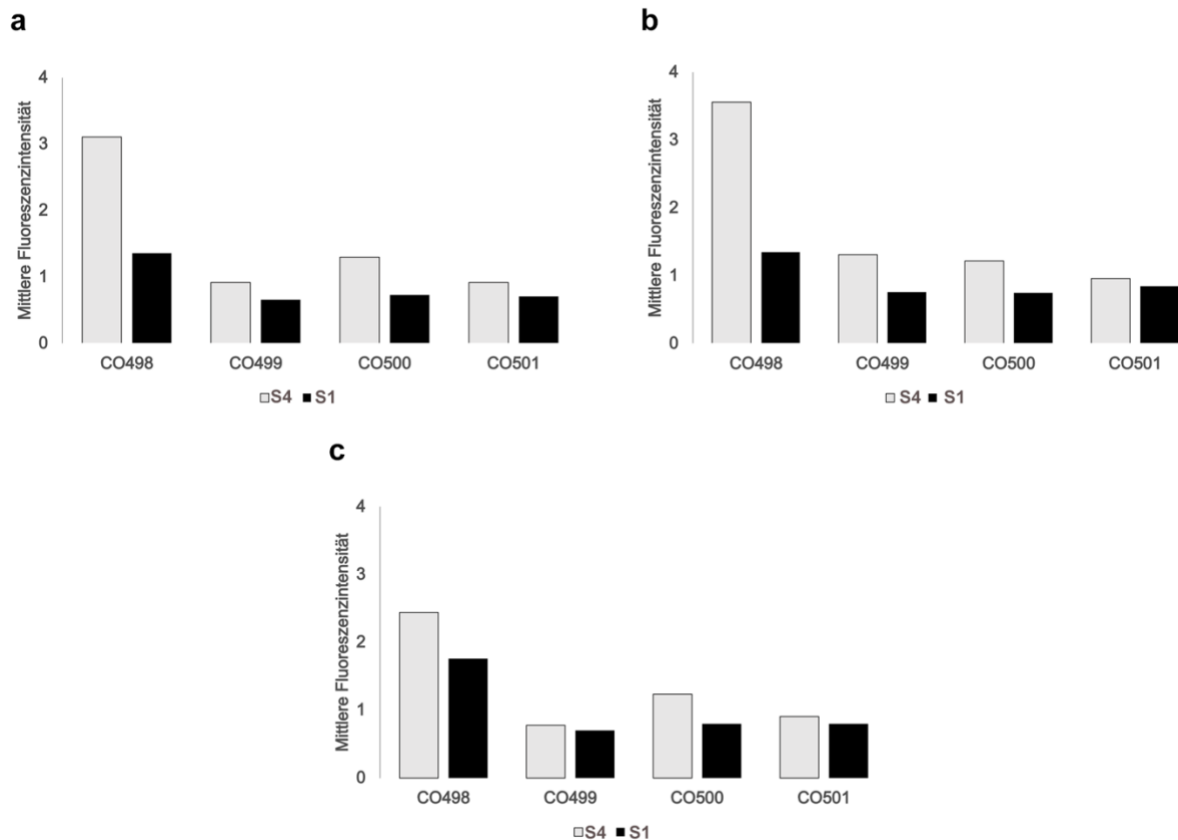


**Abb. 39: Nachweis von Anti-IgG-Phospholipid-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie**

Die Phospholipide CL (a), PS (b), PE (c) und PC (d) wurden an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen (CO499 – CO501) gekoppelt und über zwei Seren (S1 und S4) und einem Anti-human-IgG-Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 nachgewiesen. Alle Ergebnisse der Fluoreszenzsignale vom positiven Serum S1 unterscheiden sich vom negativen Serum S4. Das höchste Fluoreszenzsignal zum Nachweis der humanen Anti-Phospholipid-Antikörper wird gegen CL erreicht. Die Messsignale wurden mittels Durchflusszytometrie generiert.

Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern in humanem Serum

Bei der Durchführung des Assays zum Nachweis der IgM-Antikörper mittels Durchflusszytometrie konnten die Ergebnisse, ermittelt durch die VideoScan-Technologie, bestätigt werden. Auch hier konnten im Vergleich zum Nachweis der IgG-Antikörper keine positiven Fluoreszenzsignale erzielt werden (Abb. 40). Der Nachweis der Anti-IgM-PC-Antikörper konnte aufgrund der zu geringen Mengen (niedrigere Stock Konzentration als die anderen Phospholipide) des Phospholipids Phosphatidylcholin am Durchflusszytometer nicht durchgeführt werden.



**Abb. 40: Nachweis von Anti-IgM-Phospholipid-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie**

Die Phospholipide CL (a), PS (b), PE (c) wurden an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen (CO499 – CO501) gekoppelt und über zwei Seren (S1 und S4) und einem Anti-human-IgM-Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 nachgewiesen. Keines der Phospholipide wurde mittels Antiphospholipid-Antikörper gebunden und durch einen Anti-human-IgM-Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Messsignale wurden mittels Durchflusszytometrie generiert.

### 3.2.6 Optimierung zur Signalverstärkung an der Mikropartikeloberfläche

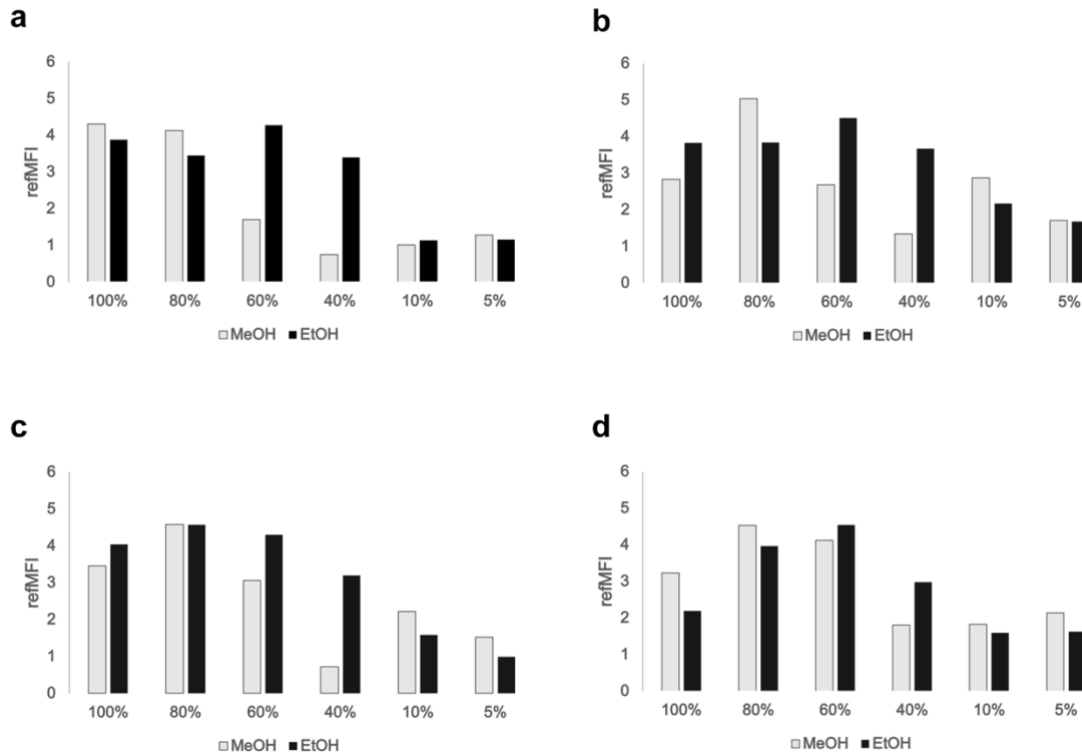
Die Entwicklung eines Assays zur Anwendung in der Diagnostik setzt eindeutige Ergebnisse voraus. Eindeutige Ergebnisse sind spezifisch und zeigen einen signifikanten Unterschied zu Negativkontrollen. In der Entwicklung des Nachweises für Anti-Phospholipid-Antikörper konnten spezifische Ergebnisse erzielt werden, jedoch sind die erreichten Fluoreszenzsignale im Vergleich zu anderen entwickelten Nachweisen an der VideoScan-Technologie mit einer refMFI von ~ 0,4 sehr niedrig. Um aus dem Proof-of-Principle einen anwendbaren Assay in der Diagnostik zu erzeugen, bedarf es einiger Optimierungen, wie der Signalverstärkung oder Multiplexanwendungen zum simultanen Nachweis mehrere Biomarker gleichzeitig.

Eine Signalverstärkung könnte durch optimierte Kopplungs- und Waschpuffer erreicht werden. Für eine Multiplexanwendung werden mehrere unterscheidbare (Fluoreszenzkodierung und Größe) Mikropartikelpopulationen benötigt (167).

### *3.2.6.1 Optimierung der Puffersysteme für die Bindung der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche*

Eine Signalverstärkung sollte aufgrund verschiedener Kopplungs- und Waschpuffer erreicht werden. Ein entscheidender Schritt für die Funktionalität des Assays ist die Bindung der Phospholipide in optimaler Beladungsdichte auf der Mikropartikeloberfläche (171,266,267). Befinden sich zu wenig gebundene Phospholipide auf der Mikropartikeloberfläche, kommt es automatisch beim Nachweis durch spezifische Antikörper zu einem geringeren Signal. Sind jedoch zu viele Phospholipide gebunden, so kann es durch den Hook-Effekt ebenfalls zu einem zu geringen Signal kommen (255,256,266,268). Neben der bereits getesteten Beladungsdichte der fluoreszenzmarkierten Phospholipide (Abschnitt *Oberflächenbeladung der Mikropartikel*) aufgrund verschiedener Phospholipidkonzentrationen ist ebenfalls der verwendete Kopplungspuffer von entscheidender Bedeutung. Phospholipide bilden aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in wässrigen Lösungen meist Liposomen oder andere zusammengelagerte Strukturen (254,310,311), um eine möglichst hohe thermodynamische Stabilität zu erlangen (257,258). Bei der Verwendung von Liposomen zur Kopplung auf Oberflächen wie Mikropartikeln gibt es verschiedene Puffer, die zum Einsatz kommen können (164–166). Diese Puffer besitzen meist eine sehr hohe Konzentration an Salzen und beeinflussen somit die ionische Bindung und die hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bindung der Liposomen an den Mikropartikeln (312,313). Systeme mit hochsalzigen Puffern können ebenfalls sehr schnell durch den pH-Wert beeinflusst werden (312–314). Bei der Kopplung der Phospholipide wurden diese Puffer ebenfalls ausgetestet. Jedoch kam es hier bei der Vereinigung von Phospholipiden und den genannten Puffern sowie den Mikropartikeln zu erschwertem Handling dieser. Die Lösungen wurden trüb und aufgrund der Blaufärbung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide konnte man erkennen, dass diese sich am Boden der Reaktionsgefäße sammelten. Außerdem aggregierten die Mikropartikel während der Kopplung der Phospholipide. Diese Aggregate ließen sich weder durch Vortexen noch Ultraschall lösen. Bei anschließenden Messungen zeigten die Mikropartikel unabhängig der

modifizierten Oberfläche diffuse Fluoreszenzwerte, die nicht reproduzierbar waren. Eine Erklärung für das Verhalten der Phospholipide ist das Vorliegen dieser in einem Chloroform/Ethanolgemisch und somit in einem organischen Lösungsmittel. Die Phospholipide scheinen in diesem organischen Lösungsmittel einzeln und nicht in einem Verbund, wie Liposomen vorzuliegen (279,315). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die hochsalzigen Puffer aus der Literatur verworfen. Gemäß einiger Publikationen werden einzelne Phospholipide über organische Lösungsmittel wie Methanol an Oberflächen gebunden (164,316). Methanol ist hinsichtlich seiner toxischen Metaboliten Formaldehyd und Ameisensäure ein weniger gern verwendeter Stoff in der Diagnostik (317,318). Die bisherige Kopplung der Phospholipide wurde immer in Verwendung von Methanol durchgeführt. Um den Assay anwendbar zu machen, wäre eine Kopplung in einer anderen Zusammensetzung von Vorteil. Die Kopplung der Phospholipide wurde sowohl in einer Alkoholreihe von 5 % bis 100 % für Methanol als auch Ethanol durchgeführt (Abb. 41). Für die Verwendung von Methanol zeigte sich ein 80 %iger Kopplungspuffer als optimal, da hier die höchsten Fluoreszenzwerte von refMFI 4,13 bis 5,03 für CL-Cy5 (Abb. 41) und refMFI 5,73 bis 6,76 für PE-Cy5 (Abb. 64, Anhang) erreicht wurden. Im Vergleich zum Methanol erreicht die Verwendung von Ethanol ähnliche Fluoreszenzwerte bei der Kopplung der Phospholipide in 60 %iger Konzentration. Höchstwerte von refMFI 4,27 bis 4,51 (CL-Cy5) und refMFI 5,53 bis 6,16 (PE-Cy5) werden erreicht. Der Unterschied in der Konzentration des Kopplungspuffers kann wiederum durch die Polarität des Alkohols (281,295), wie in Abschnitt *Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche* beschrieben, erklärt werden.



**Abb. 41: Kopplung des Phospholipids CL-Cy5 im Vergleich mit Methanol und Ethanol**

Zur Optimierung der Kopplungsbedingungen der Phospholipide wurden diese in Alkoholverdünnungsreihen (Methanol und Ethanol) von 5 % bis 100 % an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen CO498 (a), CO499 (b), CO500 (c) und CO501 (d) gekoppelt. Das höchste Fluoreszenzsignal wird mit einer 80 % Methanollösung. (Ausnahme bildet CO498 – a) und mit einer 60 % Ethanollösung. (Ausnahme bildet CO500 - c) erreicht.

Um genaue Aussagen zur Verwendung von Ethanol als Kopplungspuffer zu treffen, müssten weitere Experimente auch hinsichtlich der Durchführung des Nachweises von Anti-Phospholipid-Antikörpern durchgeführt werden. Die Kopplung fluoreszenzmarkierter Phospholipide lässt die Vermutung zu, dass eine 60 %ige Ethanollösung ebenso wie eine 80 %ige Methanollösung für die Kopplung von Phospholipiden geeignet sind.

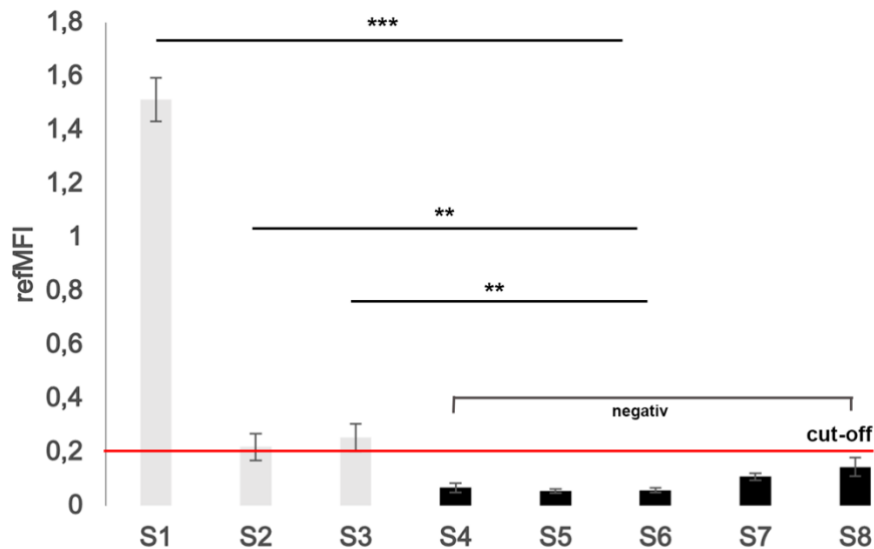
Ebenso wichtig wie die Kopplungspuffer sind die Waschpuffer bei der Entwicklung eines soliden, funktionsfähigen Assays. Im Abschnitt *Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche* wurden bereits verschiedene Waschpuffer getestet. Die Verwendung von Puffern mit 0,05 % Tween® 20, ebenso wie die Verwendung von Puffern ohne Tween® 20 führt zu geringeren Fluoreszenzsignalen an der Mikropartikeloberfläche. Die Verwendung einer höheren Tween® 20-Konzentration kann zur Ablösung der Phospholipide von der Mikropartikeloberfläche führen (289).

Gleichzeitig jedoch ist es zwingend erforderlich, Tween® 20 bei der Verwendung von Mikropartikeln zu benutzen. Denn in Puffern ohne Tween® 20 aggregierten die Mikropartikel und wurden an der Wand der Reaktionsgefäße gebunden und daraufhin bei einzelnen Waschschrritten abgesaugt. Somit kommt es sowohl zu einem verminderten Fluoreszenzsignal als auch zu einem hohen Mikropartikelverlust. Die optimale Tween® 20-Konzentration zur Durchführung des Mikropartikelassays ist somit eine schmale Gradwanderung. Im direkten Vergleich der Puffer PBS und TBS konnten keine Unterschiede im Verhalten der Mikropartikel festgestellt werden. Es können sowohl PBS oder TBS mit Tween® 20 als Waschpuffer verwendet werden. Die Entscheidung, TBS als Waschpuffer zu verwenden, basiert auf der Grundlage, dass phosphatgepufferte Systeme zu unspezifischen Bindungen führen können (188) und dies sollte von vornherein als Störfaktor ausgeschlossen werden.

### *3.2.6.2 Erhöhung der Spezifität zum Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper durch den Einsatz eines Blockierungspuffers*

Unspezifische Bindungen und andere Störeffekte wie Matrixeffekte (319–323), der Hook Effekt (255,256,266,268), Störungen durch heterophile Antikörper oder endogene Bestandteile (287,324) des Patientenmaterials haben Einfluss auf die Funktionalität eines Assays. Alle auftretenden Störeffekte können das entstehende Fluoreszenzsignal verringern. Hierbei kommt es zu Affinitäts- und Konzentrationseffekten an der Oberfläche (203,261,262). Die Bindungsaffinität der Störeffekte ist jedoch geringer als die spezifische Bindung eines Antikörpers zum Antigen (203). Um unspezifischen Bindungen etwa durch heterophile Antikörper oder endogene Bestandteile entgegenzuwirken, wurde ein Blockierungsschritt im Anschluss an die Kopplung der Phospholipide in den Ablauf des Assays integriert. Hierfür wurden die Mikropartikel mit 2,5 % BSA in TBS-T (0,01 % Tween® 20) für 30 min inkubiert. Außerdem wurde das Serum und der Sekundärantikörper jeweils in 2,5 % BSA TBS-T (0,01% Tween® 20) verdünnt und für den Assay verwendet. Die Abbildung 42 zeigt, dass aufgrund des Einsatzes von 2,5 % BSA die Fluoreszenzwerte um einen Faktor 4 für das Serum S1 erhöht werden konnten. Eine mögliche Erklärung ist, dass das kleine Protein Bovine Serum Albumin (66,5 KDa) (325,326) an freie Stellen auf der Mikropartikeloberfläche anlagert oder an die Fettsäuren der Phospholipide bindet (327) und somit dazu führt, dass die Phospholipide sich möglicherweise aufstellen und somit besser für die Antikörper erreichbar sind.

Außerdem könnte es verhindern, dass heterophile Antikörper an den Phospholipiden oder den gebundenen Anti-Phospholipid-Antikörpern binden und somit die Erkennung durch den Sekundärantikörper blockieren.



**Abb. 42: Nachweis der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper mit einem Blockierungsschritt**

Um ein spezifisches Signal beim Nachweis der Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper zu generieren, wurde nach der Kopplung des Phospholipids Cardiolipin mit 2,5 % BSA TBS-T (0,01 % Tween® 20) geblockt. Beim Blocken werden bei allen Mikropartikelpopulationen höhere Fluoreszenzwerte generiert. Steigerung von refMFI 0,3 auf 1,5. Alle erreichten Fluoreszenzwerte der positiven Seren (S1, S2, S3) unterscheiden sich signifikant (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) von den negativ getesteten Seren.

Weiterhin ist jedoch bekannt, dass BSA mit humanem Serum interagiert und somit zu unspezifischen Bindungen führt (328). Jedoch sieht man zwar einen Signalanstieg um den Faktor 4 bei dem Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper-positiven Serum S1 jedoch nicht beim Anti-IgG-Phospholipid-Antikörper negativen Serum S4. Diese Beobachtung spricht wiederum dafür, dass das verwendete BSA nicht in dem Ausmaß mit dem HSA reagiert, dass es zu unspezifischen Bindungen durch die verwendeten Antikörper kommt. Die Verwendung von BSA oder anderen Blockierungsreagenzien könnte ebenfalls für die Optimierung des IgM-Assays verwendet werden. Möglicherweise kommt es auch hier zu einer Signalverstärkung und zu einem positiven Fluoreszenzsignal.

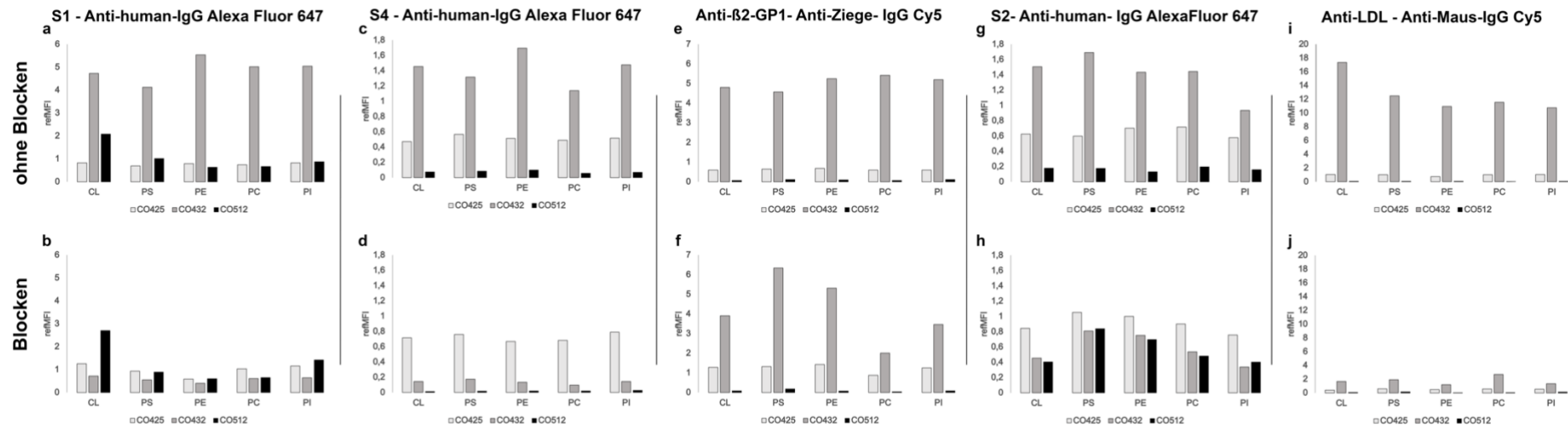


### 3.2.6.3 Multiplexer Nachweis von Lipiden und Lipoproteinen unter Verwendung carboxylierter und hydrophober Mikropartikel

Voraussetzungen für eine schnelle und präzise Diagnostik ist der simultane Nachweis mehrerer relevanter Biomarker (12,13,20,21,329). Um gleichzeitig Zeit und Probenmaterial zu sparen, eignen sich Mikropartikel, welche durch ein unterschiedliches Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Größe kodiert sind (217). Carboxylierte Mikropartikel ermöglichen theoretisch einen Nachweis von 18 verschiedenen Biomarkern simultan in einer Reaktion (167). Dieser simultane Nachweis ist ebenfalls das Ziel in der Entwicklung eines lipidbasierten Nachweises mittels hydrophober Mikropartikel. Bisher konnten jedoch noch keine miteinander kombinierbaren Mikropartikelpopulationen, welche sich sowohl in dem Verhältnis ihrer Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Größe unterscheiden, hergestellt werden. Somit ist ein simultaner Nachweis verschiedener Phospholipide in einer Reaktion noch nicht möglich. Um jedoch trotzdem einen multiplexen Nachweis und den damit verbundenen simultanen Nachweis verschiedener Biomarker durchzuführen, sollten carboxylierte und hydrophobe Mikropartikel miteinander kombiniert werden. Wie im Abschnitt *Lösungsmittelstabilität der Mikropartikel* beschrieben, ist es nicht möglich, carboxylierte Mikropartikel mit Lösungsmitteln in Verbindung zu bringen und somit Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche zu binden. Hydrophobe Mikropartikel, welche mit Phospholipiden gekoppelt sind, weisen hydrophile Eigenschaften auf und können somit in für immunogene Assays typischen Puffern inkubiert werden. Da die carboxylierten Mikropartikel nach der Kopplung von Phospholipiden an hydrophobe Mikropartikel nicht mehr mit organischen Lösungsmitteln in Berührung kommen, ist es möglich diese miteinander zu kombinieren. Aufgrund der Einteilung der Mikropartikel in Populationen und daraus ersichtlichen Verhältnissen der Fluoreszenzfarbstoffe sowie der Größe ist eine gleichzeitige Messung der Populationen CO425, CO432 (carboxylierte Mikropartikel) und CO512 (hydrophobe Mikropartikel) möglich. Bei den Populationen CO425 und CO432 handelt es sich um carboxylierte Mikropartikel, welche mit  $\beta$ 2-GP1 (CO432) und LDL (CO425) über eine EDC-Chemie gekoppelt wurden. Die Mikropartikelpopulation CO512 wurde einzeln mit den Phospholipiden CL, PS, PE, PC und PI gekoppelt. Im Anschluss an die Kopplung konnten die drei Mikropartikelpopulationen in einem Ansatz (geblockt oder ungeblockt) mit verschiedenen Antikörpern (Anti- $\beta$ 2-GP1, Anti-LDL) oder Seren (S1, S2, S4) inkubiert werden (Abb. 43). Eine anschließende Analyse ergab, dass ohne die Verwendung von

2,5 % BSA sich unspezifische Bindungen beim Nachweis von LDL an den  $\beta$ 2-GP1 gekoppelten (Abb. 43i und j) Mikropartikeln zeigten. Beim Nachweis von  $\beta$ 2-GP1 durch humanes Serum (S1, S2 und S4, jeweils positiv für  $\beta$ 2-GP1 getestet) kommt es unter der Verwendung von BSA zu geringeren Fluoreszenzsignalen als bei der Verwendung eines aufgereinigten Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpers (Abb. 43a-h). Mögliche Ursache hierfür ist die geringere Konzentration der Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper im humanen Serum. Die Reduktion des Signals mit einem zusätzlichen Blockierungsschritt kann ebenfalls auf unspezifische Bindungen durch das verwendete humane Serum hindeuten, da bei der Verwendung des aufgereinigten Antikörpers keine Reduktion des Fluoreszenzsignals sichtbar ist (Abb. 43 e und f). Die Phospholipide an den hydrophoben Mikropartikelpopulationen können in dem positiven IgG-Serum S1 und S2 (Abb. 43 a-b und g-h) nachgewiesen werden, jedoch nicht im IgG-negativen Serum S4 (Abb. 52 c-d). Somit können die Einzelmessungen auch in einem Multiplexformat bestätigt werden. Des Weiteren kann die Verstärkung des Fluoreszenzsignals durch den Einsatz von 2,5 % BSA als Blockierungsreagenz in Abb. 43 g-h bestätigt werden, jedoch nicht unter Verwendung des Serums S1 (Abb. 43 b).

Es ist möglich, wichtige Lipide oder lipidähnliche Strukturen simultan in einer Reaktion unter Verwendung carboxylierter und hydrophober Mikropartikel nachzuweisen.



**Abb. 43: Simultaner Nachweis von  $\beta$ 2-GP1, LDL und Phospholipiden**

Für einen multiplexen Nachweis von  $\beta$ 2-GP1 (CO432), LDL (CO425) und den Phospholipiden (CO512 - CL, PS, PE, PC, und PI) wurden verschiedene Mikropartikelpopulationen gekoppelt. Ein Mix der Populationen CO425, CO432 und CO512 (pro Phospholipid 1 Ansatz) wurde zu gleichen Teilen hergestellt und inkubiert. Die Phospholipide wurden mit den Seren S1 (a ohne und b mit Blocken), S4 (c ohne und d mit Blocken) und S2 (g ohne und h mit Blocken) nachgewiesen.  $\beta$ 2-GP1 wurde mit einem aufgereinigten Antikörper (Anti- $\beta$ 2-GP1, e ohne Blocken und f mit Blocken) und dem Serum S2 (g ohne Blocken und h mit Blocken) nachgewiesen. Das Lipoprotein LDL wurde mit einem aufgereinigten Antikörper (Anti-LDL i ohne Blocken und j mit Blocken) nachgewiesen.

### 3.2.7 Schlussfolgerungen

Die hergestellten hydrophoben Mikropartikel konnten anhand verschiedener Kriterien (Lösungsmittelstabilität, Verhalten in Puffersystemen, pH-abhängige Aggregation, Hydrophobizität, Fluoreszenz- und Größenverteilung) charakterisiert und in einzelne Mikropartikelpopulationen eingeteilt werden. Aufgrund der silanisierten Mikropartikeloberfläche ist es möglich, verschiedene unkonjugierte und fluoreszenzmarkierte Phospholipide gerichtet und stabil an die Mikropartikeloberfläche zu binden. Mittels enzymatischer Reaktionen der Phospholipase PLC und der damit verbundenen Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zum GlycerinGrundgerüst konnte gezeigt werden, dass die Phospholipide mit ihrem hydrophoben Teil, den Fettsäureketten, an der Mikropartikeloberfläche binden und somit ein immunogener Nachweis über Antikörper möglich ist. Dieser Nachweis der Anti-IgG/IgM-Phospholipid-Antikörper konnte erfolgreich im DotBlot auf einer PVDF-Membran für verschiedene Phospholipide etabliert werden. Die verwendeten hydrophoben Mikropartikel eignen sich ebenfalls zum Nachweis der Anti-Phospholipid-Antikörper aus humanem Serum. Aufgrund geringer Fluoreszenzwerte müssen die Assaybedingungen weiterhin optimiert werden. Durch die Integration eines zusätzlichen Blockierungsschrittes nach der Kopplung der Phospholipide an die Mikropartikeloberfläche und die Optimierung der Kopplungs- und Waschpuffer konnte eine teilweise Verstärkung des Fluoreszenzsignals erreicht werden. Es müssen jedoch weitere Optimierungen hinsichtlich der Validierung und Etablierung des Assays in die Diagnostik vorgenommen werden. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass carboxylierte und hydrophobe Mikropartikel nach der Kopplung mit Biomolekülen simultan in einer Reaktion mit spezifischen Nachweisantikörpern inkubiert und gemessen werden können. Für einen simultanen Nachweis verschiedener Phospholipide in einer Reaktion werden weitere Mikropartikelpopulationen, unterschiedlich im Verhältnis ihrer Fluoreszenzfarbstoffe und Größe, benötigt.

## 4. Literaturverzeichnis

1. Dinter F, Burdukiewicz M, Schierack P, Lehmann W, Nestler J, Dame G, u. a. Simultaneous detection and quantification of DNA and protein biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. *Anal Bioanal Chem.* November 2019;411(29):7725–35.
2. Dinter F, Thiehle T, Schedler U, Lehmann W, Schierack P, Rödiger S. Immobilisation of Lipophilic and Amphiphilic Biomarker on Hydrophobic Microbeads. 2022.
3. Lenfant C. Prospects of personalized medicine in cardiovascular diseases. *Metabolism.* Januar 2013;62:S6–10.
4. Dainis AM, Ashley EA. Cardiovascular Precision Medicine in the Genomics Era. *JACC Basic Transl Sci.* April 2018;3(2):313–26.
5. Kirchhof P, Sipido KR, Cowie MR, Eschenhagen T, Fox KAA, Katus H, u. a. The continuum of personalized cardiovascular medicine: a position paper of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 7. Dezember 2014;35(46):3250–7.
6. Vogenberg FR, Barash CI, Pursel M. Personalized Medicine, Part 1: Evolution and Development into Theranostics. *Pers Med.* 2010;Vol. 35(No. 10):560–7.
7. Lee MS, Flammer AJ, Lerman LO, Lerman A. Personalized Medicine in Cardiovascular Diseases. *Korean Circ J.* 2012;42(9):583.
8. Nasser B, Soleimani N, Rabiee N, Kalbasi A, Karimi M, Hamblin MR. Point-of-care microfluidic devices for pathogen detection. *Biosens Bioelectron.* Oktober 2018;117:112–28.
9. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
10. Willis JCD, Lord GM. Immune biomarkers: the promises and pitfalls of personalized medicine. *Nat Rev Immunol.* Mai 2015;15(5):323–9.
11. Ong FS, Das K, Wang J, Vakil H, Kuo JZ, Blackwell WLB, u. a. Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing. *Expert Rev Mol Diagn.* Juli 2012;12(6):593–602.
12. Landeck L, Kneip C, Reischl J, Asadullah K. Biomarkers and personalized medicine: current status and further perspectives with special focus on dermatology. *Exp Dermatol.* Mai 2016;25(5):333–9.
13. Matsui S. Genomic Biomarkers for Personalized Medicine: Development and Validation in Clinical Studies. *Comput Math Methods Med.* 2013;2013:1–9.
14. Xu T, Fang Y, Rong A, Wang J. Flexible combination of multiple diagnostic biomarkers to improve diagnostic accuracy. *BMC Med Res Methodol.* Dezember 2015;15(1):94.
15. Otoo JA, Schlappi TS. REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast. *Biosensors.* 16. Februar 2022;12(2):124.

16. Guest PC, Popovic D, Steiner J. Challenges of Multiplex Assays for COVID-19 Research: A Machine Learning Perspective. In: Guest PC, Herausgeber. *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications for COVID-19 Disease Diagnosis and Risk Stratification* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [zitiert 13. September 2022]. S. 37–50. (Methods in Molecular Biology). Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2395-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2395-4_3)
17. Fan Y, Wang S, Zhang F. Optical Multiplexed Bioassays for Improved Biomedical Diagnostics. *Angew Chem.* 16. September 2019;131(38):13342–53.
18. Master SR, Bierl C, Kricka LJ. Diagnostic challenges for multiplexed protein microarrays. *Drug Discov Today.* November 2006;11(21–22):1007–11.
19. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges. *Clin Chem.* 1. Februar 2010;56(2):186–93.
20. Adamcova M, Šimko F. Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.* Juli 2018;39(7):1068–72.
21. Wu J, Dong M, Santos S, Rigatto C, Liu Y, Lin F. Lab-on-a-Chip Platforms for Detection of Cardiovascular Disease and Cancer Biomarkers. *Sensors.* 17. Dezember 2017;17(12):2934.
22. Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, Lu TJ, u. a. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron.* April 2014;54:585–97.
23. Hay Burgess DC, Wasserman J, Dahl CA. Global health diagnostics. *Nature.* November 2006;444(S1):1–2.
24. Hart R, Mauk M, Liu C, Qiu X, Thompson J, Chen D, u. a. Point-of-care oral-based diagnostics: Point-of-care oral-based diagnostics. *Oral Dis.* November 2011;17(8):745–52.
25. Wang Y, Ge L, Wang P, Yan M, Ge S, Li N, u. a. Photoelectrochemical lab-on-paper device equipped with a porous Au-paper electrode and fluidic delay-switch for sensitive detection of DNA hybridization. *Lab Chip.* 28. August 2013;13(19):3945–55.
26. Cheng CM, Hsu MY, Yung-Chen Wu M, Herausgeber. *Point-of-care-diagnostics.* Zagreb: IAPC Publishing; 2017.
27. John AS, Price CP. Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biochem Rev.* 2014;(35):155–67.
28. Kiechle FL, Ingram R, Karcher R, Sykes E. Transfer of Glucose Measurements Outside the Laboratory. *Lab Med.* 1. August 1990;21(8):504–11.
29. Holland CA, Kiechle FL. Point-of-care molecular diagnostic systems — past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* Oktober 2005;8(5):504–9.
30. Dincer C, Bruch R, Kling A, Dittrich PS, Urban GA. Multiplexed Point-of-Care Testing – xPOCT. *Trends Biotechnol.* August 2017;35(8):728–42.
31. Pamme N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab Chip.* 2007;7(12):1644.

32. Godin J, Chen CH, Cho SH, Qiao W, Tsai F, Lo YH. Microfluidics and photonics for Bio-System-on-a-Chip: A review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip. *J Biophotonics*. Oktober 2008;1(5):355–76.
33. Park S, Zhang Y, Lin S, Wang TH, Yang S. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol Adv*. November 2011;29(6):830–9.
34. Sin MLY, Gau V, Liao JC, Wong PK. Integrated microfluidic systems for molecular diagnostics: A universal electrode platform for rapid diagnosis of urinary tract infections. *IEEE Nanotechnol Mag*. März 2013;7(1):31–7.
35. Damiati S, Kompella U, Damiati S, Kodzius R. Microfluidic Devices for Drug Delivery Systems and Drug Screening. *Genes*. 16. Februar 2018;9(2):103.
36. Barry R, Ivanov D. Microfluidics in biotechnology. *J Nanobiotechnology*. 2004;5.
37. Sochol RD, Casavant BP, Dueck ME, Lee LP, Lin L. A dynamic bead-based microarray for parallel DNA detection. *J Micromechanics Microengineering*. 1. Mai 2011;21(5):054019.
38. Jurischka C, Dinter F, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, u. a. An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1. Januar 2020;75(1):57–84.
39. Gale B, Jafek A, Lambert C, Goenner B, Moghimifam H, Nze U, u. a. A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects. *Inventions*. 28. August 2018;3(3):60.
40. Huang G, Huang Q, Xie L, Xiang G, Wang L, Xu H, u. a. A rapid, low-cost, and microfluidic chip-based system for parallel identification of multiple pathogens related to clinical pneumonia. *Sci Rep*. Dezember 2017;7(1):6441.
41. Verpoorte E. Beads and Chips: new recipes for analysis. *R Soc Chem*. 2003;3(4):60N-68N.
42. Tan WH, Takeuchi S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc Natl Acad Sci*. 23. Januar 2007;104(4):1146–51.
43. Chiu DT, deMello AJ, Di Carlo D, Doyle PS, Hansen C, Maceiczkyk RM, u. a. Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. *Chem*. Februar 2017;2(2):201–23.
44. Song J, Liu C, Mauk MG, Rankin SC, Lok JB, Greenberg RM, u. a. Two-Stage Isothermal Enzymatic Amplification for Concurrent Multiplex Molecular Detection. *Clin Chem*. 1. März 2017;63(3):714–22.
45. Dinter F, Jurischka C, Weiss R, Rödiger S. Multiparametrische Antikörperdetektion für die Diagnostik. *BIOspektrum*. Mai 2020;26(3):265–7.
46. Dhingra R, Vasan RS. Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. *Trends Cardiovasc Med*. Februar 2017;27(2):123–33.
47. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, u. a. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev*. Januar 2020;39:100610.

48. Berezin AE. Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA as Biomarker of Cardiovascular risk: New Challenges of Old Findings. *Angiol Open Access*. 2015;03(04).
49. Venter M, van der Westhuizen FH, Elson JL. The aetiology of cardiovascular disease: a role for mitochondrial DNA? *Cardiovasc J Afr*. 3. Mai 2018;29(2):122–32.
50. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, u. a. Prevalence of Conventional Risk Factors in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA*. 2003;290(7):898–904.
51. deGoma EM, Knowles JW, Angeli F, Budoff MJ, Rader DJ. The Evolution and Refinement of Traditional Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev*. Mai 2012;20(3):118–29.
52. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, u. a. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol*. März 2020;27(4):394–406.
53. Kamstrup PR. Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease. *Clin Chem*. 8. Januar 2021;67(1):154–66.
54. Joshi A, Rienks M, Theofilatos K, Mayr M. Systems biology in cardiovascular disease: a multiomics approach. *Nat Rev Cardiol*. Mai 2021;18(5):313–30.
55. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, u. a. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 21. Februar 2022;43(8):716–99.
56. Meza MN, Carrillo JAB. Biomarkers, Obesity, and Cardiovascular Diseases. In: Wang M, Witzmann FA, Herausgeber. *Role of Biomarkers in Medicine* [Internet]. InTech; 2016 [zitiert 31. August 2022]. Verfügbar unter: <http://www.intechopen.com/books/role-of-biomarkers-in-medicine/biomarkers-obesity-and-cardiovascular-diseases>
57. Upadhyay RK. Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. *J Lipids*. 2015;2015:1–50.
58. Albert MA. Biomarkers and Heart Disease. *J Clin Sleep Med* [Internet]. 15. Oktober 2011 [zitiert 20. Juli 2022];7(5 Suppl). Verfügbar unter: <http://jcsm.aasm.org/doi/10.5664/JCSM.1342>
59. Peng S, Hong T, Liang W, Liu W, Chen C. A multichannel microchip containing 16 chambers packed with antibody-functionalized beads for immunofluorescence assay. *Anal Bioanal Chem*. März 2019;411(8):1579–89.
60. Nakayama H, Otsu K. Mitochondrial DNA as an inflammatory mediator in cardiovascular diseases. *Biochem J*. 15. März 2018;475(5):839–52.
61. Berezin AE. Mitochondrial DNA: A Novel Biomarker of Cardiovascular Risk? *Transl Biomed*. 2016;4.
62. Meier LA, Binstadt BA. The Contribution of Autoantibodies to Inflammatory Cardiovascular Pathology. *Front Immunol*. 27. April 2018;9:911.



63. Aziz F, Smith M, M Blackburn J. Autoantibody-Based Diagnostic Biomarkers: Technological Approaches to Discovery and Validation. In: Ali Khan W, Herausgeber. Autoantibodies and Cytokines [Internet]. IntechOpen; 2019 [zitiert 20. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/autoantibodies-and-cytokines/autoantibody-based-diagnostic-biomarkers-technological-approaches-to-discovery-and-validation>
64. Liang KP, Maradit-Kremers H, Crowson CS, Snyder MR, Thorneau TM, Roger VL, u. a. Autoantibodies and the Risk of Cardiovascular Events. *J Rheumatol*. November 2009;36(11):2462–9.
65. Müller J, Wallukat G, Schimke I. Autoantibody-Directed Therapy in Cardiovascular Diseases. In: The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases [Internet]. Elsevier; 2017 [zitiert 23. August 2022]. S. 659–79. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128032671000272>
66. Frostegård J. Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. *Autoimmun Rev*. August 2002;1(4):233–7.
67. O'Neill SG, Isenberg DA, Rahman A. Could antibodies to C-reactive protein link inflammation and cardiovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus? *Ann Rheum Dis*. 12. Januar 2007;66(8):989–91.
68. Wetterö J, Nilsson L, Jonasson L, Sjöwall C. Reduced serum levels of autoantibodies against monomeric C-reactive protein (CRP) in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. Februar 2009;400(1–2):128–31.
69. O'Neill SG, Giles I, Lambrianides A, Manson J, D'Cruz D, Schrieber L, u. a. Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 25. Februar 2010;62(3):845–54.
70. Wilson PWF, Ben-Yehuda O, McNamara J, Massaro J, Witztum J, Reaven PD. Autoantibodies to oxidized LDL and cardiovascular risk: The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*. Dezember 2006;189(2):364–8.
71. Vaarala O. Autoantibodies to modified LDLs and other phospholipid-protein complexes as markers of cardiovascular diseases. *J Intern Med*. März 2000;247(3):381–4.
72. Iseme RA, McEvoy M, Kelly B, Agnew L, Walker FR, Handley T, u. a. A role for autoantibodies in atherogenesis. *Cardiovasc Res*. 1. August 2017;113(10):1102–12.
73. Satomi Y. Lipidomics for Pharmaceutical Research. In: Ekroos K, Herausgeber. Lipidomics [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2012 [zitiert 31. August 2022]. S. 319–28. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527655946.ch16>
74. Burdge GC, Calder PC. Introduction to Fatty Acids and Lipids. In: Calder PC, Waitzberg DL, Koletzko B, Herausgeber. World Review of Nutrition and Dietetics [Internet]. S. Karger AG; 2015 [zitiert 8. Juli 2022]. S. 1–16. Verfügbar unter: <https://www.karger.com/Article/FullText/365423>

75. Filippas-Ntekouan S, Liberopoulos E, Elisaf M. Lipid testing in infectious diseases: possible role in diagnosis and prognosis. *Infection*. Oktober 2017;45(5):575–88.
76. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, u. a. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. Mai 2005;46(5):839–61.
77. Ståhlman M, Borén J, Ekroos K. High-Throughput Molecular Lipidomics. In: Ekroos K, Herausgeber. *Lipidomics* [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2012 [zitiert 31. August 2022]. S. 35–51. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527655946.ch3>
78. Ferreri C, Masi A, Sansone A, Giacometti G, Larocca A, Menounou G, u. a. Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics*. 22. Dezember 2016;7(1):1.
79. Brown HA, Marnett LJ. Introduction to Lipid Biochemistry, Metabolism, and Signaling. *Chem Rev*. 12. Oktober 2011;111(10):5817–20.
80. Solnica B, Sygitowicz G, Sitkiewicz D, Cybulska B, Jóźwiak J, Odrowąż-Sypniewska G, u. a. 2020 Guidelines of the Polish Society of Laboratory Diagnostics (PSLD) and the Polish Lipid Association (PoLA) on laboratory diagnostics of lipid metabolism disorders. *Arch Med Sci*. 2020;16(2):237–52.
81. Lutomski CA, Gordon SM, Remaley AT, Jarrold MF. Resolution of Lipoprotein Subclasses by Charge Detection Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 5. Juni 2018;90(11):6353–6.
82. Plüddemann A, Thompson M, Price CP, Wolstenholme J, Heneghan C. Point-of-care testing for the analysis of lipid panels: primary care diagnostic technology update. *Br J Gen Pract*. März 2012;62(596):e224–6.
83. Wang J, Wang C, Han X. Tutorial on lipidomics. *Anal Chim Acta*. Juli 2019;1061:28–41.
84. Ahmadpour ST, Mahéo K, Servais S, Brisson L, Dumas JF. Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer. *Int J Mol Sci*. 28. Oktober 2020;21(21):8031.
85. Ye Y, Chen Z, Shen Y, Qin Y, Wang H. Development and validation of a four-lipid metabolism gene signature for diagnosis of pancreatic cancer. *FEBS Open Bio*. November 2021;11(11):3153–70.
86. Zou L, Guo L, Zhu C, Lai Z, Li Z, Yang A. Serum phospholipids are potential biomarkers for the early diagnosis of gastric cancer. *Clin Chim Acta*. August 2021;519:276–84.
87. Jizzini M, Shah M, Zhou K. SARS-CoV-2 and Anti-Cardiolipin Antibodies. *Clin Med Insights Case Rep*. Januar 2020;13:117954762098038.
88. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. März 2017;151:S43–7.
89. Sebastiani GD, Iuliano A, Cantarini L, Galeazzi M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmun Rev*. Mai 2016;15(5):433–9.
90. Das UN. Can Bioactive Lipids Inactivate Coronavirus (COVID-19)? *Arch Med Res*. April 2020;51(3):282–6.

91. Falabella M, Vernon HJ, Hanna MG, Claypool SM, Pitceathly RDS. Cardiolipin, Mitochondria, and Neurological Disease. *Trends Endocrinol Metab.* April 2021;32(4):224–37.
92. Bari M, Bisogno T, Battista N. Bioactive Lipids in Health and Disease. *Biomolecules.* 21. Dezember 2020;10(12):1698.
93. Faricelli R, Esposito S, Toniato E, Flacco M, Conti P, Martinotti S, u. a. A New Diagnostic Approach to Better Identify Antiphospholipid Syndrome. *Int J Immunopathol Pharmacol.* April 2008;21(2):387–92.
94. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 15. Oktober 2003;102(8):2717–23.
95. Seyfried TN, Chuang JH, Zhang L, Han X, Kiebish MA. The Tumor Mitochondrial Lipidome and Respiratory Bioenergetic Insufficiency. In: Ekroos K, Herausgeber. *Lipidomics* [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2012 [zitiert 31. August 2022]. S. 297–317. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527655946.ch15>
96. Kubicek-Sutherland J, Vu D, Mendez H, Jakhar S, Mukundan H. Detection of Lipid and Amphiphilic Biomarkers for Disease Diagnostics. *Biosensors.* 4. Juli 2017;7(4):25.
97. Fukuda M, Kojima T, Mikoshiba K. Phospholipid Composition Dependence of Ca<sup>2+</sup>-dependent Phospholipid Binding to the C2A Domain of Synaptotagmin IV. *J Biol Chem.* April 1996;271(14):8430–4.
98. Fukuda M, Kojima T, Mikoshiba K. Regulation by bivalent cations of phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin III. *Biochem J.* 15. April 1997;323(2):421–5.
99. Lim L, Shui G, Wenk MR. Lipid Metabolism in Neurodegenerative Diseases. In: Ekroos K, Herausgeber. *Lipidomics* [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2012 [zitiert 31. August 2022]. S. 269–96. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527655946.ch14>
100. Lange M, Ni Z, Criscuolo A, Fedorova M. Liquid Chromatography Techniques in Lipidomics Research. *Chromatographia.* Januar 2019;82(1):77–100.
101. Kuromori Y, Okada T, Miyashita M, Harada K. Determination of Lipid Composition of Plasma Lipoproteins in Children with a Rapid Agarose Gel Electrophoresis Method. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13(5):227–30.
102. Fernandes AMAP, Messias MCF, Duarte GHB, de Santis GKD, Mecatti GC, Porcari AM, u. a. Plasma Lipid Profile Reveals Plasmalogens as Potential Biomarkers for Colon Cancer Screening. *Metabolites.* 25. Juni 2020;10(6):262.
103. Postle AD. Lipidomics: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Februar 2012;1.
104. Huang L, Zhang Y, Su E, Liu Y, Deng Y, Jin L, u. a. Eight biomarkers on a novel strip for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Nanoscale Adv.* 2020;2(3):1138–43.

105. Wang X, Hu L. Review—Enzymatic Strips for Detection of Serum Total Cholesterol with Point-of-Care Testing (POCT) Devices: Current Status and Future Prospect. *J Electrochem Soc.* 2. Januar 2020;167(3):037535.
106. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med.* November 2011;48(6):498–515.
107. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 29. Januar 2009;113(5):985–94.
108. Loizou S, McCREA JD, Rudge AC, Reynolds R. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. :8.
109. Lu S, Yu T, Wang Y, Liang L, Chen Y, Xu F, u. a. Nanomaterial-based biosensors for measurement of lipids and lipoproteins towards point-of-care of cardiovascular disease. *The Analyst.* 2017;142(18):3309–21.
110. Dimitrijevs P, Arsenyan P. Cardiolipin in the spotlight: Quantitative analysis and fluorescence-based competitive binding assay. *Sens Actuators B Chem.* November 2021;346:130537.
111. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls. *PROTEOMICS – Clin Appl.* April 2015;9(3–4):406–22.
112. Pennington ER, Funai K, Brown DA, Shaikh SR. The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* Juli 2019;1864(7):1039–52.
113. LeCocq J, Ballou CE. On the Structure of Cardiolipin \*. *Biochemistry.* 1. Juli 1964;3(7):976–80.
114. Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res.* Dezember 2008;49(12):2545–56.
115. Ye C, Shen Z, Greenberg ML. Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function. *J Bioenerg Biomembr.* April 2016;48(2):113–23.
116. Schlame M. Assays of Cardiolipin Levels. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2007 [zitiert 31. August 2022]. S. 223–40. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X06800117>
117. Ren M, Phoon CKL, Schlame M. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog Lipid Res.* Juli 2014;55:1–16.
118. Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *KWI Für Biol Berl-Dahl.* 1924;309–44.
119. Leung CWT, Hong Y, Hanske J, Zhao E, Chen S, Pletneva EV, u. a. Superior Fluorescent Probe for Detection of Cardiolipin. *Anal Chem.* 21. Januar 2014;86(2):1263–8.

120. Claypool SM, Koehler CM. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem Sci.* Januar 2012;37(1):32–41.
121. McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* Dezember 2002;1585(2–3):97–107.
122. Valianpour F, Wanders RJA, Overmars H, Vaz FM, Barth PG, van Gennip AH. Linoleic acid supplementation of Barth syndrome fibroblasts restores cardiolipin levels: implications for treatment. *J Lipid Res.* März 2003;44(3):560–6.
123. Chen D, Zhang XY, Shi Y. Identification and functional characterization of hCLS1, a human cardiolipin synthase localized in mitochondria. *Biochem J.* 1. September 2006;398(2):169–76.
124. Sorice M, Circella A, Misasi R, Pittoni V, Garofalo T, Cirelli A, u. a. Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Immunol.* 9. Oktober 2008;122(2):277–84.
125. Hauff KD, Hatch GM. Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. *Prog Lipid Res.* März 2006;45(2):91–101.
126. Kiebish MA, Bell R, Yang K, Phan T, Zhao Z, Ames W, u. a. Dynamic simulation of cardiolipin remodeling: greasing the wheels for an interpretative approach to lipidomics. *J Lipid Res.* August 2010;51(8):2153–70.
127. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. 2019;21.
128. Hidaka H, Hanyu N, Sugano M, Kawasaki K, Yamauchi K, Katsuyama T. Analysis of Human Serum Lipoprotein Lipid Composition Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. 2007;9.
129. Baxter AA, Hulett MD, Poon IK. The phospholipid code: a key component of dying cell recognition, tumor progression and host–microbe interactions. *Cell Death Differ.* Dezember 2015;22(12):1893–905.
130. Yin H, Zhu M. Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radic Res.* August 2012;46(8):959–74.
131. Dong Y, Yong VW. Oxidized phospholipids as novel mediators of neurodegeneration. *Trends Neurosci.* Juni 2022;45(6):419–29.
132. Lim W, Crowther MA. Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature: *Curr Opin Hematol.* September 2007;14(5):494–9.
133. Hossain MdM, Hossain MdA, Rahman Y, Hasan MdK. Antiphospholipid Syndrome: A Review. *Haematol J Bangladesh.* 13. Mai 2020;2(02):51–8.
134. Cristiano A, Fortunati V, Cherubini F, Bernardini S, Nuccetelli M. Anti-phospholipids antibodies and immune complexes in COVID-19 patients: a putative role in disease course for anti-annexin-V antibodies. *Clin Rheumatol.* Juli 2021;40(7):2939–45.
135. Showers CR, Nuovo GJ, Lakhnopal A, Siegel CH, Aizer J, Elreda L, u. a. A Covid-19 Patient with Complement-Mediated Coagulopathy and Severe Thrombosis. *Pathobiology.* 2021;88(1):28–36.

136. Gambino R, Ruiu G, Pagano G, Cassader M. The binding of apolipoprotein H ( $\beta$ 2-Glycoprotein I) to lipoproteins. 1999;9.
137. Lee NS, Brewer HB, Osborne JC. beta 2-Glycoprotein I. Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H. *J Biol Chem.* April 1983;258(8):4765–70.
138. de Laat HB, Derksen RHW, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG.  $\beta$ 2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 1. Dezember 2004;104(12):3598–602.
139. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, u. a. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients: Clinical and Immunologic Manifestations of APS. *Arthritis Rheum.* April 2002;46(4):1019–27.
140. Duarte-García A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, u. a. The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(9):1545–52.
141. Walic M. Rôle des lipoprotéines associées au virus de l'hépatite C et des microtubules dans l'entrée du virus dans la cellule et l'établissement de l'infection. [Paris]: Universität Paris; 2010.
142. Cutillo G, Saariaho AH, Meri S. Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases. *Cell Mol Immunol.* April 2020;17(4):313–22.
143. Nobile-Orazio E, Carpo M, Scarlato G. Gangliosides: Their Role in Clinical Neurology. *Drugs.* April 1994;47(4):576–85.
144. Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci.* Oktober 2005;62(19–20):2283–94.
145. Rahmann H. Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res.* Januar 1995;66(1–2):105–16.
146. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. *Nutrients.* 22. Mai 2015;7(5):3891–913.
147. Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Sugiura Y, Furukawa K, u. a. Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice: Gangliosides protect neurodegeneration via maintenance of rafts. *J Neurochem.* März 2011;116(5):926–35.
148. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J Oleo Sci.* 2011;60(10):537–44.
149. Schnaar RL. The Biology of Gangliosides. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* [Internet]. Elsevier; 2019 [zitiert 31. August 2022]. S. 113–48. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065231818300027>
150. Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *J Neurosci.* 19. Juni 2013;33(25):10195–208.

151. Zong S, Wei W, Jiang Z, Yan Z, Zhu J, Xie J. Characterization and comparison of uniform hydrophilic/hydrophobic transparent silica aerogel beads: skeleton strength and surface modification. *RSC Adv.* 2015;5(68):55579–87.
152. Okamoto T, Yamamoto T, Takamatsu A, Kaneko N, Fujii T. Relationship between Hydrophobic Beads Attachment and Fluid Flow in PDMS Microchannel. In: 2006 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology [Internet]. Okinawa: IEEE; 2006 [zitiert 31. August 2022]. S. 119–22. Verfügbar unter: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4281324/>
153. Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P, u. a. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Eur Polym J.* August 2013;49(8):2005–21.
154. Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm.* Dezember 2008;364(2):298–327.
155. Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev.* Mai 2004;56(9):1291–314.
156. Sahu A, Solanki P, Mitra S. Curcuminoid-loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles for cancer therapy. *Int J Nanomedicine.* März 2018;Volume 13:101–5.
157. Lu C, Church DC, Learn GD, Pokorski JK, Recum HA. Modified Cyclodextrin Microparticles to Improve PMMA Drug Delivery Without Mechanical Loss. *Macromol Biosci.* Juli 2021;21(7):2000328.
158. Demir Ö, Ulusoy Hİ, Özer ET, Osman B. Development of a new solid phase extraction method for sensitive determination of some carbamate pesticides in water using poly(EGDMA-MATrp) microbeads. *Microchem J.* November 2020;158:105317.
159. Kireç O, Alacabey İ, Erol K, Alkan H. Removal of 17 $\beta$ -estradiol from aqueous systems with hydrophobic microspheres. *J Polym Eng.* 26. März 2021;41(3):226–34.
160. Zita A, Hermansson M. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;152(2):299–306.
161. Istyami AN, Kresnowati MTAP, Prakoso T, Soerawidjaja TH. The use of hydrophobic beads in triglyceride hydrolysis. *J Adv Technol Eng Res* [Internet]. 13. Februar 2018 [zitiert 31. August 2022];4(1). Verfügbar unter: <https://tafpublications.com/platform/Articles/full-jater4.1.2.php>
162. Achmon Y, Goldshtein J, Margel S, Fishman A. Hydrophobic microspheres for in situ removal of 2-phenylethanol from yeast fermentation. *J Microencapsul.* November 2011;28(7):628–38.
163. Gallizia A, de Lalla C, Nardone E, Santambrogio P, Brandazza A, Sidoli A, u. a. Production of a Soluble and Functional Recombinant Streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* November 1998;14(2):192–6.

164. Kamimori H, Konishi M. Evaluation and application of liquid chromatographic columns coated with `intelligent` ligands. II. Phospholipid column. *Biomed Chromatogr.* Februar 2002;16(1):61–7.
165. Lin FY, Chen WY, Milton T. W. Hearn\*. Microcalorimetric Studies on the Interaction Mechanism between Proteins and Hydrophobic Solid Surfaces in Hydrophobic Interaction Chromatography: Effects of Salts, Hydrophobicity of the Sorbent, and Structure of the Protein. *Anal Chem.* 1. August 2001;73(16):3875–83.
166. Sandberg M, Lundahl P, Greijer E, Belew M. Immobilization of phospholipid vesicles on alkyl derivatives of agarose gel beads. *Biochim Biophys Acta.* 1987;(924):185–92.
167. Rödiger S, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, u. a. A Highly Versatile Microscope Imaging Technology Platform for the Multiplex Real-Time Detection of Biomolecules and Autoimmune Antibodies. In: Seitz H, Schumacher S, Herausgeber. *Molecular Diagnostics* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [zitiert 8. Juli 2022]. S. 35–74. (*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Bd. 133). Verfügbar unter: [http://link.springer.com/10.1007/10\\_2011\\_132](http://link.springer.com/10.1007/10_2011_132)
168. Streit P, Nestler J, Shaporin A, Graunitz J, Otto T. Design methodology and results evaluation of a heating functionality in modular lab-on-chip systems. *J Micromechanics Microengineering.* 1. Juni 2018;28(6):064001.
169. Schumacher S, Nestler J, Otto T, Wegener M, Ehrentreich-Förster E, Michel D, u. a. Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis. *Lab Chip.* 2012;12(3):464–73.
170. Geidel S, Peransi Llopis S, Rodrigo M, de Diego-Castilla G, Sousa A, Nestler J, u. a. Integration of an Optical Ring Resonator Biosensor into a Self-Contained Microfluidic Cartridge with Active, Single-Shot Micropumps. *Micromachines.* 13. September 2016;7(9):153.
171. Rödiger S, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, u. a. Fluorescence Dye Adsorption Assay to Quantify Carboxyl Groups on the Surface of Poly(methyl methacrylate) Microbeads. *Anal Chem.* 1. Mai 2011;83(9):3379–85.
172. R core Team 2018. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. The R Project for Statistical Computing. 2018 [zitiert 20. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://www.r-project.org/>
173. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. Xia Y, Herausgeber. *PLOS ONE.* 30. Dezember 2015;10(12):e0146021.
174. Prospero M, Min JS, Bian J, Modave F. Big data hurdles in precision medicine and precision public health. *BMC Med Inform Decis Mak.* Dezember 2018;18(1):139.
175. Burdukiewicz M. michbur/digilogger [Internet]. 2019 [zitiert 20. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://github.com/michbur/digilogger>
176. Kao YC, Whang WT, Chen YC, Chen KC. Effect of crosslinking agents on the dispersive behaviour of polymer particles in seed swelling polymerisation. *J Ind Eng Chem.* Juli 2017;51:216–22.



177. dataphysics. Kontaktwinkel - DataPhysics Instruments [Internet]. [zitiert 20. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dataphysics-instruments.com/de/wissen/grenzflaechen-verstehen/kontaktwinkel/>
178. Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci.* September 1999;81(3):167–249.
179. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther.* Februar 2009;23(1):49–59.
180. Garcia HS, López-Hernandez A, Hill CG. Enzyme Technology – Dairy Industry Applications. In: *Comprehensive Biotechnology* [Internet]. Elsevier; 2017 [zitiert 8. Juli 2022]. S. 608–17. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338092323>
181. Boonkaew S, Jang I, Noviana E, Siangproh W, Chailapakul O, Henry CS. Electrochemical paper-based analytical device for multiplexed, point-of-care detection of cardiovascular disease biomarkers. *Sens Actuators B Chem.* März 2021;330:129336.
182. Juncker D, Bergeron S, Laforte V, Li H. Cross-reactivity in antibody microarrays and multiplexed sandwich assays: shedding light on the dark side of multiplexing. *Curr Opin Chem Biol.* Februar 2014;18:29–37.
183. Waritani T, Chang J, McKinney B, Terato K. An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. *MethodsX.* 2017;4:153–65.
184. Hoffman AS, Hubbell JA. Surface-Immobilized Biomolecules. In: *Biomaterials Science* [Internet]. Elsevier; 2013 [zitiert 2. Dezember 2022]. S. 339–49. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080877808000322>
185. Sanmarco M. ELISA for antiphosphatidylethanolamine antibody detection: High impact of assay buffer on results. *J Immunol Methods.* Juni 2010;358(1–2):9–16.
186. Mahlawat A, Goyal A. Interaction of 3-Hydroxy pyridine and micelles: a fluorescence studies. *Asian J Pharm Clin Res.* 7. August 2021;55–8.
187. Lee HJ, McAuley A, Schilke KF, McGuire J. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* Oktober 2011;63(13):1160–71.
188. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, u. a. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports.* Januar 2017;27(1):4–25.
189. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* Juli 2010;23(3):550–76.
190. World Organisation for Animal Health. 1.1.02\_VALIDATION.pdf. In: *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals 2022.* 2022.
191. Swift A, Heale R, Twycross A. What are sensitivity and specificity? *Evid Based Nurs.* Januar 2020;23(1):2–4.

192. Welvaert M, Rosseel Y. On the Definition of Signal-To-Noise Ratio and Contrast-To-Noise Ratio for fMRI Data. Yacoub E, Herausgeber. PLoS ONE. 6. November 2013;8(11):e77089.
193. Price J, Goble T. Signals and noise. In: Telecommunications Engineer's Reference Book [Internet]. Elsevier; 1993 [zitiert 9. Dezember 2022]. S. 10-1-10–5. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780750611626500162>
194. Li Q yu, Li H yun, Fu G, Yu F, Wu Y, Zhao M hui. Autoantibodies against C-Reactive Protein Influence Complement Activation and Clinical Course in Lupus Nephritis. J Am Soc Nephrol. Oktober 2017;28(10):3044–54.
195. Hyun KA, Jung HI. Advances and critical concerns with the microfluidic enrichments of circulating tumor cells. Lab Chip. 2014;14(1):45–56.
196. Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. Virus Res. Dezember 2014;194:175–83.
197. Pollard TD, De La Cruz EM. Take advantage of time in your experiments: a guide to simple, informative kinetics assays. Kellogg D, Herausgeber. Mol Biol Cell. 15. April 2013;24(8):1103–10.
198. dos Santos R, Rosa SASL, Aires-Barros MR, Tover A, Azevedo AM. Phenylboronic acid as a multi-modal ligand for the capture of monoclonal antibodies: Development and optimization of a washing step. J Chromatogr A. August 2014;1355:115–24.
199. Stenberg M, Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. J Immunol Methods. Oktober 1988;113(1):3–15.
200. Liu X, Bing T, Shangguan D. Microbead-Based Platform for Multiplex Detection of DNA and Protein. ACS Appl Mater Interfaces. 22. März 2017;9(11):9462–9.
201. Mao X, Gurung A, Xu H, Baloda M, He Y, Liu G. Simultaneous Detection of Nucleic Acid and Protein Using Gold Nanoparticles and Lateral Flow Device. Anal Sci. Juni 2014;30(6):637–42.
202. Satoh M, Tanaka S, Chan EKL. The Uses and Misuses of Multiplex Autoantibody Assays in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. Front Immunol [Internet]. 21. April 2015 [zitiert 2. Dezember 2022];6. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00181/abstract>
203. Han X, Yang Y, Zhao F, Zhang T, Yu X. An improved protein lipid overlay assay for studying lipid–protein interactions. Plant Methods. Dezember 2020;16(1):33.
204. Yin B, Wan X, Qian C, Sohan ASMMF, Wang S, Zhou T. Point-of-Care Testing for Multiple Cardiac Markers Based on a Snail-Shaped Microfluidic Chip. Front Chem. 4. Oktober 2021;9:741058.
205. Mani V, Durmus C, Khushaim W, Ferreira DC, Timur S, Arduini F, u. a. Multiplexed sensing techniques for cardiovascular disease biomarkers - A review. Biosens Bioelectron. November 2022;216:114680.
206. Schneider J, Weiss R, Ruhe M, Jung T, Roggenbuck D, Stohwasser R, u. a. Open source bioimage informatics tools for the analysis of DNA damage and associated biomarkers. J Lab Precis Med. Mai 2019;(4):21–21.

207. Wang MS, Black JC, Knowles MK, Reed SM. C-reactive protein (CRP) aptamer binds to monomeric but not pentameric form of CRP. *Anal Bioanal Chem.* September 2011;401(4):1309–18.
208. Christie WW, Han X. Lipids: their structures and occurrence. In: *Lipid Analysis* [Internet]. Elsevier; 2012 [zitiert 8. Juli 2022]. S. 3–19. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780955251245500016>
209. Sivakumar M, Rao KP. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) functional microspheres. *React Funct Polym.* November 2000;46(1):29–37.
210. Klein SM, Manoharan VN, Pine DJ, Lange FF. Preparation of monodisperse PMMA microspheres in nonpolar solvents by dispersion polymerization with a macromonomeric stabilizer. *Colloid Polym Sci.* 1. Dezember 2003;282(1):7–13.
211. Klein MK, Klinkenberg N, Schuetter S, Saenger N, Pfeleiderer P, Zumbusch A. PMMA/PMMA Core–Shell Particles with Ellipsoidal, Fluorescent Cores: Accessing Rotational Dynamics. *Langmuir.* 10. März 2015;31(9):2655–61.
212. Hu B, Han L, Ma R, Phillips GO, Nishinari K, Fang Y. All-Natural Food-Grade Hydrophilic–Hydrophobic Core–Shell Microparticles: Facile Fabrication Based on Gel-Network-Restricted Antisolvent Method. *ACS Appl Mater Interfaces.* 27. März 2019;11(12):11936–46.
213. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Controlled Release.* Juli 2012;161(1):38–49.
214. Yu M, Xu L, Tian F, Su Q, Zheng N, Yang Y, u. a. Rapid transport of deformation-tuned nanoparticles across biological hydrogels and cellular barriers. *Nat Commun.* Dezember 2018;9(1):2607.
215. Augustin MA, Hemar Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev.* 2009;38(4):902–12.
216. Gandhi AS, Budac D, Khayrullina T, Staal R, Chandrasena G. Quantitative analysis of lipids: a higher-throughput LC–MS/MS-based method and its comparison to ELISA. *Future Sci OA.* März 2017;3(1):FSO157.
217. Rödiger S, Liebsch C, Schmidt C, Lehmann W, Resch-Genger U, Schedler U, u. a. Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchim Acta.* August 2014;181(11–12):1151–68.
218. Pratt LR, Chandler D. Theory of the hydrophobic effect. *J Chem Phys.* 15. Oktober 1977;67(8):3683–704.
219. Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ. A View of the Hydrophobic Effect. *J Phys Chem B.* 1. Januar 2002;106(3):521–33.
220. Hillyer MB, Gibb BC. Molecular Shape and the Hydrophobic Effect. *Annu Rev Phys Chem.* 27. Mai 2016;67(1):307–29.
221. Bangs Laboratories. Microsphere Aggregation TechNote 202 [Internet]. 2013. Verfügbar unter: [www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com)
222. polysciences. Microspheres & Particles Handling Guide [Internet]. Verfügbar unter: [polysciences.com](http://polysciences.com)

223. Yi GR, Manoharan VN, Michel E, Elsesser MT, Yang SM, Pine DJ. Colloidal Clusters of Silica or Polymer Microspheres. *Adv Mater.* 19. Juli 2004;16(14):1204–8.
224. Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, u. a. The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods.* Mai 2000;239(1–2):1–11.
225. Law KY. Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *J Phys Chem Lett.* 20. Februar 2014;5(4):686–8.
226. Biotium. CellBrite Cytoplasmic Membrane Dyes. 2022.
227. Chen H, Li X, Li D. Superhydrophilic–superhydrophobic patterned surfaces: From simplified fabrication to emerging applications. *Nanotechnol Precis Eng.* 1. September 2022;5(3):035002.
228. Si Y, Dong Z, Jiang L. Bioinspired Designs of Superhydrophobic and Superhydrophilic Materials. *ACS Cent Sci.* 26. September 2018;4(9):1102–12.
229. Wang Y, Ma K, Xin JH. Stimuli-Responsive Bioinspired Materials for Controllable Liquid Manipulation: Principles, Fabrication, and Applications. *Adv Funct Mater.* Februar 2018;28(6):1705128.
230. Arkles B. Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes. Issue of Paint & Coatings Industry magazine [Internet]. 2006; Verfügbar unter: [https://www.academia.edu/12085120/Hydrophobicity\\_Hydrophilicity\\_and\\_Silanes](https://www.academia.edu/12085120/Hydrophobicity_Hydrophilicity_and_Silanes)
231. Ma Y, Cao X, Feng X, Ma Y, Zou H. Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90°. *Polymer.* Dezember 2007;48(26):7455–60.
232. Bikerman JJ. Surface Roughness and Contact Angle. 1949;6.
233. Meiron TS, Marmur A, Saguy IS. Contact angle measurement on rough surfaces. *J Colloid Interface Sci.* Juni 2004;274(2):637–44.
234. Eral HB, 't Mannetje DJCM, Oh JM. Contact angle hysteresis: a review of fundamentals and applications. *Colloid Polym Sci.* Februar 2013;291(2):247–60.
235. Biotium. Cellular Stains. 2022.
236. Bae W, Yoon TY, Jeong C. Direct evaluation of self-quenching behavior of fluorophores at high concentrations using an evanescent field. Zhang X, Herausgeber. *PLOS ONE.* 19. Februar 2021;16(2):e0247326.
237. Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanoski BJ, u. a. Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates. *J Histochem Cytochem.* Dezember 2003;51(12):1699–712.
238. Diaz MR, Fell JW. High-Throughput Detection of Pathogenic Yeasts of the Genus *Trichosporon*. *J Clin Microbiol.* August 2004;42(8):3696–706.
239. Estrela P, Stewart AG, Yan F, Migliorato P. Field effect detection of biomolecular interactions. *Electrochimica Acta.* September 2005;50(25–26):4995–5000.

240. Conrad K, Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik, Herausgeber. Multiparameteranalytik in Forschung und Praxis. Lengerich Berlin Bremen Wien: Pabst Science Publ; 2011. 228 S. (Immundiagnostische Bibliothek).
241. Sekula-Neuner S, de Freitas M, Tröster LM, Jochum T, Levkin PA, Hirtz M, u. a. Phospholipid arrays on porous polymer coatings generated by micro-contact spotting. *Beilstein J Nanotechnol.* 27. März 2017;8:715–22.
242. Munnik T, Wierzchowicka M. Lipid-Binding Analysis Using a Fat Blot Assay. In: Munnik T, Heilmann I, Herausgeber. *Plant Lipid Signaling Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [zitiert 23. August 2022]. S. 253–9. (Methods in Molecular Biology; Bd. 1009). Verfügbar unter: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-401-2\\_23](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-401-2_23)
243. Taki T, Ishikawa D. TLC Blotting: Application to Microscale Analysis of Lipids and as a New Approach to Lipid–Protein Interaction. *Anal Biochem.* September 1997;251(2):135–43.
244. Güven E, Duus K, Lydolph MC, Jørgensen CS, Laursen I, Houen G. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *J Immunol Methods.* Januar 2014;403(1–2):26–36.
245. Catimel B, Scott AM, Lee FT, Hanai N, Ritter G, Welt S, u. a. Direct immobilization of gangliosides onto gold-carboxymethyl-dextran sensor surfaces by hydrophobic interaction: applications to antibody characterization. *Glycobiology.* 1. September 1998;8(9):927–38.
246. Herrmann A, Kaufmann L, Dey P, Haag R, Schedler U. Bioorthogonal in Situ Hydrogels Based on Polyether Polyols for New Biosensor Materials with High Sensitivity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 4. April 2018;10(13):11382–90.
247. Herrmann A, Haag R, Schedler U. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv Healthc Mater.* Juni 2021;10(11):2100062.
248. Herrmann A, Rödiger S, Schmidt C, Schierack P, Schedler U. Spatial Separation of Microbeads into Detection Levels by a Bioorthogonal Porous Hydrogel for Size-Selective Analysis and Increased Multiplexity. *Anal Chem.* 2. Juli 2019;91(13):8484–91.
249. Auld DS. Assay Interference by Aggregation. 2017;28.
250. Osman C, Voelker DR, Langer T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol.* 10. Januar 2011;192(1):7–16.
251. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* August 2008;65(16):2493–506.
252. Peterson BL, Cummings BS. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomed Chromatogr.* März 2006;20(3):227–43.
253. Vance DE. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* März 2013;1831(3):626–32.
254. Pichot R, Watson R, Norton I. Phospholipids at the Interface: Current Trends and Challenges. *Int J Mol Sci.* 3. Juni 2013;14(6):11767–94.

255. Hollett JW, Kelly A, Poirier RA. Quantum Mechanical Size and Steric Hindrance. *J Phys Chem A*. 1. Dezember 2006;110(51):13884–8.
256. Amarasiri Fernando S, Wilson GS. Studies of the 'hook' effect in the one-step sandwich immunoassay. *J Immunol Methods*. Juli 1992;151(1–2):47–66.
257. Moroz A. On a variational formulation of the maximum energy dissipation principle for non-equilibrium chemical thermodynamics. *Chem Phys Lett*. Mai 2008;457(4–6):448–52.
258. Cooper A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr Opin Chem Biol*. Oktober 1999;3(5):557–63.
259. Bangs Laboratories. Adsorption to Microspheres TechNote 204 [Internet]. 2013. Verfügbar unter: [www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com)
260. Ladbury JE, Williams MA. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr Opin Struct Biol*. Oktober 2004;14(5):562–9.
261. Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*. 1989;Vol. 7(No. 2):155–68.
262. Jarmoskaite I, AlSadhan I, Vaidyanathan PP, Herschlag D. How to measure and evaluate binding affinities. *eLife*. 6. August 2020;9:e57264.
263. Meiri N, Berman P, Colnago LA, Moraes TB, Linder C, Wiesman Z. Liquid-phase characterization of molecular interactions in polyunsaturated and n-fatty acid methyl esters by <sup>1</sup>H low-field nuclear magnetic resonance. *Biotechnol Biofuels*. Dezember 2015;8(1):96.
264. Watabe N, Ishida Y, Ochiai A, Tokuoka Y, Kawashima N. Oxidation Decomposition of Unsaturated Fatty Acids by Singlet Oxygen in Phospholipid Bilayer Membranes. *J Oleo Sci*. 2007;56(2):73–80.
265. Rustan AC, Drevon CA. Fatty Acids: Structures and Properties. In: John Wiley & Sons, Ltd, Herausgeber. eLS [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2005 [zitiert 23. August 2022]. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npq.els.0003894>
266. Spitznagel TM, Clark DS. Surface-Density and Orientation Effects on Immobilized Antibodies and Antibody Fragments. *Nat Biotechnol*. Juli 1993;11(7):825–9.
267. Kim S. Characterization of Optimal Surface Density with Prepared Polymer Nanoparticle for Immunodetection. *Sens Lett*. 1. Oktober 2013;11(10):1887–93.
268. Namburi R, Ponnala A, Kancherla V. High-dose hook effect. *J Dr NTR Univ Health Sci*. 2014;3(1):5.
269. Yeo DS, Panicker R, Tan LP, Yao S. Strategies for Immobilization of Biomolecules in a Microarray. *Comb Chem High Throughput Screen*. 1. Mai 2004;7(3):213–21.
270. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev*. 12. Oktober 2011;111(10):6130–85.
271. De Haas GH, Bonsen PPM, Van Deenen LLM. Studies on Cardiolipin III. Structural Identity of Ox-Heart Cardiolipin and synthetic Diphosphatidyl Glycerol. *Biochim Biophys Acta*. 1966;(116):114–24.

272. Yokota K, Kanamoto R, Kito M. Composition of cardiolipin molecular species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* März 1980;141(3):1047–51.
273. Cooper D, Uhm H, Tauzin LJ, Poddar N, Landes CF. Photobleaching Lifetimes of Cyanine Fluorophores Used for Single-Molecule Förster Resonance Energy Transfer in the Presence of Various Photoprotection Systems. *ChemBioChem.* 17. Juni 2013;14(9):1075–80.
274. Füreder-Kitzmüller E, Hesse J, Ebner A, Gruber HJ, Schütz GJ. Non-exponential bleaching of single bioconjugated Cy5 molecules. *Chem Phys Lett.* März 2005;404(1–3):13–8.
275. Marcus Y, Glikberg S. Recommended Methods for the Purification of Solvents and Tests for Impurities Methanol and Ethanol. *Pure Appl Chem.* 1985;(Vol. 57, No. 6):855–64.
276. Itkis D, Cavallo L, Yashina LV, Minenkov Y. Ambiguities in solvation free energies from cluster-continuum quasichemical theory: lithium cation in protic and aprotic solvents. *Phys Chem Chem Phys.* 2021;23(30):16077–88.
277. Parker AJ. The Effects of Solvation on the Properties of Anions in dipolar Aprotic Solvents. *Q Rev.* 1962;163–87.
278. Parker AJ. Protic-dipolar aprotic solvent effects on rates of bimolecular reactions. *Chem Rev.* 1969;69(1):1–32.
279. Dervichian DG. The physical Chemistry of Phospholipids T. *Prog Biophys Mol Biol.* 1964;(Vol. 14):263–342.
280. Poole PH, Sciortino F, Grande T, Stanley HE, Angell CA. Effect of Hydrogen Bonds on the Thermodynamic Behavior of Liquid Water. *Phys Rev Lett.* 19. September 1994;73(12):1632–5.
281. van der Spoel D, van Maaren PJ, Larsson P, Tîmneanu N. Thermodynamics of Hydrogen Bonding in Hydrophilic and Hydrophobic Media. *J Phys Chem B.* 1. März 2006;110(9):4393–8.
282. Garifullina A, Shen AQ. Optimized Immobilization of Biomolecules on Nonspherical Gold Nanostructures for Efficient Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing. *Anal Chem.* 3. Dezember 2019;91(23):15090–8.
283. Gibbs J, Vessels M, Rothenberg M, Usa M. Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules for ELISA Assays. 2017;6.
284. Gibbs J, Vessels M, Rothenberg M, Usa M. Immobilization Principles – Selecting the Surface for ELISA Assays. 2017;6.
285. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, u. a. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol [Internet].* 19. August 2015 [zitiert 23. August 2022];6. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fneur.2015.00179/abstract>
286. Ubilos I, Aguilar R, Sanz H, Jiménez A, Vidal M, Valmaseda A, u. a. Analysis of factors affecting the variability of a quantitative suspension bead array assay measuring IgG to multiple Plasmodium antigens. Tsuboi T, Herausgeber. *PLOS ONE.* 2. Juli 2018;13(7):e0199278.

287. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004;(25):16.
288. Hanon EA, Sturgeon CM, Lamb EJ. Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 1. Oktober 2013;51(10):1925–41.
289. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Tween 20 detaches cardiolipin from ELISA plates and makes anticardiolipin antibodies undetectable regardless of the presence of  $\alpha$ -2-glycoprotein-I. *J Immunol Methods.* 1994;175:107–14.
290. Leontidis E. Investigations of the Hofmeister series and other specific ion effects using lipid model systems. *Adv Colloid Interface Sci.* Mai 2017;243:8–22.
291. Okur HI, Hladílková J, Rembert KB, Cho Y, Heyda J, Dzubiella J, u. a. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. *J Phys Chem B.* 9. März 2017;121(9):1997–2014.
292. Bogunia M, Makowski M. Influence of Ionic Strength on Hydrophobic Interactions in Water: Dependence on Solute Size and Shape. *J Phys Chem B.* 19. November 2020;124(46):10326–36.
293. Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys.* August 1997;30(3):241–77.
294. Böckmann RA, Hac A, Heimburg T, Grubmüller H. Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophys J.* September 2003;85(3):1647–55.
295. Chung HW, Petersen EN, Cabanos C, Murphy KR, Pavel MA, Hansen AS, u. a. A Molecular Target for an Alcohol Chain-Length Cutoff. *J Mol Biol.* Januar 2019;431(2):196–209.
296. Surewicz WK, Leyko W. Interaction of propranolol with model phospholipid membranes Monolayer, spin label and fluorescence spectroscopy studies. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* Mai 1981;643(2):387–97.
297. Pinisetty D, Moldovan D, Devireddy R. The Effect of Methanol on Lipid Bilayers: An Atomistic Investigation. *Ann Biomed Eng.* September 2006;34(9):1442–51.
298. Arnemann J. Schmelzkurvenanalyse. In: Gressner AM, Arndt T, Herausgeber. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [zitiert 10. Januar 2023]. S. 2121–2121. (Springer Reference Medizin). Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3577](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3577)
299. Asmari M, Ratih R, Alhazmi HA, El Deeb S. Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. *Methods.* August 2018;146:107–19.
300. Nguyen T, Pei R, Landry DW, Stojanovic MN, Lin Q. Label-free microfluidic characterization of temperature-dependent biomolecular interactions. *Biomicrofluidics.* September 2011;5(3):034118.
301. Pierce HF. Nitrocellulose Membranes of graded Permeability. *J Biol Chem.* Dezember 1927;75(3):795–815.
302. Cytiva. Amersham ECL Plex Western blotting system.pdf [Internet]. 2021. Verfügbar unter: [cytiva.com](https://www.cytiva.com)



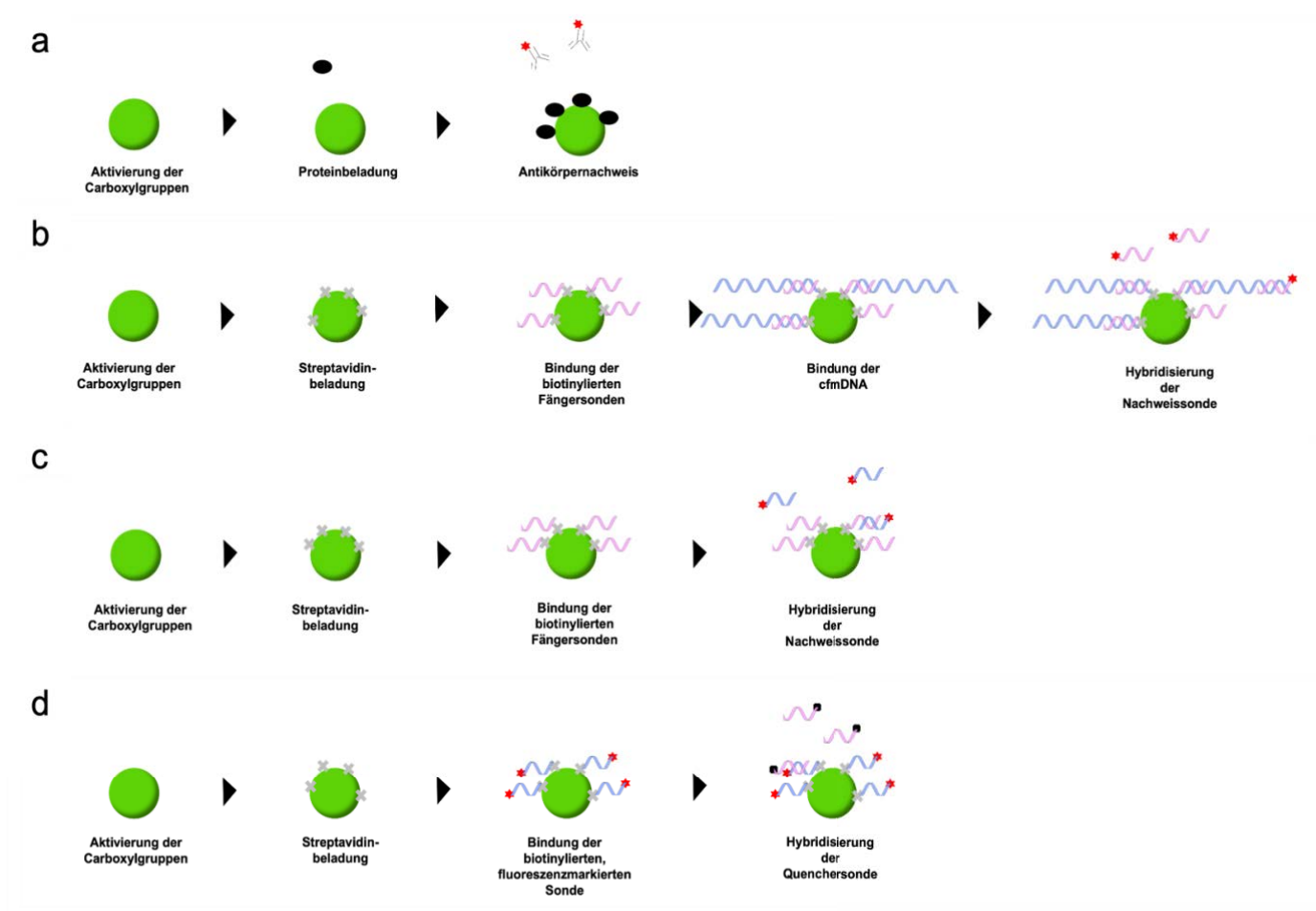
303. Vaillant AAJ. Use of Dot Blots Analysis in the Separation of Anti-HIV Antibodies in Animals. *J Chromatogr Sep Tech* [Internet]. 2013 [zitiert 17. November 2022];04(05). Verfügbar unter: <https://www.omicsonline.org/use-of-dot-blots-analysis-in-the-separation-of-anti-hiv-antibodies-in-animals-2157-7064.1000181.php?aid=14517>
304. Cytiva. Amersham Western Blotting membranes. 2020.
305. Fogler WE, Swartz GM, Alving CR. Antibodies to phospholipids and liposomes: binding of antibodies to cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* Oktober 1987;903(2):265–72.
306. Conti F, Capozzi A, Truglia S, Lococo E, Longo A, Misasi R, u. a. The Mosaic of “Seronegative” Antiphospholipid Syndrome. *J Immunol Res.* 2014;2014:1–7.
307. Fuhr J, Natta C, Marks PA, Bank A. Conformation of the Free and Antigen-bound IgM Antibody Molecules. *Nature.* 27. Dezember 1969;224:1307–9.
308. Atwell JL, Marchalonis JJ, Ealey EHM. Major Immunoglobulin Classes of the Echidna (*Tachyglossus aculeatus*). *Immunology.* 1973;(25):835–46.
309. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. Januar 2018 [zitiert 23. August 2022];120(1). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.40>
310. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, u. a. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* April 2015;10(2):81–98.
311. Perazzo A, Gallier S, Liuzzi R, Guido S, Caserta S. Quantitative methods to detect phospholipids at the oil-water interface. *Adv Colloid Interface Sci.* April 2021;290:102392.
312. Carrión FJ, De La Maza A, Parra JL. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. *J Colloid Interface Sci.* 1994;(164):78–87.
313. Zhang J ai A, Pawelchak J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions Part 1: Lipid hydrolysis. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;8.
314. Mozuraityte R, Rustad T, Storr I. Oxidation of cod phospholipids in liposomes: Effects of salts, pH and zeta potential. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2006;108(11):944–50.
315. Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, u. a. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophys J.* Februar 2006;90(4):1121–35.
316. Kamimori H, Ozaki Y, Okabayashi Y, Ueno K, Narita S. Synthesis of acylglucuronides of drugs using immobilized dog liver microsomes octadecylsilica particles coated with phospholipid. *Anal Biochem.* Juni 2003;317(1):99–106.
317. International Programme on Chemical Safety, Herausgeber. Methanol: health and safety guide. Geneva: World Health Organization; 1997. 32 S. (Health and safety guide).

318. Breil C, Abert Vian M, Zemb T, Kunz W, Chemat F. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *Int J Mol Sci.* 27. März 2017;18(4):708.
319. Wood WG. "Matrix Effects" in Immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest.* Januar 1991;51(sup205):105–12.
320. Selby C. Interference in Immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999;(36):704–21.
321. Maragos C. Fluorescence Polarization Immunoassay of Mycotoxins: A Review. *Toxins.* 10. Dezember 2009;1(2):196–207.
322. Mitchell JS, Lowe TE. Matrix effects on an antigen immobilized format for competitive enzyme immunoassay of salivary testosterone. *J Immunol Methods.* September 2009;349(1–2):61–6.
323. Sun J, Liu Y. Matrix Effect Study and Immunoassay Detection Using Electrolyte-Gated Graphene Biosensor. *Micromachines.* 23. März 2018;9(4):142.
324. Sztefko K. Immunodiagnosics and Patient Safety: [Internet]. Berlin, New York: DE GRUYTER; 2011 [zitiert 23. August 2022]. Verfügbar unter: <http://www.degruyter.com/view/books/9783110249484/9783110249484/9783110249484.xml>
325. Nosrati H, Sefidi N, Sharafi A, Danafar H, Kheiri Manjili H. Bovine Serum Albumin (BSA) coated iron oxide magnetic nanoparticles as biocompatible carriers for curcumin-anticancer drug. *Bioorganic Chem.* Februar 2018;76:501–9.
326. Cho Y, Yang JS, Song KB. Effect of ascorbic acid and protein concentration on the molecular weight profile of bovine serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin by  $\gamma$ -irradiation. *Food Res Int.* 1999;5.
327. McFarland BG, McConnell HM. Bent Fatty Acid Chains in Lecithin Bilayers. *Proc Natl Acad Sci.* Juni 1971;68(6):1274–8.
328. Gelamo EL, Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Oktober 2000;56(11):2255–71.
329. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Großhennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Hum Genet.* Oktober 2012;131(10):1627–38.



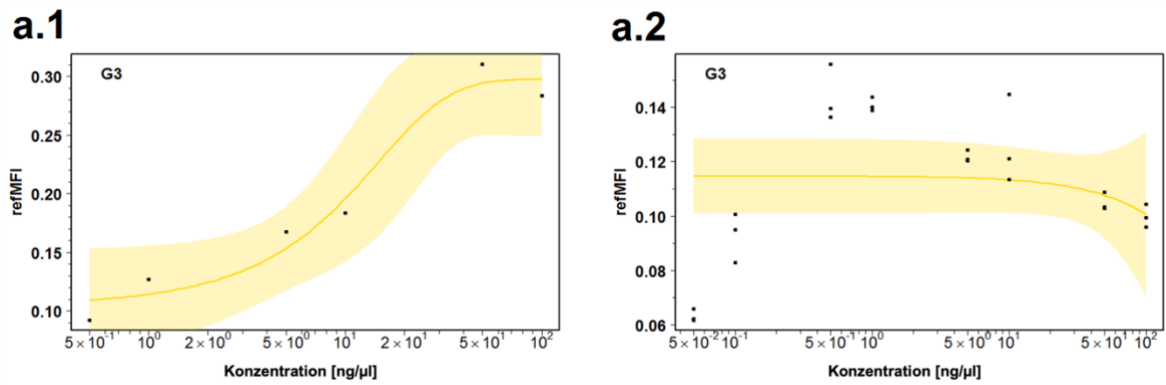
# 5. Anhang

## Entwicklung simultaner Nachweismethoden von Protein- und DNA - basierten kardiovaskulären Biomarkern



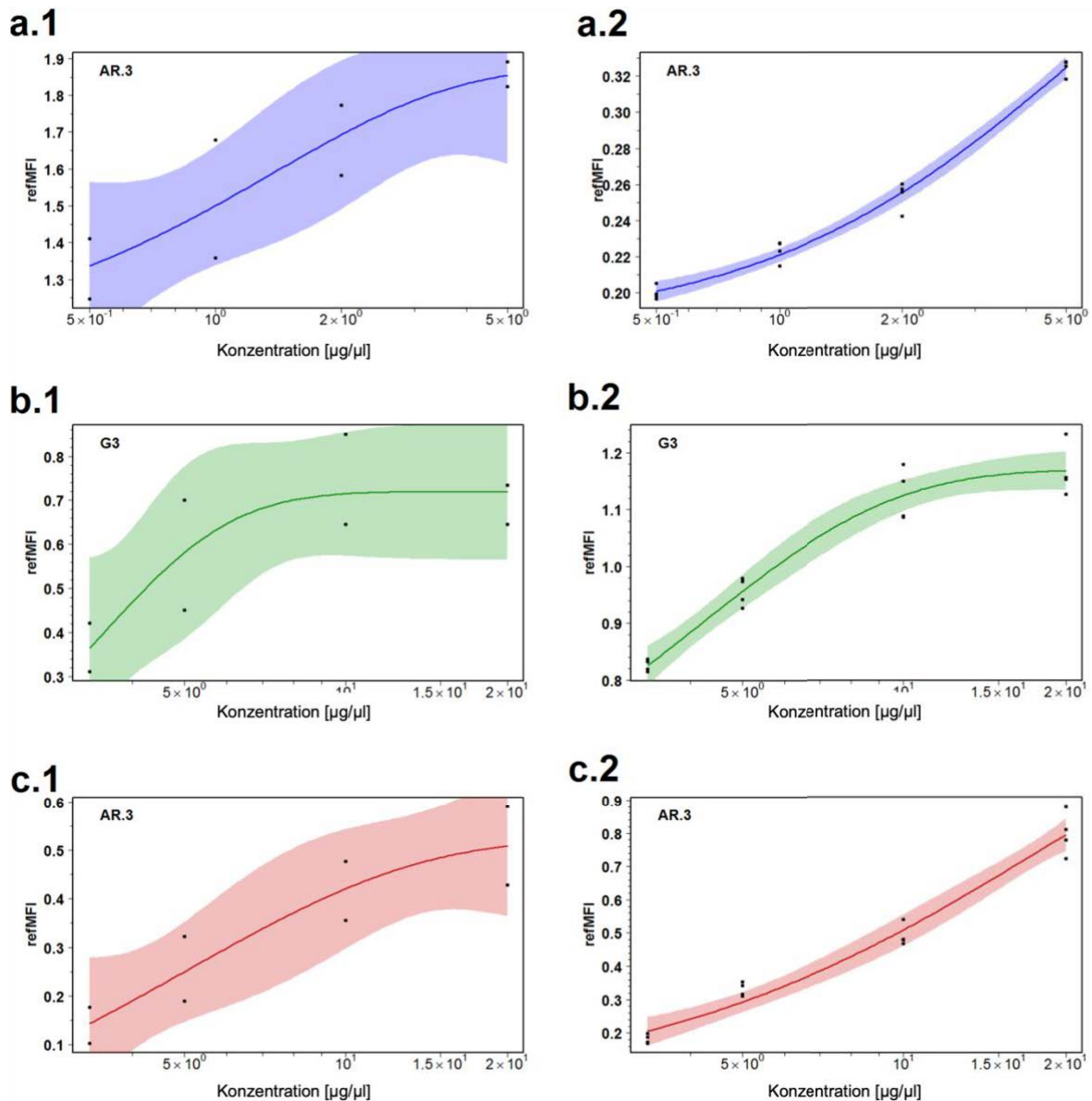
**Abb. 44: Nachweis kardiovaskulärer Biomarker**

**a** Für den proteinbasierten Nachweis der Biomarker werden COOH-Gruppen mittels EDC aktiviert, mit Proteinen gekoppelt und anschließend mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. **b** Für den Nachweis von cfmDNA werden COOH-Gruppen mittels EDC aktiviert und mit Streptavidin gekoppelt. Anschließend wird eine biotinylierte komplementäre Fängersonde über Biotin-Streptavidin-Bindung an die cfmDNA gebunden. Die cfmDNA wird durch diese gebunden und mittels komplementärer Detektionssonde nachgewiesen. **c** Um weitere DNA-basierte Biomoleküle nachzuweisen, werden die Mikropartikel wie in **b** aktiviert und gekoppelt. Biotinylierte Fängersonden werden durch eine fluoreszenzmarkierte Komplementärsonde oder **d** Quencherproben gebunden.



**Abb. 45: Verdünnungsreihe cfmdNA**

cfmdNA wurde in verschiedenen Konzentrationen von 0,5 ng/ $\mu$ l bis 100 ng/ $\mu$ l mit einer Detektionssonde im Mikrofluidikchip (**a.1**) und in einer Multiwellplatte (**a.2**) nachgewiesen.



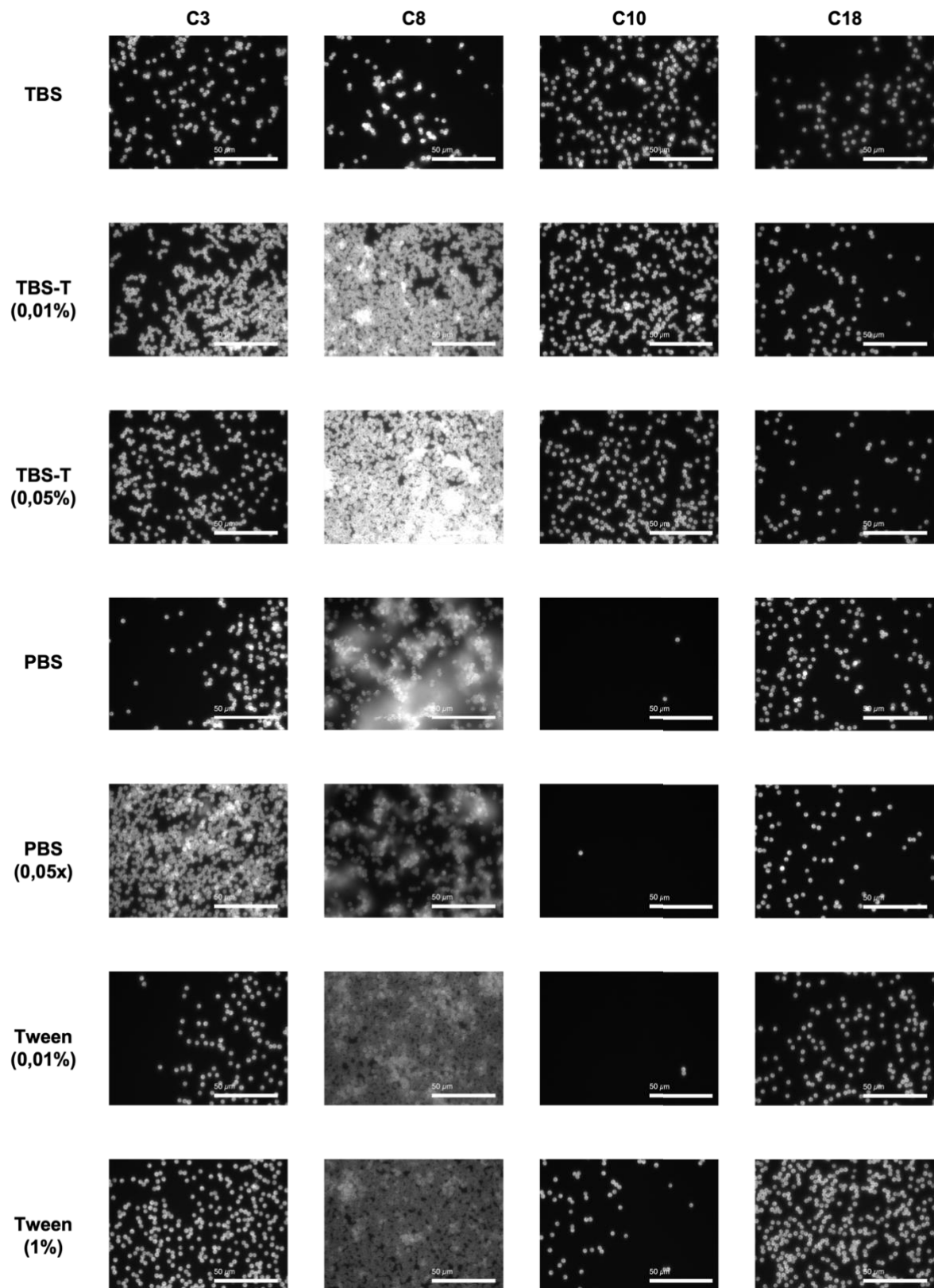
**Abb. 46: Simultane Verdünnungsreihen Anti-CRP, Anti-BNP, Anti-LDL**

Gleichzeitiger Nachweis der Biomarker CRP, BNP und LDL durch Verdünnungsreihen Die Biomarker Anti-CRP (a), Anti-BNP (b) und Anti-LDL (c) wurden gleichzeitig durch Verdünnungsreihen von 0,5 ng/ $\mu\text{l}$  bis 5 ng/ $\mu\text{l}$  (Anti-CRP) und 3,33 ng/ $\mu\text{l}$  bis 20 ng/ $\mu\text{l}$  (Anti-BNP und Anti-LDL) im Chip (a-c.1) und in der Multiwellplatte (a-c.2) nachgewiesen.

Charakterisierung hydrophober Mikropartikel, die Immobilisierung amphiphiler Biomarker und die Entwicklung eines geeigneten Nachweisassays

**Tab. 22: verwendete Puffer für Puffer- und pH abhängige Aggregationsneigung**

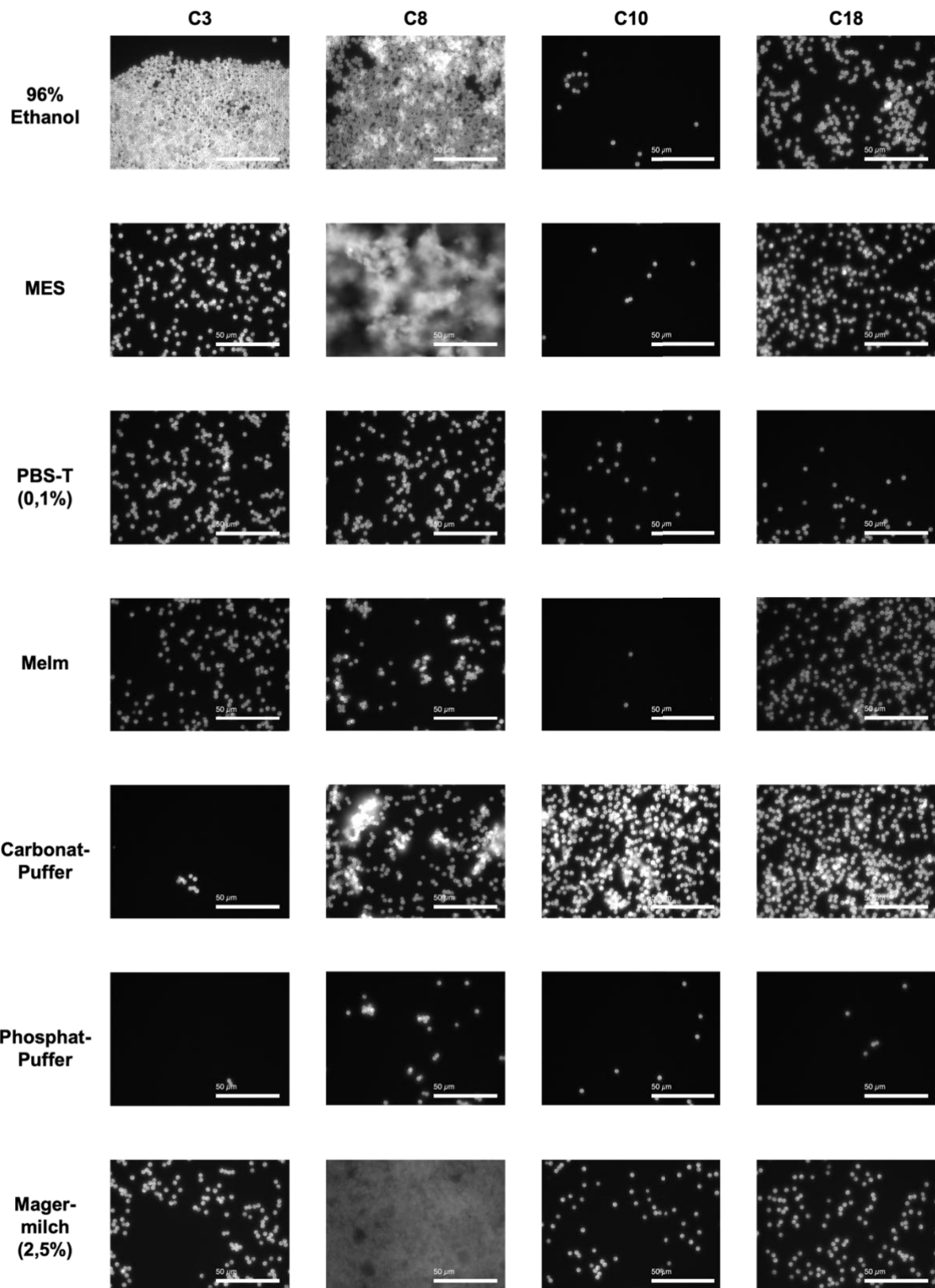
Puffer	Konzentration	pH-Wert
Borsäurepuffer	100 mM	
BSA	2,5 % in TBS	
Carbonatpuffer	0,1 M	9,5
Ethanol	96 % und 70%	
HEPES	20 mM	
Isopropanol	70 %	
Magermilchpulver	2,5 % in TBS	
MES-Puffer	0,1 M	4,6
Methylimidazol	0,1 M	7,0
MgCl <sub>2</sub>	0,8 M	
NaCl	0,5 M; 2 M, 5 M	
PBS		7,4
PBS-T	0,1 % Tween® 20	7,4
PCR-Puffer	1 x	
Phosphatpuffer	0,01 M	8
TBS		7,5
TBS-T	0,05 % Tween® 20	7,5
TRIS-HCl	10 mM	
TRIS-Puffer	10 mM	10,55
Tween® 20	0,01 %; 0,05 %	
Wasser		7,5



**Abb. 47: pH und Puffer abhängige Aggregationsneigung I**

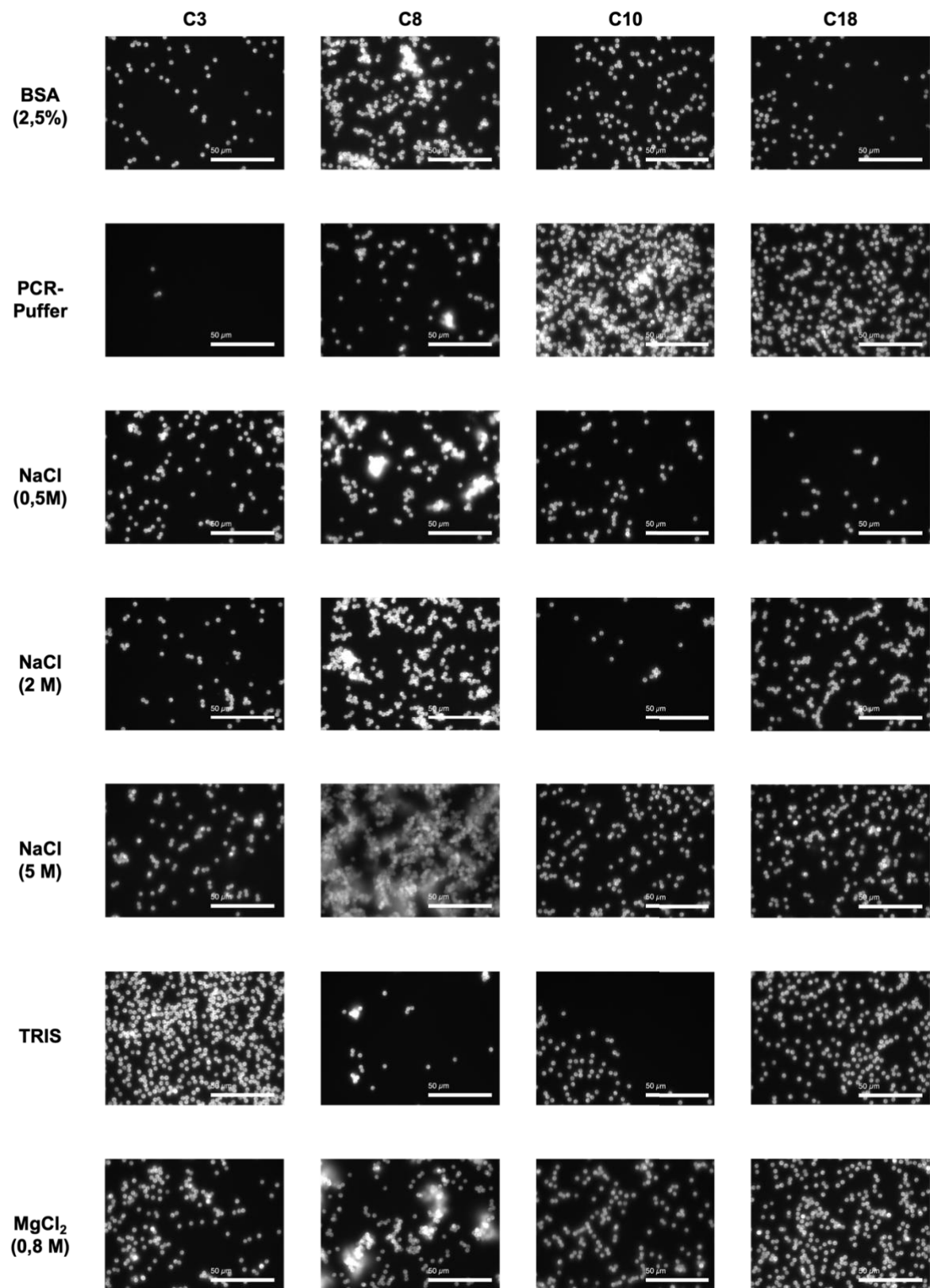
Hydrophobe Mikropartikel wurden in verschiedenen Puffern (TBS; TBS-T (0,01 und 0,05 % Tween® 20), PBS, Tween® 20), relevant für die Durchführung von Immuno- oder anderen Nachweisassays, inkubiert. Tween® 20-haltige Puffer führen bei unbeladenen Mikropartikel zu Aggregationen.





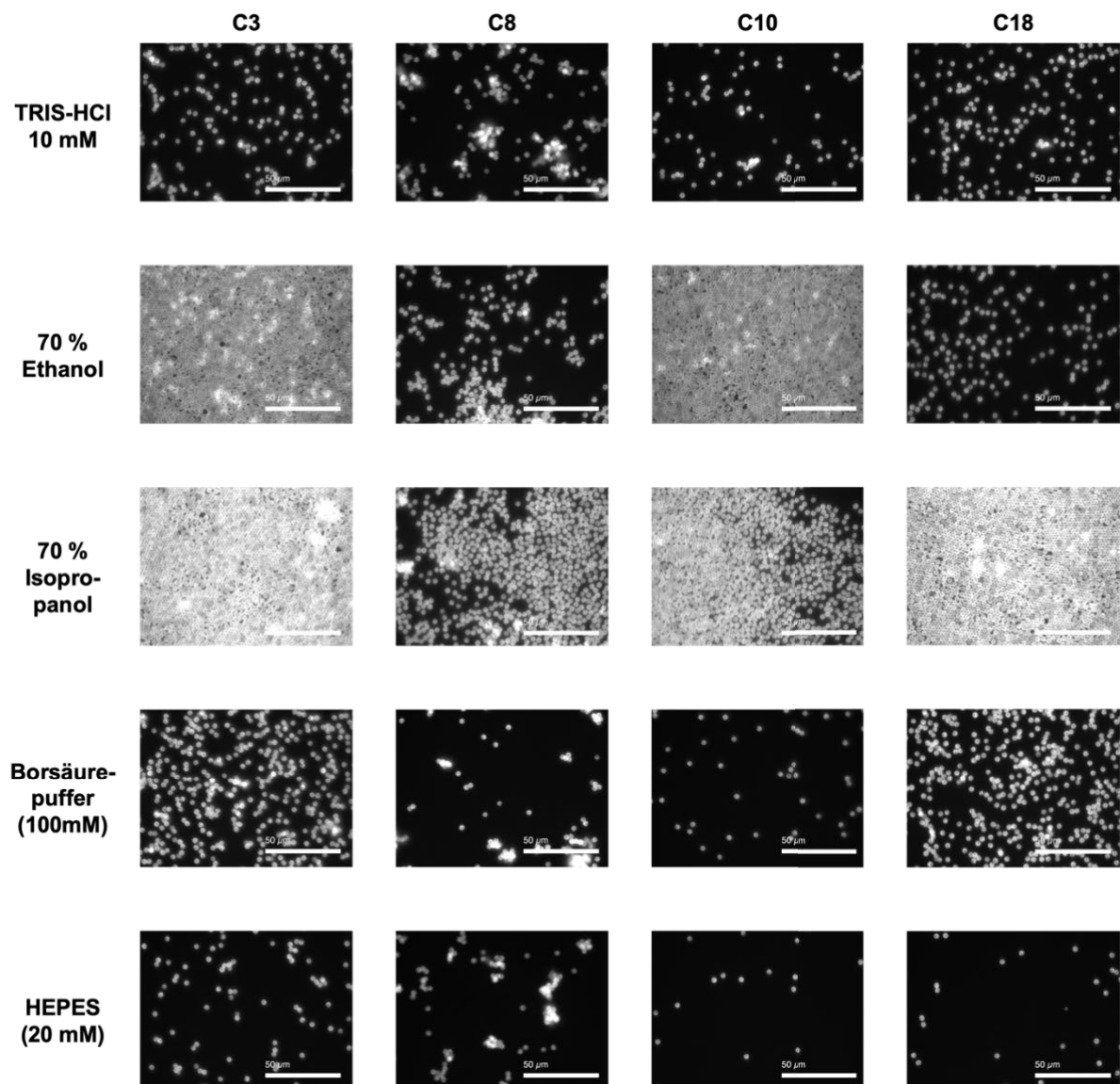
**Abb. 48: pH und Puffer abhängige Aggregationsneigung II**

Hydrophobe Mikropartikel wurden in verschiedenen Puffern (Ethanol, NES, PBS-T, Melm, Carbonat-Puffer, Phosphat-Puffer, Magermilch), relevant für die Durchführung von Immuno- oder anderen Nachweisassays, inkubiert. Es werden keine pH-abhängigen Aggregationsneigungen sichtbar.



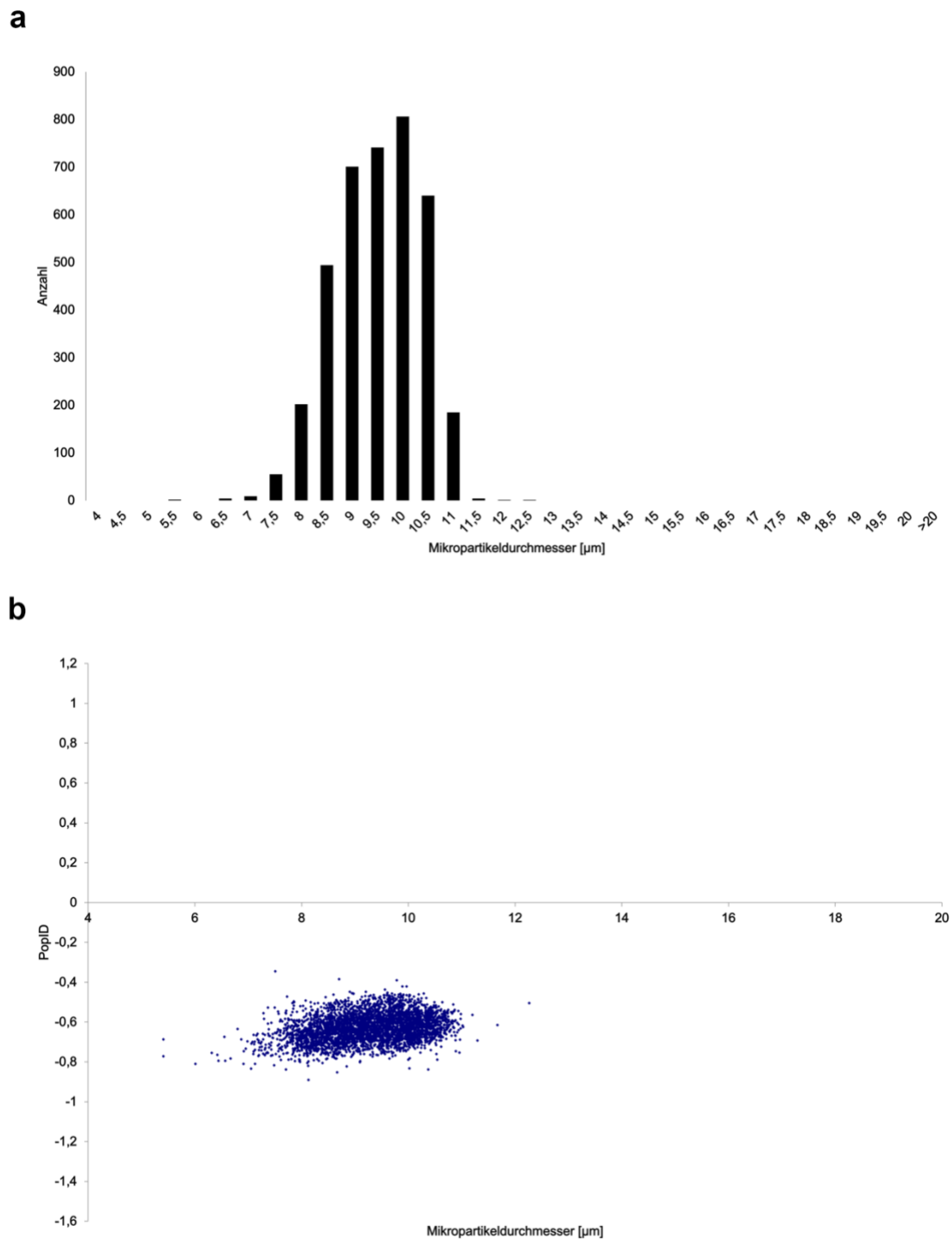
**Abb. 49: pH und Pufferabhängige Aggregationsneigung III**

Hydrophobe Mikropartikel wurden in verschiedenen Puffern (BSA; PCR-Puffer, NaCl, TRIS, MgCl<sub>2</sub>), relevant für die Durchführung von Immuno- oder anderen Nachweisassays, inkubiert. In hochsalzigen Puffern (NaCl und MgCl<sub>2</sub>) aggregieren die Mikropartikel.



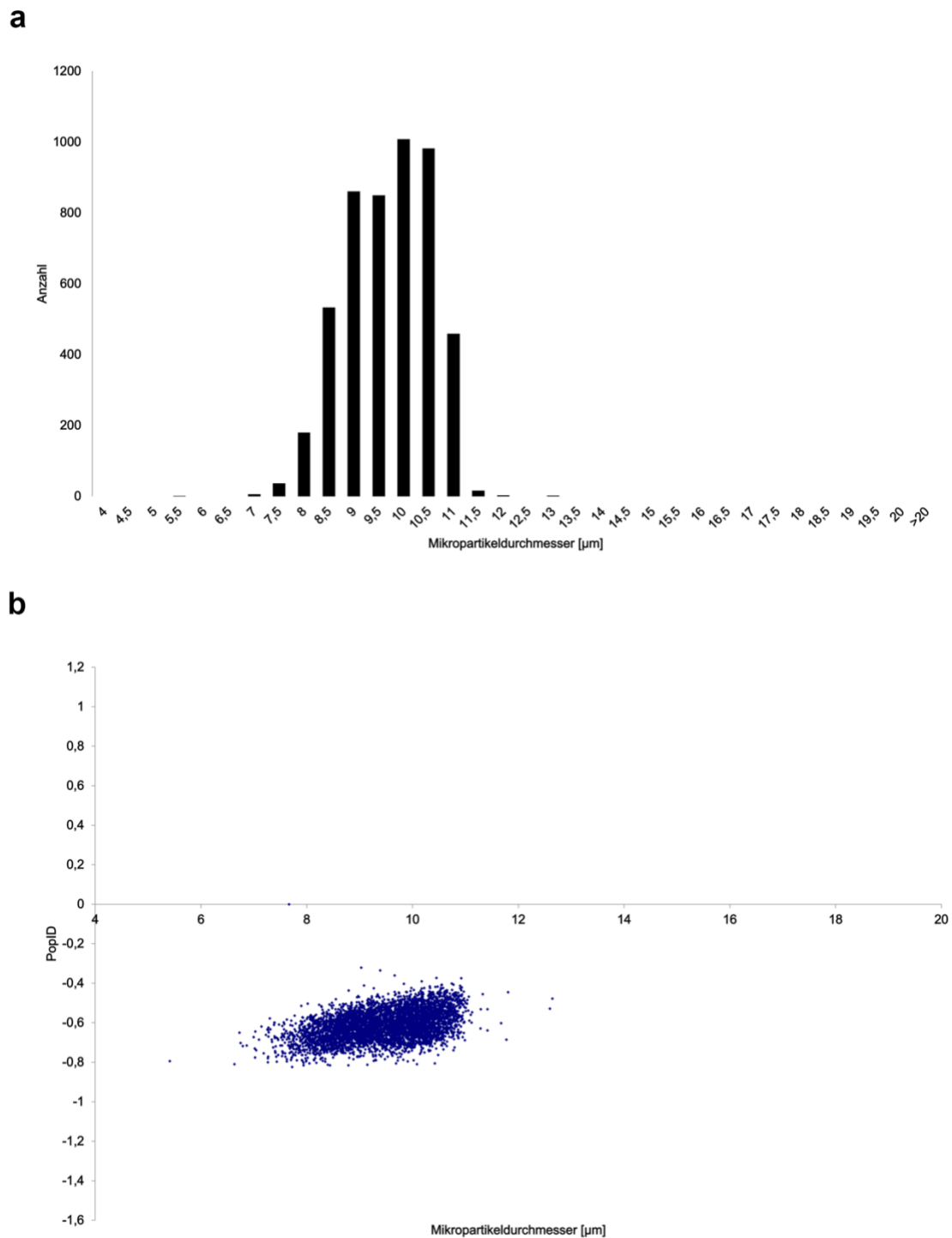
**Abb. 50: pH und Pufferabhängige Aggregationsneigung IV**

Hydrophobe Mikropartikel wurden in verschiedenen Puffern (TRIS-HCl, Ethanol, Isopropanol, Borsäure-Puffer, HEPES), relevant für die Durchführung von Immuno- oder anderen Nachweisassays, inkubiert. Es werden keine pH-abhängigen Aggregationsneigungen sichtbar.



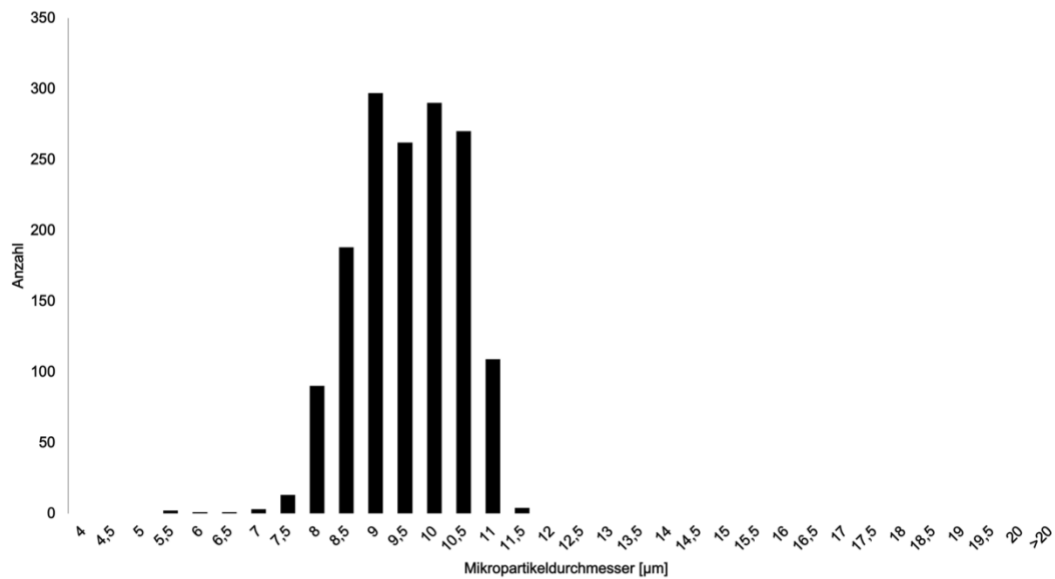
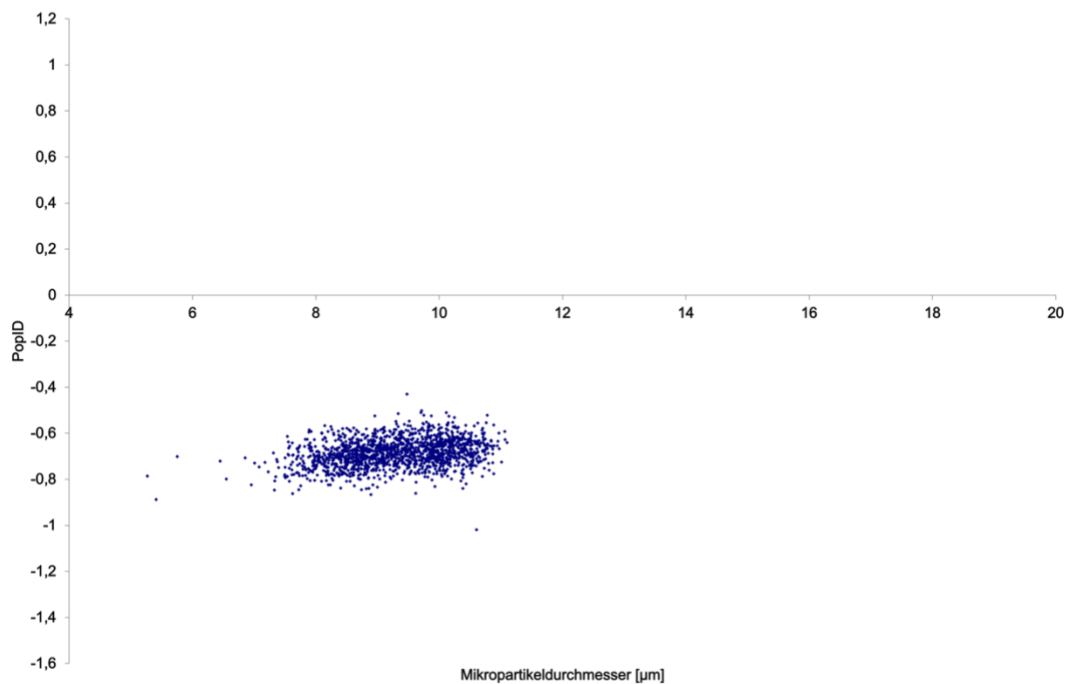
**Abb. 51: Größenverteilung der Mikropartikel CO499**

Die hydrophoben Mikropartikel HVMP69-C8 wurden mittels VideoScan-Technologie eingemessen und in die Mikropartikelpopulation CO499 eingeteilt. **a** Hierbei kann man die Verteilung der Größe innerhalb der Mikropartikelpopulation feststellen. Die Größe variiert zwischen 5,5 µm und 12,5 µm. **b** Aufgrund der Größenverteilung der Mikropartikel und dem logarithmischen Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Coumarin und Rhodamin kann man die Mikropartikel in Populationen einteilen, sodass die VideoScan-Technologie die Mikropartikel eindeutig zur Population CO499 zuordnen kann.



**Abb. 52: Größenverteilung der Mikropartikel CO500**

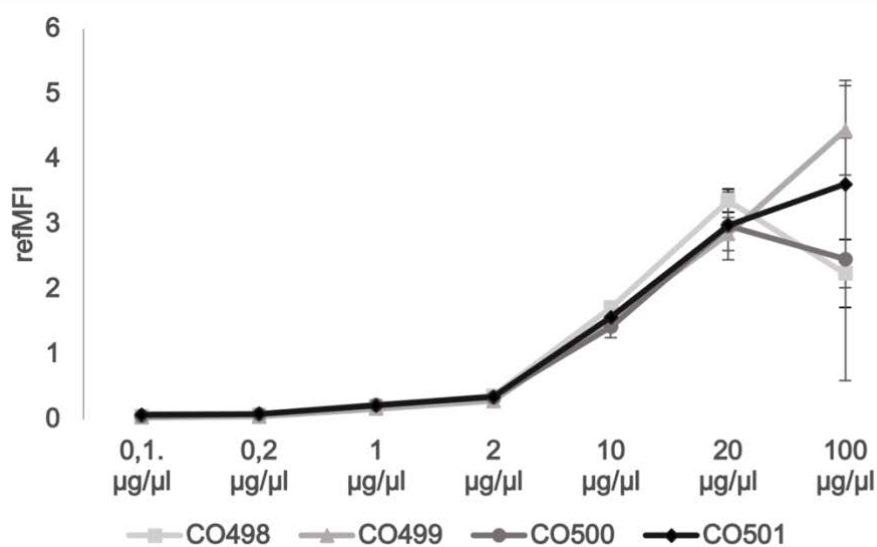
Die hydrophoben Mikropartikel HVMP69-C10 wurden mittels VideoScan-Technologie eingemessen und in die Mikropartikelpopulation CO500 eingeteilt. **a** Hierbei kann man die Verteilung der Größe innerhalb der Mikropartikelpopulation feststellen. Die Größe variiert zwischen 5,5 µm und 13,0 µm. **b** Aufgrund der Größenverteilung der Mikropartikel und dem logarithmischen Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Coumarin und Rhodamin kann man die Mikropartikel in Populationen einteilen, sodass die VideoScan-Technologie die Mikropartikel eindeutig zur Population CO500 zuordnen kann.

**a****b****Abb. 53: Größenverteilung der Mikropartikel CO501**

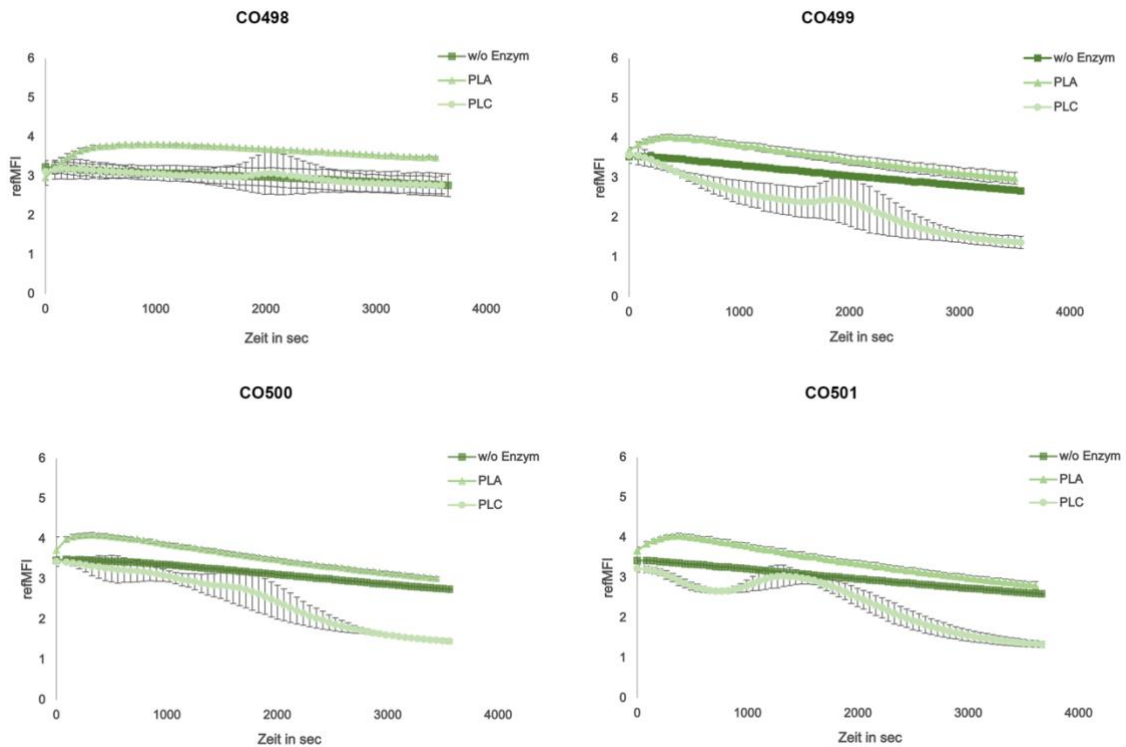
Die hydrophoben Mikropartikel HVMP69-18 wurden mittels VideoScan-Technologie eingemessen und in die Mikropartikelpopulation CO501 eingeteilt. **a** Hierbei kann man die Verteilung der Größe innerhalb der Mikropartikelpopulation feststellen. Die Größe variiert zwischen 5,5 µm und 11,5 µm. **b** Aufgrund der Größenverteilung der Mikropartikel und dem logarithmischen Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe Coumarin und Rhodamin kann man die Mikropartikel in Populationen einteilen, sodass die VideoScan-Technologie die Mikropartikel eindeutig zur Population CO501 zuordnen kann.

**Tab. 23: Multiwellplatten für die Immobilisierung von hydrophoben Mikropartikeln**

Multiwellplatten	Hersteller
96-Well; Polystyrol; Flachboden	Greiner bio-one
96 Well; Polypropylen	Greiner bio-one
96 Well; Nunc Thermo	Thermo Fisher Scientific
96 Well; Maxi Sorb Click	Thermo Fisher Scientific
96 Well; Zellkultur	TH Geyer
96 Well; Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific
96 Well; ImmunoGrade	Brand®
96 Well; LipoGrade	Brand®
96 Well	Sarstedt
96 Well	IBIDI
96 Well PolySorP	Thermo Fisher Scientific

**Abb. 54: Oberflächenbeladung der Mikropartikel mit PE-Cy5**

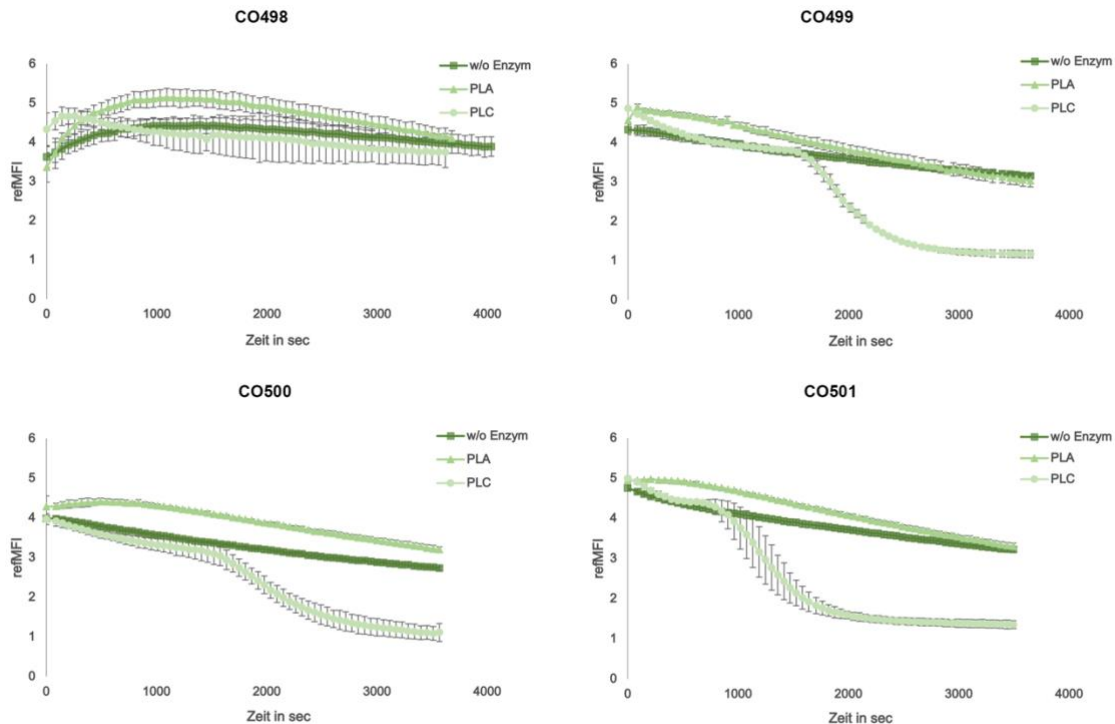
Für die optimale Beladungsdichte der Mikropartikel wurden die Mikropartikel CO498 CO499, CO500 und CO501 mit unterschiedlichen Konzentrationen des Phospholipids PE-Cy5 (0,1 µg/µl bis 100 µg/µl) gekoppelt. Das höchste Fluoreszenzsignal wird mit einer Konzentration von 20 µg/µl des Phospholipids PE-Cy5 erreicht, eine höhere Konzentration führt bei allen Mikropartikel zu einer sehr hohen Standardabweichung.



**Abb. 55: Gerichtete Bindung des Phospholipid CL-Cy5**

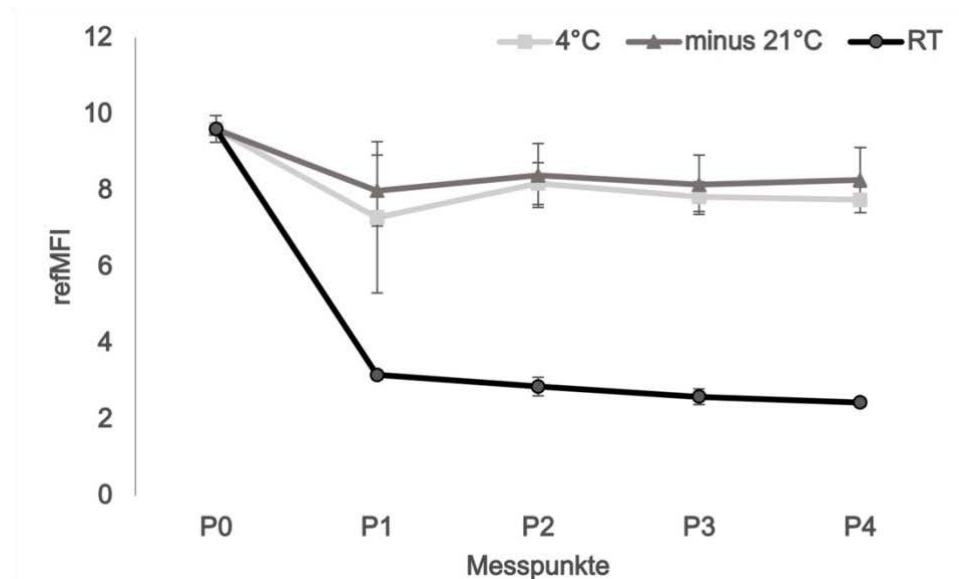
Zur Überprüfung der gerichteten Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide (Bindung mit dem hydrophoben Teil an der Mikropartikeloberfläche) wurden die gekoppelten Mikropartikel CO498 (a), CO499 (b), CO500 (c) und CO501 (d) mit zwei verschiedenen Phospholipasen PLA<sub>2</sub> und PLC inkubiert. Durch die Hydrolyse des hydrophilen Kopfes des Phospholipids vom Glycerin Grundgerüst entfernt die Phospholipase PLC das Fluorophor Cy5 vom Phospholipid, somit kommt es innerhalb 1 h zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals am Mikropartikel. Die Phospholipase PLA<sub>2</sub> entfernt eine Fettsäurekette des Phospholipids, was nicht zur Reduktion der Fluoreszenz führt. Die Inkubation der mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel ohne Enzym zeigt, dass es sich nicht um Bleaching Effekte des Cy5 Fluorophors handelt.





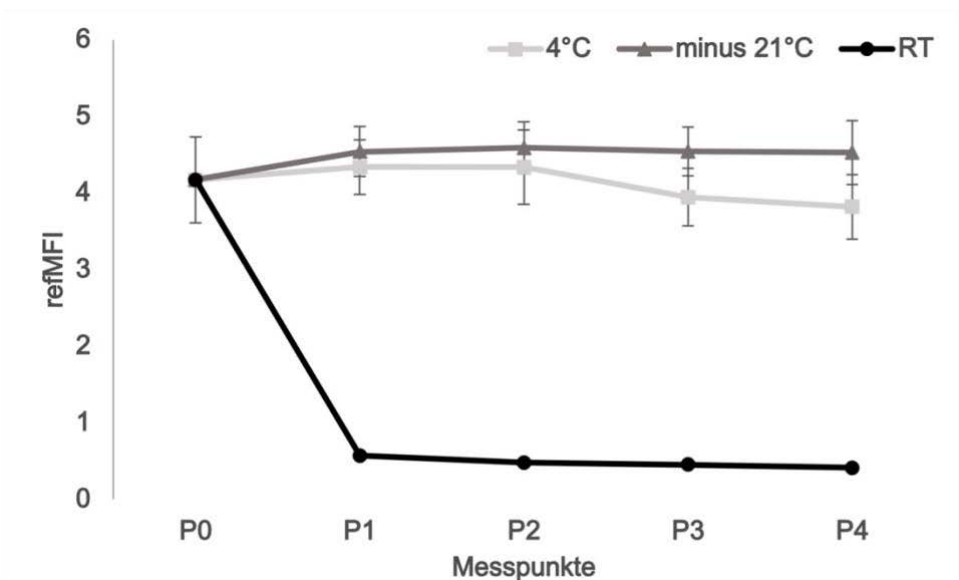
**Abb. 56: Gerichtete Bindung des Phospholipid PE-Cy5**

Zur Überprüfung der gerichteten Bindung der fluoreszenzmarkierten Phospholipide (Bindung mit dem hydrophoben Teil an der Mikropartikeloberfläche) wurden die gekoppelten Mikropartikel CO498 (a), CO499 (b), CO500 (c) und CO501 (d) mit zwei verschiedenen Phospholipasen PLA<sub>2</sub> und PLC inkubiert. Durch die Hydrolyse des hydrophilen Kopfes des Phospholipids vom Glycerin Grundgerüst entfernt die Phospholipase PLC das Fluorophor Cy5 vom Phospholipid, somit kommt es innerhalb 1 h zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals am Mikropartikel. Die Phospholipase PLA<sub>2</sub> entfernt eine Fettsäurekette des Phospholipids, was nicht zur Reduktion der Fluoreszenz führt. Die Inkubation der mit Phospholipiden gekoppelten Mikropartikel ohne Enzym zeigt, dass es sich nicht um Bleaching Effekte des Cy5 Fluorophors handelt.



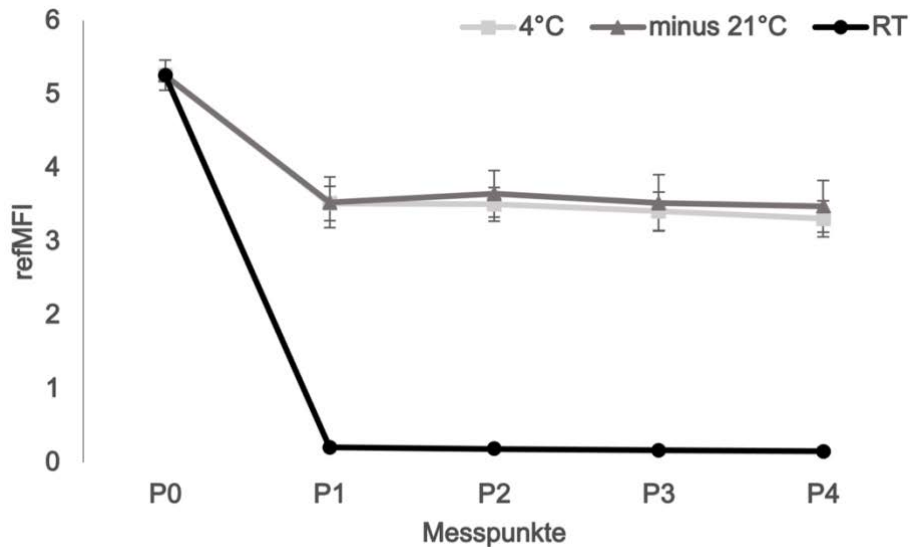
**Abb. 57: Stabilität des Phospholipids PE-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (PE-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche der Mikropartikelpopulationen CO512 bis CO515 wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen **a** 4 °C, **b** -21 °C und **c** RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert von 2-3.



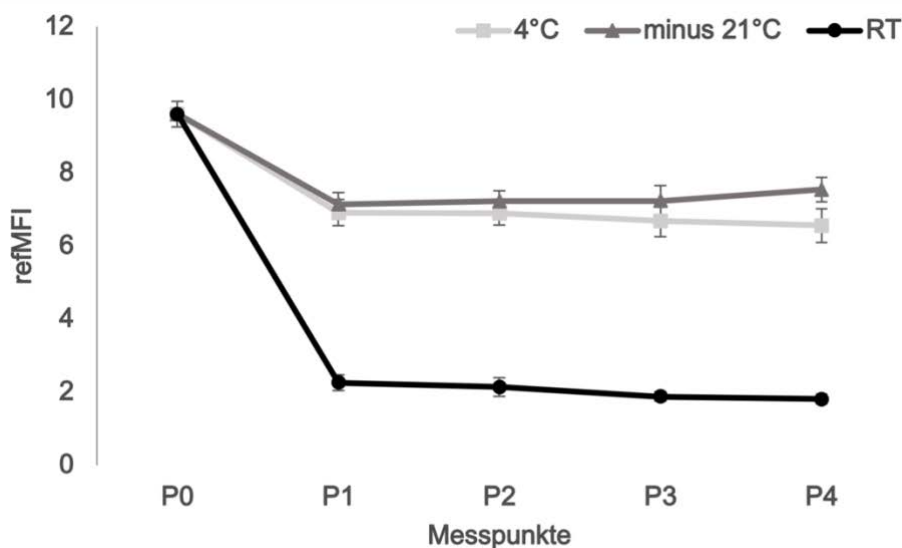
**Abb. 58: Stabilität des Phospholipids PC-Cy5 bei unterschiedlichen Temperaturen**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (PC-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche der Mikropartikelpopulationen CO512 bis CO515 wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen **a** 4 °C, **b** -21 °C und **c** RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert von 0,5 – 0,7.



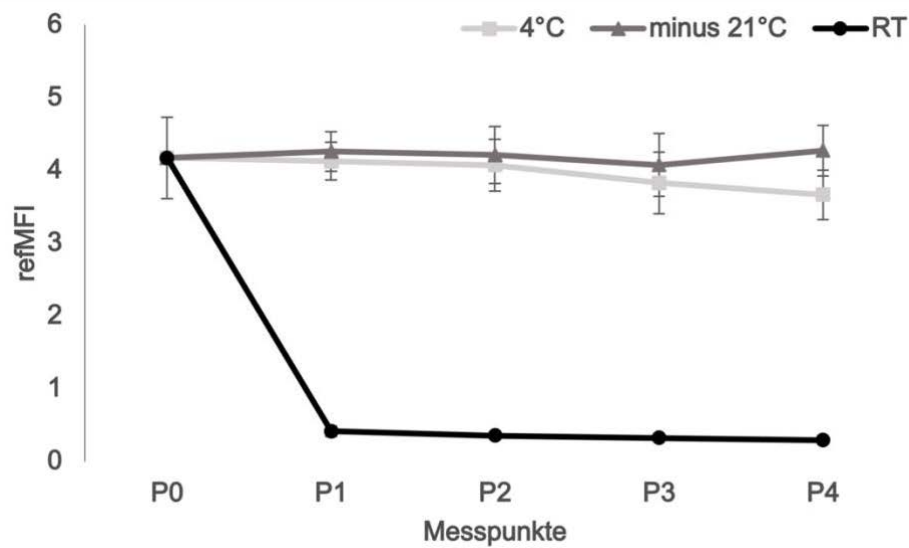
**Abb. 59: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche CL-Cy5**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (CL-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche der Mikropartikelpopulationen CO516 bis CO519 wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen a 4 °C, b -21 °C und c RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert von ungefähr 0.



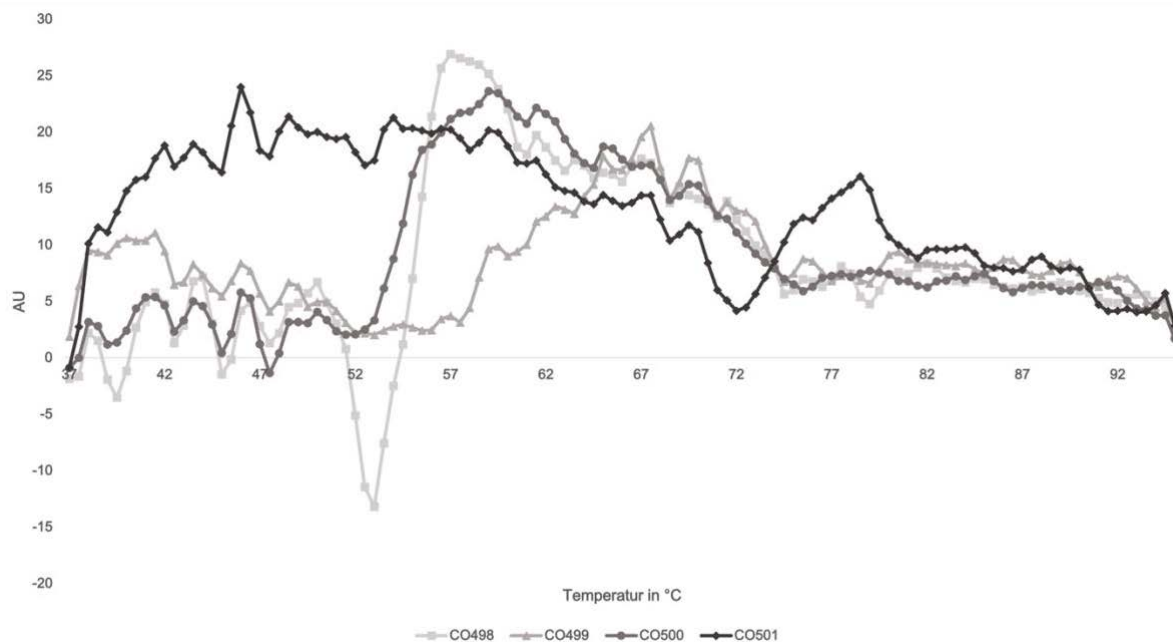
**Abb. 60: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche PE-Cy5**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (PE-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche der Mikropartikelpopulationen CO516 bis CO519 wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen a 4 °C, b -21 °C und c RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert ungefähr 2.



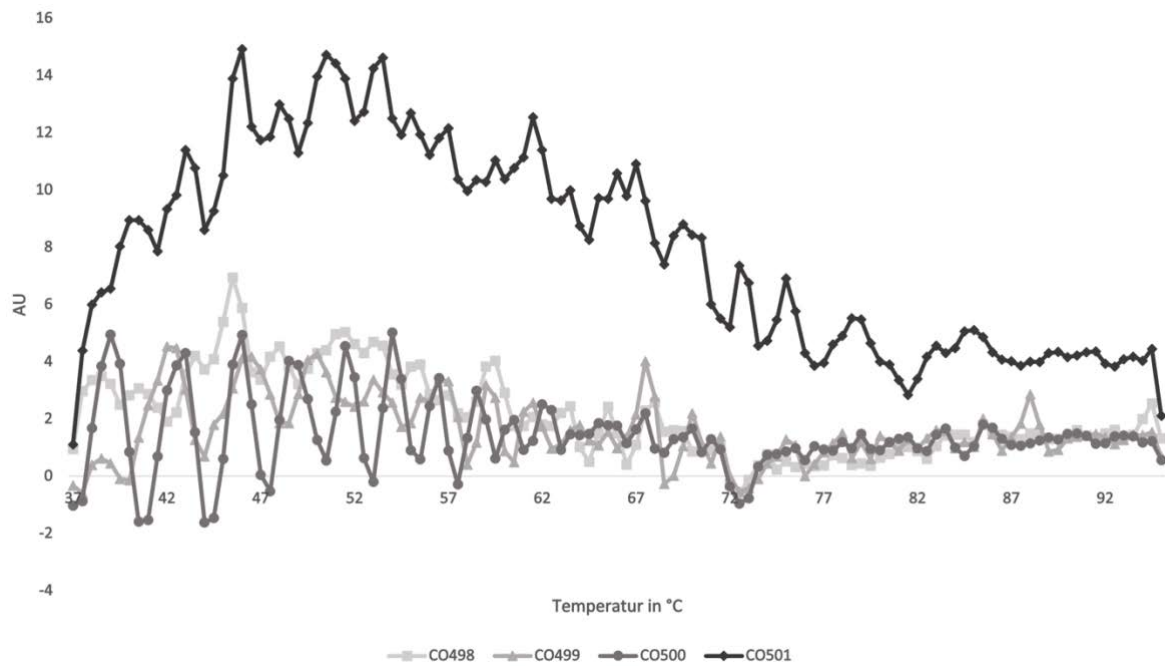
**Abb. 61: Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche PC-Cy5**

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals (PC-Cy5) an der Mikropartikeloberfläche der Mikropartikelpopulationen CO516 bis CO519 wurde über die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen a 4 °C, b -21 °C und c RT über einen Zeitraum von 4 Wochen bestimmt. P0 symbolisiert den Ausgangswert, P1 - P4 die Wochen 1 - 4. Nur die Lagerung der Mikropartikel bei RT reduziert das Fluoreszenzsignal auf einen Wert von 0.



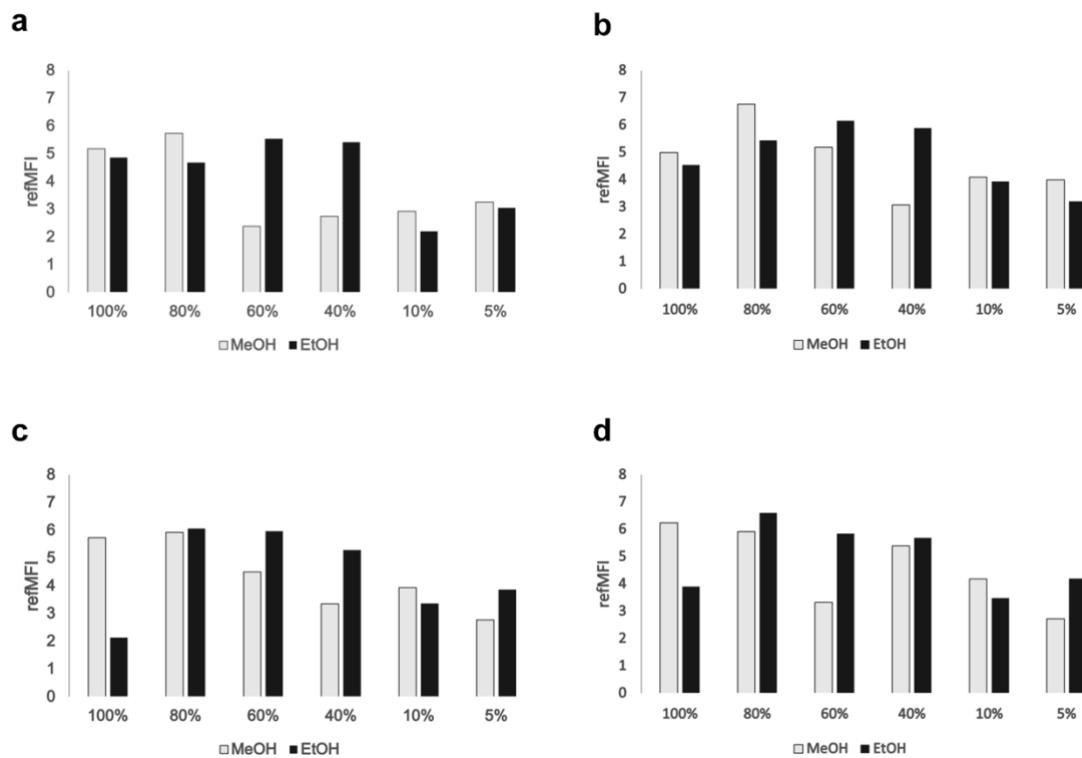
**Abb. 62: Abschmelzen des Phospholipids PE-Cy5**

Um die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche zu bestimmen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse von 37 °C bis 95 °C für die Mikropartikelpopulationen CO499 bis CO501 durchgeführt. Die Mikropartikelpopulation CO499 zeigt eine Schmelztemperatur von 53 °C. Für die anderen Mikropartikelpopulationen lässt sich keine Schmelztemperatur zuordnen.



**Abb. 63: Abschmelzen des Phospholipids PC-Cy5**

Um die Stabilität der Phospholipide an der Mikropartikeloberfläche zu bestimmen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse von 37 °C bis 95 °C für die Mikropartikelpopulationen CO499 bis CO501 durchgeführt. Für das Phospholipid PC-Cy5 lässt sich an allen Mikropartikelpopulationen keine Schmelztemperatur zuordnen.



**Abb. 64: Alkoholreihe Methanol und Ethanol im Vergleich PE-Cy5**

Zur Optimierung der Kopplungsbedingungen der Phospholipide wurden das Phospholipid PE-Cy5 in Alkoholverdünnungsreihen (Methanol und Ethanol) von 5 % bis 100 % an vier verschiedene Mikropartikelpopulationen CO498 (a), CO499 (b), CO500 (c) und CO501 (d) gekoppelt. Das höchste Fluoreszenzsignal wird mit einer 80 % Methanollösung (Ausnahme bildet CO501 - d) und mit einer 60 % Ethanollösung (Ausnahme bilden CO500 – c und CO501 - d) erreicht.

## 5.1 Danksagung

Mit diesen Zeilen möchte ich die Gelegenheit nutzen und ein paar Personen meinen Dank aussprechen. Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. habil. Peter Schierack für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in der AG Multiparameterdiagnostik durchzuführen. Dafür, dass alle möglichen Ressourcen ausgeschöpft und alle Kooperationen ausgenutzt wurden, um gegebene Hürden überspringen zu können. Ein Dank geht ebenfalls an PD Dr. Stefan Rödiger für intensive Gespräche und Diskussionen über Möglichkeiten, Probleme zu überwinden, zu lösen und die Entwicklung der Nachweise voranzutreiben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Werner Lehmann für die Möglichkeit, Versuche in der Firma attomol durchzuführen und das langjährige Know-How nutzen zu können sowie für die vielen Videokonferenzen für den Austausch und das auf dem Laufenden halten. Auch Enrico Berger danke ich für seine Zeit und die Erfahrung aus dem Labor und die ein oder andere futuristische Diskussion hinsichtlich der Problemlösung vom Bindungsverhalten von Mikropartikeln an Multiwellplatten und wie man diese überprüfen könnte.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Uwe Schedler, Fridtjof Lechart und vor allem Dr. Thomas Thiele für den Aufenthalt in Berlin bei der Firma PolyAn GmbH, die vielen zur Verfügung gestellten Mikropartikel und Videokonferenzen, Telefonate und E-Mails en masse.

Vor allem aber möchte ich mich bei den Kollegen aus der AG Multiparameterdiagnostik bedanken, insbesondere Juliane Schiebel, Eric Brose und Dr. Christoph Jurischka, die den Büro- und Laboralltag besser machten, durch konstruktive Diskussionen, Zuhören, Beschwerdeaufnahmen, Ratschläge und unvorhersehbare Lachanfänge. Dies erleichterte die Arbeit und ließ einen manche unmöglichen Grenzen und Barrieren überwinden. Danke auch an Jörg Weinreich fürs Teilen des Arbeitsweges von Dresden nach Senftenberg und zurück.

Mein größter Dank allerdings geht an meine Familie(n) und Freunde, insbesondere an meine Mama und Oma für die zahlreichen Telefonate und die Motivation durchzuhalten und an meinen Partner Toni Reeck für das Ertragen aller Höhen und Tiefen, das Motivieren nicht aufzugeben und unmöglich scheinende Lösungen zu finden. Und für die großartigen Ablenkungen durch Freunde, mal wieder auf andere Gedanken zu kommen und nicht an die Arbeit zu denken. Danke.

## 5.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt sowie alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Stellen gekennzeichnet habe. Diese Arbeit hat in ähnlicher oder gleicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Dresden,

Franziska Dinter



## 5.3 Publikationen

### 5.3.1 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation und eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen

Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind drei wissenschaftliche Zeitschriftenartikel, welche teilweise schon veröffentlicht oder bei einem Journal eingereicht wurden.

Die Erarbeitung der wissenschaftlichen Artikel erfolgte mit Hilfe von Co-Autoren. Der eigene Anteil wird im unten aufgeführten Schema bewertet und dargestellt.

Position 1	Position 2	Position 3
Konzeptidee	Durchführung der Experimente, Probenanalysen, Datenanalysen, grafische Darstellungen, Softwareprogrammierung, statistische Test	Schreiben des Manuskripts

Die Zahlen in der Spalte „Beitrag“ zeigen jeweils den eigenen Anteil zu jeder Veröffentlichung an:

< 30 % Eigenanteil = 1    30 % - 70 % Eigenanteil= 2    > 70 % Eigenanteil = 3

Beitrag	Veröffentlichung
2,3,3	<b>Dinter F</b> , Burdukiewicz M, Schierack P, Lehmann W, Nestler J, Dame G, Rödiger S. (2019). Simultaneous detection and quantification of DNA and protein biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. Anal.Bioanal.Chem. 411:7725-7735
2,3,3	<b>Dinter F</b> , Thiele T, Schedler U, Lehmann W, Schierack P, Rödiger S (Preprint) Immobilisation of Lipophilic and Amphiphilic Biomarker on Hydrophobic Microbeads.
?,?,?	<b>Dinter F</b> , Jurischka C, Brose E, Schedler U., Schierack P, Rödiger S (in Bearbeitung) Hydrophobic microbeads, their application in diagnostics and future perspectives.

### 5.3.2 Gesamte Veröffentlichungsliste und sonstige Beiträge

#### Gesamtliste der Publikationen

**Dinter F**, Thiele T, Schedler U, Lehmann W, Schierack P, Rödiger S (Preprint)  
Immobilisation of Lipophilic and Amphiphilic Biomarker on Hydrophobic Microbeads.

**Dinter F**, Jurischka C, Brose E, Weiss R, Schierack P, Rödiger S (Preprint)  
Hydrophobic microbeads, their application in diagnostics and future perspectives.

Geithe C, Zeng B, Schmidt C, **Dinter F**, Roggenbuck D, Lehmann W, Dame G, Schierack P, Hanack K, Rödiger S. (preprint) A multiplex microchamber diffusion assay for the antibody-based detection of microRNAs on randomly ordered microbeads

Jurischka C, **Dinter F**, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, Fayziev B, Schierack P, Fischer T, Rödiger S. (2020) An explorative study of polymers 3D printing of bioanalytical test systems. *Clinic. Hemor. Micro.* 75: 57-84

**Dinter F**, Burdukiewicz M, Schierack P, Lehmann W, Nestler J, Dame G, Rödiger S. (2019). Simultaneous detection and quantification of DNA and protein biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. *Anal.Bioanal.Chem.* 411:7725-7735

Jurischka C, **Dinter F**, Sowa M, Noack J, Schiebel J, Roggenbuck D, Schierack P, Rödiger S. (2019). Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. *Jour. Cell Bio.* 4:15-22

Shcheslavskiy V I, Neubauer A, Bukowiecki R, **Dinter F**, Becker W. (2016). Combined fluorescence and phosphorescence lifetime imaging. *Appl.Phys.Lett*; 108, 091111

---

### Buch-/Zeitschriftenbeiträge

**Dinter F**, Jurischka C, Weiss R, Rödiger S. (2020). Multiparametrische Antikörperdetektion für die Diagnostik. BIOSpektrum. 03.20 265-267

**Dinter F**, Schierack P, Dame G, Burdukiewicz M, Rödiger S (2019) Zusammenführung von Labor- und Point-of-Care-Testmethoden zu einer eHealth-Plattform. Digilog, Band 1 S. 104-107

### Konferenzbeiträge

- 14th Dresden Symposium on Autoantibodies  
(10.09.2019 – 13.09.2019; Dresden, Deutschland)
  - Poster:  
“Simultaneous Detection and Quantification of DNA and Protein Biomarkers in a Microfluidic Microbead Chip”
- 2<sup>ND</sup> European Biosensor Symposium 2019 – EBS 2019  
(18.02.2019 – 21.02.2019; Florenz, Italien)
  - Blitz Präsentation und Poster:  
„Simultaneous Detection and Quantification of DNA and Protein Biomarkers of Cardiovascular Diseases in a Microfluidic Microbead Chip”
- International Biotech Innovation Days – IBID 2018  
(23.05.2018 – 25.05.2018; Senftenberg, Deutschland)
  - Poster:  
“Detection of Cardiovascular Disease Biomarkers in a Microfluidic Microbead Chip System”
- Potsdam Days on Bioanalysis 2017  
(23.11.2017 – 24.11.2017); Potsdam, Deutschland)
  - Poster:  
“Integration of Cardiovascular Disease Biomarker in a Microfluidic Microbead Chip”