

Entwicklung eines quantitativen Lateral-Flow-Tests für Amitriptylin

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Monika Conrad
aus Stuttgart

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.11.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Carolin Huhn

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein quantitativer Lateral-Flow-Test für das Antidepressivum Amitriptylin entwickelt. Der Fokus der Teststreifenentwicklung lag auf dem Erkennungselement als wichtigstem Bestandteil eines Lateral-Flow-Tests. Um einen geeigneten Antikörper zu finden, wurden drei Antikörper gegen Amitriptylin in einer biomolekularen Interaktionsanalyse charakterisiert. Zur Auswertung der hierzu notwendigen Experimente wurden verschiedene mathematische Ansätze anhand von simulierten Bindungskurven einer Kinetik pseudo-erster Ordnung auf ihre Eignung für die biomolekulare Interaktionsanalyse untersucht. Die erhaltenen Erkenntnisse wurden auf reale Messungen angewandt, wobei die Bindungskurven mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie erfasst wurden. Nach der Identifizierung des Antikörpers mit höchster Affinität zu Amitriptylin wurden Methoden zur Anbindung des Antikörpers an Goldnanopartikel für die Verwendung in Lateral-Flow-Tests untersucht. Über sechs verschiedene Synthesewege hergestellte Konjugate wurden verglichen. Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde die Ausbeute der hergestellten Konjugate für jeden Syntheseweg bestimmt. Zusätzlich wurde mit dynamischer Lichtstreuung die Stabilität gegenüber Agglomeration bewertet. Für die Beurteilung, ob die synthetisierten Konjugate für Lateral-Flow-Tests geeignet sind, wurden Kalibrierkurven auf strukturierten Teststreifen aufgenommen. Parallele Kanäle auf den verwendeten Teststreifen ermöglichten mehrere Messungen auf einem Streifen. Die Konjugatsynthese, bei der sich der Antikörper nach UV-Aktivierung direkt an die Oberfläche anlagerte, war am besten geeignet, da das Konjugat vergleichsweise wenig Agglomeration aufwies und auf den Teststreifen reproduzierbare Ergebnisse mit niedriger minimal nachweisbarer Konzentration zeigte. Kalibrierkurven in mit Amitriptylin gespiketem Serum bestätigten, dass die Nachweisempfindlichkeit mit $MDC = 2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ ausreichend niedrig war, um Amitriptylin in Patientenproben zu quantifizieren. Dies erlaubt die Verwendung der Teststreifen für therapeutisches Drug Monitoring. Da bei den Immunoassays eine nicht-lineare Kalibrierfunktion vorlag, wurde ein neues Auswerteverfahren für das Aufstockverfahren für eine robuste Quantifizierung entwickelt. Die Anwendbarkeit des Auswerteverfahrens wurde durch Simulationen und Bestimmung von Testosteron in verschiedenen Matrices mit Messungen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie bestätigt. Testosteron wurde als Analyt gewählt, da für den Testosteron-Nachweis ein etablierter Assay vorlag und dieser als Modellsystem fungieren kann. Die Ergebnisse bestätigen, dass das Aufstockverfahren auch in Immunoassays eingesetzt werden kann.

Abstract

With the growing demand for therapeutic drug monitoring for good patient care, lateral flow assays add an important contribution to point-of-care testing. In this work, a quantitative lateral flow assay for the antidepressant amitriptyline was developed. The focus of the test strip development was on the recognition element as the most important component of the final lateral flow assay. Antibody gold nanoparticle conjugates were used for the specific recognition of the analyte. To find a high-affinity antibody, three antibodies against amitriptyline were characterised in a biomolecular interaction analysis. For the evaluation of the required kinetic experiments, various algorithms were examined assessing their suitability for biomolecular interaction analysis. These mathematical approaches were compared in-depth using simulated binding curves following pseudo-first order kinetics. The findings obtained were applied to real reflectometric interference spectroscopy measurements of anti-amitriptyline antibodies to analyse their kinetic and thermodynamic characteristics. After identification of the antibody with the highest affinity for amitriptyline, methods for conjugation of antibodies to gold nanoparticles were investigated. Conjugates prepared via six synthetic routes were compared. UV/Vis spectroscopy was used to determine the yield of the conjugates produced for each synthetic route. In addition, dynamic light scattering was used to assess their stability to agglomeration. To judge their performance on lateral flow assays, calibration curves were recorded on structured lateral flow assays. Parallel channels on the test strips allowed multiple measurements on one strip. The conjugate synthesis with direct coating after UV activation of the antibody was the most suitable as it showed comparatively little aggregation and reproducible results on the test strips. Calibration curves in serum spiked with amitriptyline showed that the minimum detectable concentration $MDC = 2,2\mu\text{g l}^{-1}$ was sufficient to quantify amitriptyline in patient samples. This allows the use of the test strips for therapeutic drug monitoring. Since immunoassays have non-linear calibration curves, an evaluation procedure using the standard addition method was developed to establish a robust quantitative read-out for immunoassays. The applicability of the evaluation procedure was confirmed by simulations and quantification of testosterone in different matrices with reflectometric interference spectroscopy measurements. Testosterone was chosen as an example analyte as the testosterone assay is established and can act as a model system. The results confirm that the standard addition method can be transferred to immunoassays with nonlinear calibration curves.

Vorwort

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Rahmen des Projektes „On-Chip kalibrierender Biosensor für kleine Analyten im Bereich POCT und Umwelt“ im Fach Analytische Chemie am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe Gauglitz zwischen September 2020 und September 2023.

Teile dieser Arbeit wurden auf internationalen und nationalen Konferenzen als mündliche Beiträge und Posterpräsentationen vorgestellt. Inhalte und graphische Materialien wurden in ähnlicher Form auf diesen Konferenzen verwendet. Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Monika Conrad, Peter Fechner, Günther Proll, Günter Gauglitz, **2022**, Comparison of methods for quantitative biomolecular interaction analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414, 661-673. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03623-x>
- Monika Conrad, Günther Proll, Esteban Builes-Münden, Andreas Dietzel, Sven Wagner, Günter Gauglitz, **2023**, Tools to compare antibody gold nanoparticle conjugates for a small molecule immunoassay, *Microchimica Acta* 190, 62. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05637-x>
- Monika Conrad, Peter Fechner, Günther Proll, Günter Gauglitz, **2023**, (R)evolution of the standard addition procedure for immunoassays, *Biosensors* 13(9), 849. <https://doi.org/10.3390/bios13090849>
- Deutsche Patentanmeldung: Mehrkanal-Teststreifen und Herstellungsverfahren dafür - Technische Universität Braunschweig, Eberhard Karls Universität Tübingen, Erfinder: Andreas Dietzel, Monika Leester-Schädel, Esteban Builes-Münden, Günter Gauglitz, Günther Proll, Johanna Hutterer, Monika Conrad, DE 10 2021 214 853 B3, Dez 2021.

Im Rahmen dieser Promotion wurde das Modulpraktikum von Albert Kraft (2022) unter Betreuung der Autorin angefertigt. Die im Protokoll beschriebenen Ergebnisse sind auch Bestandteil dieser Dissertation.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielsetzung	1
2	Theorie	5
2.1	Biochemische Grundlagen	5
2.1.1	Antikörper	5
2.1.2	Antikörper-Antigen-Wechselwirkung	6
2.1.3	Immunoassay Testformate	7
2.2	Kinetik	10
2.3	Biosensoren	13
2.3.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	14
2.3.2	Lateral-Flow-Assay	15
2.3.3	Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate	17
2.4	Dynamische Lichtstreuung	19
2.5	Aufstockverfahren	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Verbrauchsmaterialien	23
3.1.1	Chemikalien und Puffer	24
3.1.2	Proteine und Antikörper	26
3.2	Software	27
3.3	Geräte	27
3.3.1	Aufbau Fluidik für RIfS	29
3.4	Methoden	30
3.4.1	BIA-Kinetik-Simulation	30
3.4.2	Oberflächenmodifizierung der RIfS-Transducer	30
3.4.3	RIfS-Messungen	31
3.4.4	Auswertung der Bindungskurven	32
3.4.5	Entwicklung Lateral-Flow-Teststreifen	34
3.4.6	Aufstockverfahren	39

4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Quantitative Biomolekulare Interaktionsanalyse	43
4.1.1	Vergleich von Auswertalgorithmen mit simulierten Bindungskurven	43
4.1.2	Vergleich monoklonaler Antikörper	51
4.1.3	Vergleich der Auswertung simulierter und realer Messungen	68
4.2	Vergleich der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate	71
4.2.1	Ausbeute der Konjugatsynthesen	71
4.2.2	Größe und Agglomeration der Konjugate	74
4.2.3	Konjugatvergleich mittels Lateral-Flow-Teststreifen	76
4.3	Assayoptimierung Lateral-Flow-Test	78
4.3.1	Spottingoptimierung	78
4.3.2	Auslesung der Farbdaten	79
4.4	Lateral-Flow-Test für Amitriptylin	80
4.4.1	Bindungshemmtest mit Kalibrierung	80
4.4.2	Untersuchung der Kreuzreaktivitäten	81
4.4.3	Multi-Analyt-Kalibrierung	83
4.4.4	Magnetische Separation für Verbesserung der Nachweisgrenze	85
4.5	Aufstockverfahren für nichtlineare Kalibrierfunktion	87
4.5.1	Simulationen zum Aufstockverfahren	87
4.5.2	Aufstockverfahren bei Messungen	91
5	Zusammenfassung und Ausblick	96
	Literaturverzeichnis	110
	Abkürzungsverzeichnis	111
	Abbildungsverzeichnis	113
	Tabellenverzeichnis	116
A	Anhang	117
A.1	Matlab-Skript	118
A.2	Fit-Parameter	124
B	Veröffentlichungen	126
B.1	Publikationen	126
B.2	Vorträge	126
B.3	Poster	127

1. Motivation und Zielsetzung

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) ist bei vielen Medikamenten empfehlenswert, da Patient:innen durch ihre genetische Veranlagung oder physiologisch bestimmte Umstände einen individuell unterschiedlichen Stoffwechsel haben^[1] und durch Unterschiede in Absorption, Verteilung und Ausscheidung aus der gegebenen Dosis nicht auf die Plasmakonzentration geschlossen werden kann^[2]. Bei TDM wird der Plasmaspiegel eines Medikaments zu Beginn und während der Medikamententherapie gemessen, sodass die Wirkstoffdosis individuell eingestellt werden kann. Da das therapeutische Fenster bei einigen Medikamenten schmal ist, muss die Plasmakonzentration genau eingestellt werden. Mit TDM können durch bessere Einstellung der Medikamentendosis schwerwiegende Nebenwirkungen vermieden werden. Für viele Patient:innen kann TDM zu einer besser angepassten medikamentösen Behandlung führen und sollte weit verbreitet zur Anwendung kommen.

Zur Umsetzung des TDM ist das Point-of-Care Testing (POCT), eine patientennahe Labordiagnostik, notwendig. Zu POCT zählen laboratoriumsmedizinische Verfahren, die direkt am Patientenbett oder in unmittelbarer Nähe zum Patienten oder der Patientin stattfinden. Methoden im POCT zeichnen sich durch kurze Analysenzeiten und eine einfache Handhabung aus, sodass die Tests von ungeschultem Personal durchgeführt werden können^[3]. Einerseits zählen Blutgasanalytoren oder Messgeräte für Glukose und andere Metaboliten für nicht übertragbare und chronische Krankheiten wie Diabetes, die eine kontinuierliche Überwachung erfordern, zu POCT. Andererseits gehören auch Lateral-Flow-Assays (LFAs) zu den Methoden des POCTs, wie sie beim Management der Coronapandemie zum Einsatz kamen. POCT kann bei Patient:innen die Einhaltung der verschriebenen Maßnahmen erhöhen, sodass die Medikamente wie verschrieben eingenommen werden. Zudem ist POCT hilfreich, um den Krankheitsfortschritt und den Behandlungsverlauf zu überwachen^[4].

Vor allem bei Psychopharmaka lässt sich der Therapieerfolg nicht anhand physiologischer Befunde beurteilen, da Schwierigkeiten bei der Interpretation von klinischen Nachweisen für therapeutische oder toxische Wirkungen auftreten^[5]. Außerdem kann die gewünschte Wirkung nach Beginn der Behandlung langsam einsetzen^[6], sodass trotz passender Dosis, nicht direkt eine Verbesserung beobachtet wird. Daher ist eine Medikamenteneinstellung aufgrund der Medikamentendosis im Blut empfehlenswert. Durch die

Kontrolle des Blutspiegels wird eine zu geringe Dosis und damit eine verringerte Wirksamkeit oder eine zu hohe Dosis und damit einhergehende Nebenwirkungen vermieden.

Durch die Covid-19-Pandemie kam es weltweit zu einem Anstieg von Depressionen^[7]. Bereits vor der Pandemie waren in Deutschland 9,2 % der Bevölkerung betroffen^[8]. Depressionen werden mit Psychotherapie und Medikamenten wie selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern und Trizyklischen Antidepressiva (TZA) behandelt. Die TZA gehören zu den neuropsychopharmakologischen Medikamenten, bei denen der Nutzen von TDM belegt wurde^[9]. Sie zeichnen sich durch einen Trizyklus in ihrer chemischen Struktur aus^[10]. Der Anteil der Patient:innen, die das TZA Amitriptylin (AMT) erhalten, liegt bei 12,9 %^[11].

Da die Summenkonzentration von AMT und seinem Metaboliten Nortriptylin (NRT) den therapeutischen Effekt bewirkt, wird bei TDM die Summenkonzentration im Plasma über eine chromatographische Analyse erfasst. Üblicherweise wird AMT in Tagesdosen von 50 - 300 mg oral verabreicht^[12]. Um den empfohlenen Plasmaspiegel zu ermitteln, wurde 59 depressiven Patientinnen zweimal täglich 50 mg AMT intramuskulär injiziert und ihr Plasmaspiegel mit Gaschromatographie überprüft^[13]. Bei Patientinnen mit einer Plasmakonzentration zwischen 100 und 200 ng ml⁻¹, der Summe von AMT und NRT, wurden häufiger positive therapeutische Reaktionen, welche anhand etablierter Kriterien beurteilt wurden, sowie signifikant niedrigere Nebenwirkungswerte festgestellt.

Um ein TDM für AMT zu ermöglichen, wird häufig eine aufwändige Analytik im Zentrallabor mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt^[12,14]. Biosensoren bieten eine Alternative zur Laboranalytik, die direkt vor Ort durchgeführt werden kann. Biosensoren erlangen immer mehr Bedeutung nicht nur in der medizinischen Diagnostik, sondern auch in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelsicherheit, in der Landwirtschaft und in der Umweltüberwachung^[15-17]. In dieser Arbeit soll ein Biosensor für TDM und die Quantifizierung von AMT entwickelt werden.

Zum Ausbau von TDM braucht es weitere Entwicklungen des POCT, damit die Geräte leicht zu bedienen, weniger fehleranfällig und kostengünstig sind^[18]. LFAs eignen sich als Tool für POCT und TDM, da sie kostengünstig und von ungeschultem Personal durchführbar sind und schnell ein Ergebnis liefern. Kommerziell erhältliche LFAs eignen sich größtenteils nur für qualitative oder semi-quantitative Analysen. Um sie im TDM einsetzen zu können, sind quantitative Ergebnisse erforderlich. Daher soll in dieser Arbeit ein LFA für die Quantifizierung von AMT in Serum entwickelt werden. Durch ihre einfache Handhabung und schnelle Durchführung können LFAs gut für POCT angewandt werden.

Quantitative LFAs in Kombination mit entsprechenden Auslesegeräten und Auslesesoftware liefern häufig nur ein qualitatives oder semi-quantitatives Ergebnis. Kommerziell erhältlich sind Reader zur Auslesung der Signale von unstrukturierten Teststreifen von verschiedenen Herstellern wie Dialunox^[19], Hund Wetzlar^[20] oder VedaLab^[21]. Mit Hilfe der Reader lässt sich die Variation bei der Auslesung der Teststreifen über Unterschiede

in der Position der Kamera beheben und eine gleichmäßige Beleuchtung sicherstellen, wodurch ein quantitativer Lateral-Flow-Test realisiert werden kann^[22,23]. Der Nachteil einiger kommerziell erhältlicher Reader ist, dass sie nur mit den dazugehörigen Teststreifen der Hersteller verwendet werden können. Daneben gibt es auch Reader, die nach einem entsprechenden Setup und einer Kalibrierung an Lateral-Flow-Tests verschiedener Hersteller angepasst werden können^[19]. Im Gegensatz zu kommerziellen Readern wird auch das Smartphone als Detektor in Betracht gezogen, allerdings häufig in Kombination mit einer Halterung^[24], um den Einfluss von Interferenzfaktoren wie Unterschiede der Position und Beleuchtung zu reduzieren. Bei Verwendung der Kamera eines Smartphones ohne weiteres Equipment zur Quantifizierung sind die genaue Positionierung des Teststreifens unter der Kamera und passende Auswertungsalgorithmen wichtig^[25]. Im Rahmen des Projektes „On-Chip kalibrierender Biosensor für kleine Analyten im Bereich POCT und Umwelt“ soll ein quantitativer LFA für AMT entwickelt werden, der über eine Smartphone-App ausgelesen wird.

Für einen LFA ist das Erkennungselement von zentraler Bedeutung. Eine Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) kann genutzt werden, um aus den verfügbaren Antikörpern den am besten geeigneten zu identifizieren und damit den Assay zu optimieren. Die BIA ist fehleranfällig durch den Einfluss des Anwenders auf den Versuchsaufbau, die Analysemethode, die Qualität der Messungen und die Datenauswertung. Bei der Auswertung der Bindungskurven spielt der auszuwertende Bereich und der Auswertalgorithmus eine wichtige Rolle. Durch unterschiedliche Detektionssysteme, Kurvenanpassungsmethoden und mathematische Modelle sind erhaltene Konstanten oft nicht vergleichbar. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, die verschiedenen mathematischen Ansätze zu vergleichen und ihre jeweiligen Stärken und Schwächen herauszustellen. Dafür werden Bindungskurven simuliert und statistisch verrauscht, um anhand perfekter Daten, die Auswertalgorithmen beurteilen zu können. Die Erkenntnisse der Simulationen werden zur BIA der anti-Amitriptylin Antikörper (anti-AMT Ak) genutzt.

In LFAs werden häufig mit Goldnanopartikeln (AuNP) markierte Antikörper eingesetzt. Um Antikörper an AuNP anzubinden, gibt es verschiedene Methoden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Syntheserouten zu vergleichen, um die optimale Strategie für die Funktionalisierung der AuNP für den zu entwickelnden LFA für AMT zu finden.

Da der LFA der Konzentrationsbestimmung dienen soll, ist eine quantitative Auslesung erforderlich. Eine interne Kalibrierung wäre von Vorteil, da es bei LFAs durch batch-to-batch-Variation oder Schwankungen der Beleuchtung zu Unterschieden beim Auslesen der Signale und damit zu Fehlern bei der Interpretation und Quantifizierung kommen kann. Das Aufstockverfahren ist eine Methode, die robust gegenüber Matrixeffekten ist, und soll für die Anwendung auf Immunoassays mit nichtlinearen Kalibrierfunktionen angepasst werden. Hierfür werden zunächst Signale simuliert, um einen geeigneten Auswertalgorithmus zu

finden. Anhand realer Messungen wird der Algorithmus in der Praxis angewandt.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Auswertemethoden für die BIA mit simulierten und damit perfekten Daten auf ihre Eignung zu untersuchen. Mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) soll ein geeigneter Antikörper gegen AMT identifiziert werden. Anschließend wird der ausgewählte Antikörper an AuNP angebunden, wobei verschiedene Methoden verglichen werden. Die Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate werden für die Entwicklung eines LFAs für AMT in Serum verwendet. Damit soll ein LFA für TDM bei depressiven Patient:innen etabliert werden. Ein weiteres Ziel ist die Entwicklung eines quantitativen Assays über einen geeigneten Auswertealgorithmus, der robust gegenüber Matrixeffekten ist.

2. Theorie

2.1 Biochemische Grundlagen

2.1.1 Antikörper

Das Immunsystem bildet bei Kontakt mit Antigenen spezifische Antikörper. Antigene sind Fremdstoffe, die groß genug sind (>2000 Da)^[26], eine Immunantwort auszulösen wie Proteine, Bakterien oder Viren. Es gibt fünf Hauptklassen der Antikörper, auch Immunglobulin (Ig) genannt, die durch die Struktur der schweren Kette festgelegt werden. IgG ist eine der fünf Klassen, die die höchste Serumkonzentration im Blut aufweist^[26,27]. Bei IgG handelt es sich um ein großes Molekül mit einer Größe von 10 nm^[28] und einem Molekulargewicht von 150 kDa^[26,29]. Die Struktur eines IgG ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

Ein Antikörper lässt sich in Fab- und Fc-Fragment unterteilen, wobei Fc (*fragment crystallizable*) zur konstanten Region zählt, keine antigenbindende Aktivität aufweist und leicht zu kristallisieren ist, während Fab (*fragment antigen binding*) die Paratope des

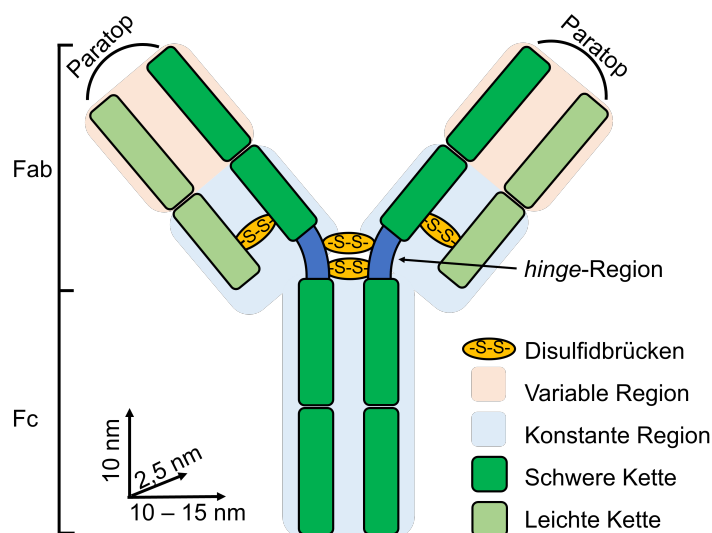


Abbildung 2.1: Struktur eines Antikörpers der IgG-Klasse. Schematischer Aufbau bestehend aus Fab- und Fc-Fragmenten mit schweren Ketten (grün), leichten Ketten (hellgrün) und Disulfidbrücken (gelb). Strukturebende Disulfidbrücken innerhalb der einzelnen Ketten sind für eine bessere Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Antikörpers bilden. Die Unterteilung in Fab und Fc ist auf die Spaltung des IgG durch das Enzym Papain zurückzuführen, welches IgG in drei Stücke schneidet, zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment^[27]. Zwischen den Fab-Fragmenten und dem Fc-Fragment befindet sich die *hinge*-Region, welche als Gelenkregion unabhängige Bewegungen der Fab-Fragmente erlaubt und somit zur Flexibilität des IgG beiträgt. Ein IgG lässt sich alternativ in zwei identische schwere (50 kDa) und leichte (25 kDa) Ketten unterteilen. Die Benennung der schweren und leichten Ketten ergibt sich aus ihrer unterschiedlichen Molekularmasse nach Reduktion der Disulfidbrücken. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden und jede schwere Kette ist über eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette verknüpft. Weitere Disulfidbrücken finden sich innerhalb der einzelnen Ketten, die die räumliche Struktur vorgeben. Insgesamt besitzt ein IgG 16 Disulfidbrücken, davon vier intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den schweren und leichten Ketten und der *hinge*-Region und weitere zwölf intramolekulare Disulfidbrücken. Die variable Region der schweren und leichten Kette bilden zusammen die Antigenbindungsstelle, das Paratop. Jeder Antikörper weist zwei identische Paratope auf. Durch eine riesige Zahl verschiedener Aminosäuresequenzen in der variablen Region entsteht eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die die Erkennung einer großen Zahl verschiedener Antigene ermöglicht. Die Region, an die der Antikörper bindet, heißt Epitop oder Antigen determinante^[26,27,29].

Bei der Produktion von Antikörpern wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wird einem Versuchstier das Antigen injiziert. Bei Kontakt mit einem Antigen bildet das Immunsystem eine Mischung an Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Antigens. Dabei werden B-Lymphozyten (auch als B-Zellen bezeichnet) durch das Antigen aktiviert. Jede B-Zelle ist für ein Antigen spezifisch und bildet einen spezifischen Klon. Nach Aufreinigung aus dem Serum werden Antikörper verschiedener Zellklone, polyklonale Antikörper, erhalten. Monoklonale Antikörper binden hingegen an das gleiche Epitop und werden mit Zellkulturen hergestellt. Dazu werden nach Entnahme der Milz des immunisierten Tiers die B-Zellen aus der Milz mit Myelomzellen fusioniert. Dadurch wird die Eigenschaft der Antikörperproduktion der B-Zelle mit der Eigenschaft der Unsterblichkeit der Myelomzellen vereint. Durch diese Hybridom-Technik werden monoklonale Antikörper in großen Mengen zugänglich^[26,27]. Der Vorteil der monoklonalen Antikörper ist ihre Homogenität mit definierten Kreuzreaktivitätsmustern. Kreuzreaktivität beschreibt die Fähigkeit eines Paratops an andere strukturell ähnliche Epitope zu binden^[30].

2.1.2 Antikörper-Antigen-Wechselwirkung

Die spezifische Wechselwirkung von Antikörper und Antigen wird bei immunanalytischen Methoden zur Detektion genutzt. Dafür müssen Epitop des Antigens und Paratop des Antikörpers komplementär zueinander sein. Als Antigen wird das Molekül bezeichnet,

welches die Immunantwort auslöst. Ein Hapten ist eine niedermolekulare Struktur, die alleine keine Immunantwort auslöst und erst durch Kopplung an einen hochmolekularen Träger immunogen wird. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen erfolgt über nicht-kovalente Wechselwirkungen wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen^[27,29]. Bei der Bindung werden etwa 40 kJ mol^{-1} freigesetzt. Ein IgG-Antikörper, der über zwei Bindungsstellen verfügt, ist bivalent^[27]. Die Avidität beschreibt die Stärke der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen insgesamt, die Affinität beschreibt die Wechselwirkung eines einzelnen Paratops mit seinem Antigen^[29]. Die Affinität liegt für die meisten Antikörper zwischen 10^5 und 10^{11} M^{-1} ^[30].

2.1.3 Immunoassay Testformate

In Immunoassays wird die hochspezifische Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen genutzt, um Analyten in komplexen Matrices wie Blut, Serum oder Urin nachzuweisen. Die Immunoassays können in homogene und heterogene Testformate eingeteilt werden. Bei einem homogenen Testformat findet der Assay in Lösung statt, sodass nur geringe Störeinflüsse auf die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung auftreten. Bei einem heterogenen Assay wird die Erkennungsstruktur an eine feste Phase angebunden, was die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung beeinflussen kann. Die spezifische Reaktion tritt an der Grenzfläche von Lösung zu Oberfläche auf. Wichtig ist dabei, dass die Oberflächenimmobilisierung die Erkennungsstruktur nicht zu stark verändert, dass die Oberfläche den Anbindungsprozess nicht stört und dass keine unspezifische Wechselwirkung des Analyten oder von Matrixbestandteilen auftritt. Durch Waschschrte können nicht gebundene Komponenten entfernt werden. Verschiedene Testformate sind in Abbildung 2.2 und ihre Charakteristika in Tabelle 2.1 dargestellt.

Beim direkten Testformat (Abbildung 2.2 a) wird das Antigen (oder der Antikörper) immobilisiert und die Anbindung des Analyten, Antikörper (oder Antigen), direkt bestimmt. Das Bindungssignal ist proportional zur Analytkonzentration. Die Detektion erfolgt markierungsfrei, daher kann die Signaländerung für kleine Analyten zu gering sein, um detektiert zu werden. Für große Antigene, die durch ihre Enzymaktivität oder optische Eigenschaften nachgewiesen werden können, oder Antikörper ist das Verfahren hingegen gut geeignet.

Beim Sandwich-Assay (Abbildung 2.2 b) werden zwei Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens eingesetzt, sodass sich während des Assays ein Sandwich aus Ak-Ag-Ak bildet. Der Fängerantikörper wird immobilisiert und der Detektionsantikörper bindet aus der Lösung an das Antigen. Der Detektionsantikörper kann mit einer Markierung versehen sein. Dieses Testformat lässt sich sowohl markierungsfrei als auch mit Markierung durchführen. Die Signaländerung ist proportional zur Analytkonzentration.

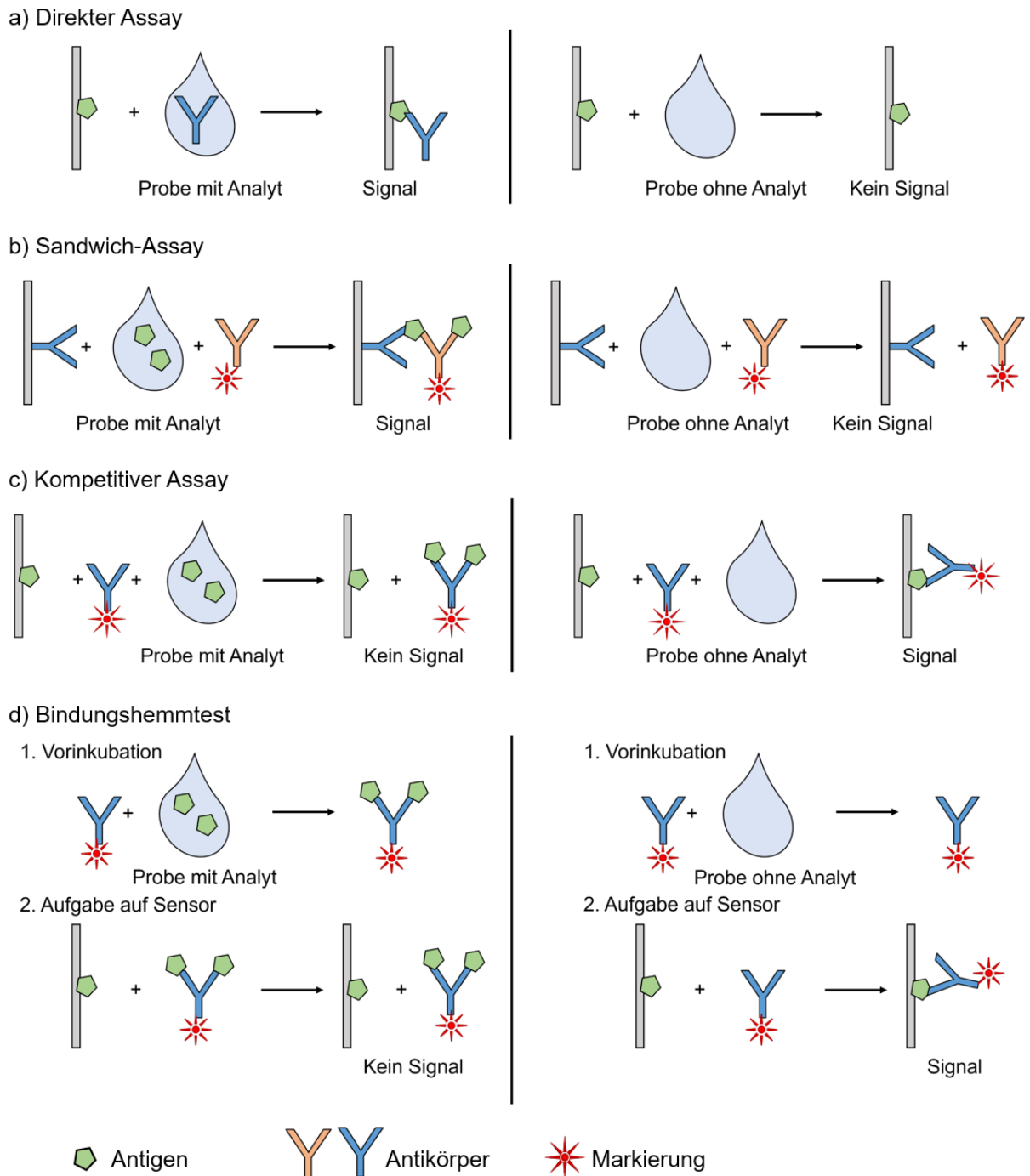


Abbildung 2.2: Prinzip verschiedener Immunoassay-Testformate. a) Direkter Assay: immobilisiertes Antigen auf der Sensoroberfläche, die Antikörper aus der Probe binden an die Erkennungsstruktur, b) Sandwich-Assay: Der Analyt (das Antigen) bindet an den immobilisierten Fängerantikörper und den markierten Detektionsantikörper, c) Kompetitiver Assay: eine definierte Menge markierter Antikörper wird mit der Probe gemischt, es konkurriert das Antigen aus der Probe mit dem auf der Oberfläche immobilisierten, d) Bindungshemmtest: 1. Die Probe mit Analyt wird mit einer definierten Menge Antikörper vorinkubiert. 2. Es binden nur Antikörper aus der Lösung, die nicht von Antigenen aus der Probe blockiert sind.

Tabelle 2.1: Übersicht Testformate

Assay	Mit Markierung möglich	Für kleine Mole- küle geeignet	Vorinkubation nötig	Selektivität
Direkter Assay	-	-	-	+
Sandwich-Assay	+	-	-	++
Kompetitiver Assay	+	+	-	+
Bindungshemmtest	+	+	+	+

Beim kompetitiven Testformat handelt es sich um einen Verdrängungsassay. Es eignet sich für kleine Moleküle. Es gibt verschiedene Möglichkeiten einen kompetitiven Assay zu realisieren. Bei der ersten Variante wird die Probe mit einer bekannten Menge markierter Analytmoleküle vermischt, sodass die unbekannte Menge markierungsfreier Antigene aus der Probe in Konkurrenz zu den zugesetzten markierten Antigenen um die immobilisierten Antikörper steht. Die Analytkonzentration wird indirekt bestimmt, indem das Signal der gebundenen markierten Antigene bestimmt wird. Bei dieser Variante wird die Markierung benötigt. Bei der zweiten Variante (Abbildung 2.2 c) konkurriert das Antigen der Probe mit dem immobilisierten Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers. Der Assay lässt sich sowohl markierungsfrei als auch mit Markierung durchführen. Bei beiden Varianten des kompetitiven Testformats nimmt das Signal mit zunehmender Analytkonzentration ab.

Beim Bindungshemmtest (Abbildung 2.2 d) wird der Analyt ebenfalls indirekt bestimmt und er ist geeignet für kleine Moleküle. Das Antigen wird immobilisiert und die Probe nach einer Vorinkubation mit definierter Menge Detektionsantikörper aufgegeben, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen dem Antigen in der Probe und dem Antikörper einstellen kann. Während der Vorinkubation binden die Paratope der Antikörper an das Epitop des Antigens. Antikörper mit mindestens einer freien Bindungsstelle können nach Probenaufgabe an das immobilisierte Antigen auf der Oberfläche binden. Der Bindungshemmtest ist nicht kompetitiv, wenn die Inkubation vollständig verläuft und sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet. Der Bindungshemmtest lässt sich sowohl markierungsfrei als auch mit Markierung durchführen. Das Bindungssignal ist geringer, je höher die Analytkonzentration ist. Der wesentliche Unterschied zwischen Bindungshemmtest und dem kompetitiven Testformat besteht darin, ob der Analyt mit dem immobilisierten Antigen in einer Konkurrenzreaktion steht. Beim kompetitiven Testformat ist dies der Fall, während beim Bindungshemmtest der Grenzfall betrachtet wird, dass das Gleichgewicht zwischen Antikörper und Antigen der Probe eingestellt ist und durch den Fluss über das immobilisierte Antigen nicht gestört wird.

2.2 Kinetik

Um die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen in Immunoassays zu charakterisieren, wird die Kinetik und die Thermodynamik der Reaktion untersucht. Die Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) beschreibt die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen und quantifiziert diese. Die molekulare Erkennung des Analyten erfolgt über die spezifische Bindung zwischen Molekülen, allgemein zwischen Rezeptor und Ligand. Die Erkennung des Analyten kann mit natürlichen Rezeptoren wie Enzymen oder Antikörpern, mit halbsynthetischen wie Nukleinsäuren und Aptameren oder mit synthetischen wie molekular geprägten Polymeren erfolgen. Im Folgenden wird die Kinetik an heterogener Phase betrachtet, wie sie in dieser Arbeit untersucht wird. Die Detektion der spezifischen Interaktion erfolgt zeitaufgelöst im Fluss mit immobilisiertem Liganden auf einer Transduceroberfläche (Abbildung 2.3). Die Bindungskinetik von Affinitätsreaktionen an

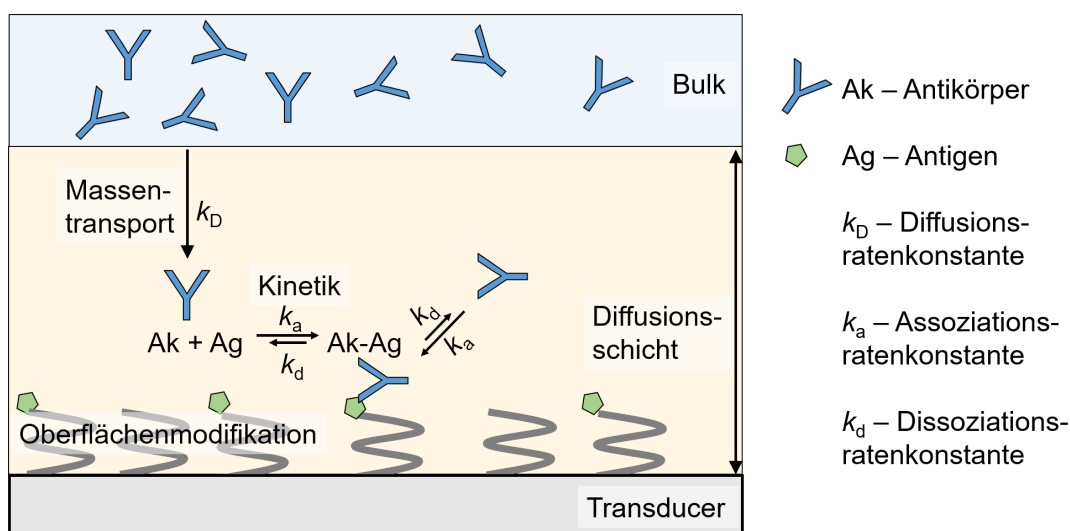


Abbildung 2.3: Antikörper-Antigen-Wechselwirkung an einer Grenzfläche im Durchfluss mit konstanter Diffusionsschicht und Gleichgewichtsreaktionen an der Sensoroberfläche während des Assays. Das Antigen (grün) ist auf dem Transducer (grau) über die Oberflächenmodifikation angebunden. Der Antikörper (blau) aus der Lösung wird im Fluss über den Transducer geleitet und bindet nach Diffusion an die immobilisierten Antigene. Die Reaktion kann unter massentransportlimitierten (Diffusion) oder kinetisch kontrollierten Bedingungen ablaufen.

Grenzflächen setzt sich zusammen aus dem Massentransport an die Oberfläche und der Reaktion an der Oberfläche. Damit handelt es sich um eine Folgereaktion und beobachtet wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Damit die Diffusion an die Oberfläche einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Kinetik hat, sollte die Diffusion etwa zehnmal schneller ablaufen als die spezifische Interaktion an der Oberfläche. Da es sich bei der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung um eine schnelle Wechselwirkungskinetik handelt, kann zur Bestimmung der Reaktionskinetik die Antigenbeladung der Oberfläche ausge-

dünnt, die Antikörperkonzentration erhöht und eine schnelle Flussrate gewählt werden, um den Einfluss des Massentransports zu reduzieren^[31,32]. Für IgG liegt der Diffusionskoeffizient bei etwa $4,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ^[30]. Eine Erhöhung der Flussrate führt zu einer dünneren Diffusionsschicht.

Die Reaktion zwischen Antigen Ag und Antikörper Ak zum Antigen-Antikörper-Komplex AgAk wird vereinfacht mit der Annahme einer Bindungsstelle durch die Reaktionsgleichung (2.1) mit der Assoziationsratenkonstante k_a und der Dissoziationsratenkonstante k_d beschrieben.



Die Assoziation erfolgt nach einem bimolekularen Mechanismus und die Dissoziation monomolekular. Die Affinitätskonstante K lässt sich über das Massenwirkungsgesetz und die Gleichgewichtskonzentrationen oder über die Ratenkonstanten definieren (Gl. (2.2)).

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[\text{AgAk}]}{[\text{Ag}][\text{Ak}]} \quad (2.2)$$

Die Affinitätskonstante beschreibt die Thermodynamik der Reaktion und die Stärke der Bindung zwischen Antikörper und Antigen. Die Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit erlaubt die Interpretation des Mechanismus und der Funktion der biomolekularen Wechselwirkung. Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes wird über die Geschwindigkeitsgleichung (2.3) beschrieben.

$$\frac{d[\text{AgAk}]}{dt} = k_a \cdot [\text{Ak}] \cdot [\text{Ag}] - k_d \cdot [\text{AgAk}] \quad (2.3)$$

Durch den Fluss der Probe über die Oberfläche kann die Antikörperkonzentration $[\text{Ak}]$ als konstant betrachtet werden. Dies erlaubt, die Reaktion zwischen immobilisiertem Antigen und Antikörper in Lösung als Reaktion pseudo-erster Ordnung zu beschreiben. Werden die Variablen auf die Reaktion an der Oberfläche übertragen, entspricht die Beladung Γ der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen $[\text{AgAk}]$ und die Maximalbeladung Γ_{\max} der Maximalkonzentration freier immobilisierter Antigene $[\text{Ag}]$. Nach Ersetzen der Antikörperkonzentration $[\text{Ak}]$ durch c wird Gl. (2.4) erhalten.

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{\max} - k_s \cdot \Gamma(t) \quad (2.4)$$

Die scheinbare Ratenkonstante ist über die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten definiert (Gl. (2.5)).

$$k_s = k_a \cdot c + k_d \quad (2.5)$$

Das beobachtete Signal, die Beladung $\Gamma(t)$, steigt bei Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Änderung der Beladung ist proportional zur Antikörper-Konzentration c

und zur Zahl der unbesetzten Bindungsstellen an der Oberfläche $(\Gamma_{\max} - \Gamma(t))$ ^[33,34]. Aus Gl. 2.4 ergibt sich, dass bei der Auftragung von der Ableitung der Beladung $d\Gamma(t)/dt$ gegen die Beladung $\Gamma(t)$ eine Gerade mit der scheinbaren Ratenkonstante k_s als negativer Steigung erhalten wird. Wird k_s für verschiedene Konzentrationen c ermittelt und gegen die Konzentration c aufgetragen, so lässt sich die Assoziationsratenkonstante k_a aus der Steigung und die Dissoziationsratenkonstante k_d aus dem Y-Achsenabschnitt ablesen. Bei Integration von Gl. (2.4) wird Gl. (2.6) zur Beschreibung der Bindungskurve erhalten^[33].

$$\Gamma(t) = \Gamma_{\text{GG}} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t}) \quad (2.6)$$

Die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} beschreibt die bei einer bestimmten Konzentration maximal erreichbare Beladung der Oberfläche und k_s die Krümmung der Bindungskurve.

Alternativ lässt sich k_s auch über eine Auswertung der Bindungskurve über numerische Integration bestimmen. Integration der Gl. (2.4) ergibt Gl. (2.7). Dabei kann die Integration an verschiedenen Punkten der Bindungskurve gestartet werden. Die Grenzen der Integration t_1 und t_2 sind frei wählbar.

$$\frac{\Gamma(t_2) - \Gamma(t_1)}{t_2 - t_1} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{\max} - k_s \cdot \frac{\int_{t_1}^{t_2} \Gamma(t) dt}{t_2 - t_1} \quad (2.7)$$

Ist $t_1 < t_2$ wird vorwärts integriert, ist $t_1 > t_2$ wird rückwärts integriert. Mit $t_1 = 0$ und $\Gamma(0) = 0$ wie im Falle der vorwärts Integration von Beginn der Assoziationsphase vereinfacht sich Gl. (2.7) zu Gl. (2.8). Die scheinbare Ratenkonstante lässt sich bestimmen, indem der Quotient aus Beladung und Zeit gegen den Quotienten der integrierten Beladung und der Zeit aufgetragen wird.

$$\int_0^{\Gamma(t)} d\Gamma(t) = \int_0^t k_a \cdot c \cdot \Gamma_{\max} - k_s \cdot \Gamma(t) dt \quad (2.8)$$

$$\frac{\Gamma(t)}{t} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{\max} - k_s \cdot \frac{\int_0^t \Gamma(t) dt}{t}$$

Die Dissoziationsratenkonstante k_d kann neben der Bestimmung über die scheinbare Ratenkonstante direkt aus der Dissoziationsphase der Messungen über eine Exponentialfunktion bestimmt werden (Gl. (2.9)). Die Beladung zum Start der Dissoziation gibt Γ_0 an.

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (2.9)$$

Gl. (2.9) kann über Umstellung und Logarithmierung linearisiert werden, wobei Gl. (2.10) erhalten wird.

$$\ln \left(\frac{\Gamma(0)}{\Gamma(t)} \right) = k_d \cdot t \quad (2.10)$$

Ist die Reaktion im Gleichgewicht, ändert sich die Beladung nicht mehr und Gl. (2.4)

lässt sich zur Bestimmung der Affinitätskonstanten zu Gl. 2.11 umformen.

$$\frac{\Gamma_{\text{GG}}}{c} = K \cdot \Gamma_{\text{max}} - K \cdot \Gamma_{\text{GG}} \quad (2.11)$$

Aus der Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} und der Konzentration c wird die Affinitätskonstante über einen Scatchard-Plot bestimmt, indem der Quotient aus Gleichgewichtsbeladung und Konzentration gegen die Gleichgewichtsbeladung aufgetragen wird. Die Affinitätskonstante K wird als negative Steigung erhalten. Zur Messung der Bindungskurven für die kinetische und thermodynamische Charakterisierung werden häufig Biosensoren herangezogen.

2.3 Biosensoren

Ein Biosensor besteht aus einem biologischen Erkennungselement und einem physikalischen Umwandlungselement für die Übersetzung der Bindung des Analyten an das Erkennungselement in ein messbares Signal^[16,17,35]. Das gemessene Signal kann optisch, elektrochemisch, elektrisch, thermisch, piezoelektrisch oder magnetisch sein^[36]. Die Biosensoren lassen sich dabei in markierungsfreie Methoden und Methoden mit Markierung unterteilen.

Die Markierung kann beispielsweise ein Fluorophor oder ein Radioisotop sein. Bei Radio-Immuno-Assays wird eine radioaktive Markierung verwendet. Um radioaktives Material zu vermeiden wird häufig ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay mit einer enzymatischen Farbreaktion verwendet^[2]. Auch bei Lateral-Flow-Assays (LFAs) kommen verschiedene Labels zum Einsatz.

Zu den markierungsfreien Methoden gehören Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)^[37], Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *Surface Plasmon Resonance*) (SPR)^[38], Gitterkoppler^[39] und Quarzkristall-Mikrowaage (engl. *Quartz Crystal Microbalance*) (QCM)^[40]. Bei Anbindung des Rezeptors an den immobilisierten Liganden wird ein Bindungssignal in Form von einer Änderung der Masse (QCM), der optischen Schichtdicke (physikalische Schichtdicke · Brechungsindex) bei RIFS, Einwellenlängenreflektometrie^[41] und Bio-Layer-Interferometrie^[42] oder des Brechungsindex bei Gitterkoppler und SPR^[38] erzeugt. Die Vorteile von markierungsfreien Methoden sind, dass keine Störung der Reaktion durch eine konjugierte Markierung auftritt und kein radioaktives Material oder andere Label benötigt werden.

Als Erkennungsmechanismen kommen das Schlüssel-Schloss-Prinzip bei Enzymen, die Antigen-Antikörper-Bindung, das Biotin-Streptavidin-System, Nukleotidsequenzhomologie oder die Rezeptor-Bindung an Zellmembranen infrage^[43]. Damit kann es sich beim biologischen Erkennungselement um Antikörper, Enzyme, Zellen oder Desoxyribonukleinsäure handeln. Für die Entwicklung von Biosensoren spielt die BIA eine wichtige Rolle. Direkte optische Methoden eignen sich zur Untersuchung der Thermodynamik (Affinitätskonstante) und Kinetik (Assoziationsratenkonstante und Dissoziationsratenkonstante).

Die spezifische Erkennung durch Antikörper stellt den Goldstandard der Biosensoren dar^[16]. Biosensoren kommen in der Analytik, Forschung, Industrie, Diagnostik und für therapeutische Zwecke in der Medizin zum Einsatz. Sie spielen damit eine wichtige Rolle für die öffentliche Gesundheit und werden z. B. in Kliniken angewandt. Ihre Vorteile liegen darin, dass sie eine schnelle Detektion in komplexer Matrix, bei hoher Spezifität und geringer Nachweisgrenze durch die Verwendung von Antikörpern bieten^[35].

2.3.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die RIfS basiert auf der Reflexion von Weißlicht an dünnen Schichten (Abbildung 2.4). An Phasengrenzen wird ein Teil des Lichts transmittiert und ein Teil reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen interferieren und ergeben ein Interferenzspektrum. Bei RIfS wird als Transducer ein Glaschip mit einer reflektierenden Schicht verwendet. Weißlicht wird senkrecht auf den Transducer geleitet und das entstehende Interferenzspektrum wird mit dem Spektrometer aufgenommen. Eine Änderung der optischen Schichtdicke durch beispielsweise Anbindung von Antikörpern an immobilisierte Antigene an der Oberfläche des Transducers führt zu einer Verschiebung der Extrema im Interferenzspektrum. Bei Beobachtung der Verschiebung eines Extremums wird eine Bindungskurve erhalten. Die Details der Methode können der Literatur entnommen werden^[37,44].

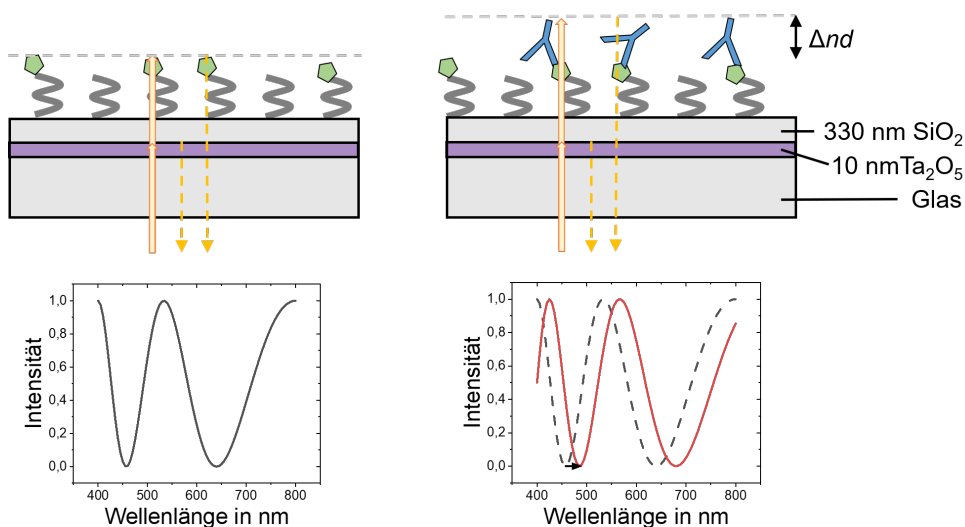


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Weißlicht fällt senkrecht auf den Transducer und wird an den Grenzflächen teilweise reflektiert und transmittiert (oben links). Die reflektierten Teilstrahlen erzeugen ein Interferenzspektrum (unten links). Bei Anlagerung von Analyten an die sensitive Schicht ändert sich die optische Schichtdicke Δnd (oben rechts) und das Interferenzspektrum verschiebt sich (unten links).

2.3.2 Lateral-Flow-Assay

LFAs gehören zu den markierten Methoden und haben in Form von Schwangerschaftstests und Covid19-Schnelltests allgemein bekannte Anwendungen gefunden. Es gibt weitere Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, in der Pharmazie, im Veterinärwesen oder der Umwelt- und Ernährungswissenschaften^[45]. Mit LFAs können Proben mit komplexer Matrix wie Speichel, Urin, Plasma, Serum, Vollblut, Zellen oder Gewebe untersucht werden^[46]. Typische Analyten sind Hormone, Chemikalien, Toxine oder Schadstoffe^[47]. Der Einsatz von LFAs bietet viele Vorteile, wie geringe Kosten, schnelle und einfache Durchführung, Benutzerfreundlichkeit, unkomplizierte Lagerung und Transport. Kommerziell erhältliche LFAs gibt es zur Detektion von Infektionskrankheiten wie HIV^[48], COVID-19^[49] oder Malaria^[50]. Außerdem werden sie zur Detektion körpereigener Biomarker beim Schwangerschaftstest^[51] oder zur Detektion von Drogen^[52,53] verwendet. Da LFAs die ASSURED-Kriterien (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end users*) für Point-of-Care Testing (POCT) erfüllen, finden sie sich auch auf der Liste der essenziellen In-vitro-Diagnostik der Weltgesundheitsorganisation^[54]. ASSURED steht für erschwinglich, empfindlich, spezifisch, benutzerfreundlich, schnell und robust, ausrüstungsfrei und für den Endnutzer verfügbar^[55,56]. Werden LFAs direkt mit dem Auge ausgelesen, erfordern sie kein Equipment zur Detektion.

Bei den LFAs handelt es sich um heterogene Assays, da die Nachweisreaktion zwischen Analyt in Lösung und den immobilisierten Nachweisreagenzien an fester Phase stattfindet. Die üblichen Bestandteile eines LFAs sind Sample-Pad, Konjugat-Pad, Absorbent-Pad, Nitrocellulosemembran mit Test- und Kontrolllinie (Abbildung 2.5)^[57,58]. Das Sample-Pad

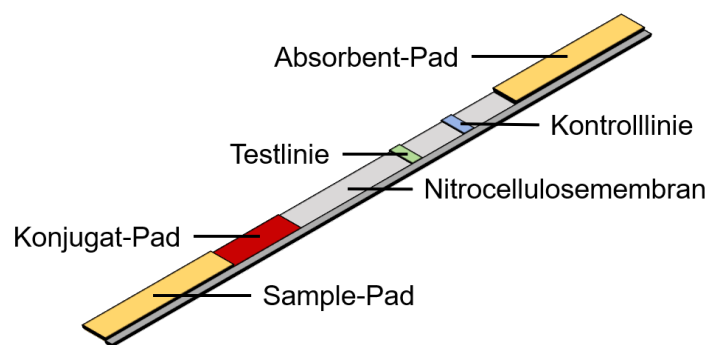


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Lateral-Flow-Assays. Ein LFA besteht üblicherweise aus Sample Pad, Konjugat Pad, Nitrocellulosemembran mit Test- und Kontrolllinie und Absorbent Pad. Die Bestandteile werden auf eine Plastikkarte (Backing Card) aufgeklebt.

ist meist aus Cellulose oder Glasfaser, es dient der Probenaufgabe und Modifizierung der Probe durch Imprägnierungsreagenzien. Mit Puffersalzen können pH und Ionenstärke der Probe angepasst werden. Tween20, Natriumdodecylsulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*)

(SDS) oder Bovines Serumalbumin (BSA) minimieren unspezifische Wechselwirkungen, verbessern den Fluss und beeinflussen die Viskosität.

Das Konjugat-Pad besteht meist aus Glasfaser und enthält die markierten Erkennungselemente, häufig Antikörper-Goldnanopartikelkonjugate wie beispielsweise im Schwangerschaftstest oder im Corona-Schnelltest. Als Markierung werden verschiedene Materialien in Partikelgrößen von 15 - 800 nm verwendet^[45,59]. Das Konjugat-Pad wird meist mit BSA als unspezifisches Blockierungsreagenz blockiert. Außerdem wird Zucker verwendet, welcher die native Konformation der dehydratisierten Proteine erhält und sich bei Kontakt mit der Probe schnell löst und so die Partikel in den Fluss trägt.

Die Nitrocellulosemembran transportiert die Probe über Kapillarkräfte zu Test- und Kontrolllinie. Auf der Testlinie ist üblicherweise ein Antikörper (Fängerantikörper) für einen Sandwich-Assay (z. B. Schwangerschaftstest, Corona-Schnelltest, HIV-Test)^[46,57] oder das Antigen für einen kompetitiven Assay (z. B. Drogentest^[52]) immobilisiert. Auf der Kontrolllinie wird ein anti-Spezies Antikörper aufgebracht. Sie zeigt den erfolgreichen Testverlauf an. Das Absorbent-Pad besteht aus Cellulose, hält die Fließgeschwindigkeit aufrecht und verhindert, dass die Probe zurückfließt^[57,58,60].

Die Ausleseart der Test- und Kontrolllinie hängt von der verwendeten Markierung ab. Neben einer kolorimetrischen Auslesung des Signals von Goldnanopartikeln (AuNP) wird die Detektion von Fluoreszenz- oder nicht-optischen Signalen wie magnetischen, elektrochemischen, thermischem Kontrast oder oberflächenverstärkte Raman-Streuung verwendet^[61]. Für die visuelle Auslesung mit dem Auge werden neben AuNP, Silbernanopartikel, Kohlenstoffnanopartikel oder -nanoröhren, kolloidales Selen, Magnetitnanopartikel und mit Farbstoff beladene Latexkugeln, Cellulose oder Polystyren verwendet. Als fluoreszierende Markierung sind Quantum Dots, Upconverting-Nanopartikel, Liposome mit fluoreszierenden Farbstoffen, farbstoffdotierte Siliziumdioxidnanopartikel und Polystyrolnanopartikel geeignet^[62]. Eine nicht-optische Auslesung über magnetische Signale bei Verwendung von magnetischen Nanopartikeln bietet den Vorteil, dass nicht nur die Partikel an der Oberfläche der Testlinie zum Signal beitragen, sondern alle Partikel im Volumen^[59,63]. Außerdem lassen sich magnetische Nanopartikel für eine Aufkonzentration der Probe über magnetische Separation verwenden^[64].

Aktuelle Entwicklungen der LFAs erlauben eine quantitative Auslesung, wobei die typischen Nachweisgrenzen bei 0,1 - 10 ng ml⁻¹ liegen^[65]. Weitere Anwendungsgebiete der LFA liegen im Multiplexing. Der parallele Nachweis mehrere Analyten kann über mehrere Testlinien auf einem Streifen, mit verschiedenen Rezeptoren auf einer Linie, verschieden farbigen Labels, Multikanalstrukturen, Multistreifendesign oder über Micropatterns realisiert werden^[59,66-68].

2.3.3 Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate

Als markierte Erkennungselemente für LFAs werden häufig Antikörper-Goldnanopartikelkonjugate verwendet. Die Vorteile von AuNP als Markierung sind die einfache Produktion, Verfügbarkeit, die Stabilität in Lösung und in getrockneter Form, einfache Funktionalisierung, die hohe rote Farbtintensität und geringe Toxizität^[60,69]. Antikörper werden aufgrund ihrer hohen Spezifität als Erkennungselemente verwendet^[70]. Es gibt viele Möglichkeiten Antikörper an AuNP anzubinden (Abbildung 2.6)^[71–73].

Eine Methode ist die Direktbeschichtung, bei der der Antikörper direkt an die Goldoberfläche über nicht-kovalente Wechselwirkungen anbindet. Zwischen den negativ geladenen AuNP und den positiven Ladungen des Antikörpers entstehen ionische Wechselwirkungen, zusätzlich tragen hydrophobe Wechselwirkungen zur Anbindung bei und schließlich entsteht eine dative Bindung zwischen den Schwefelatomen des Antikörpers und der Goldoberfläche^[74]. Bei der Direktbeschichtung binden die Antikörper in zufälliger Orientierung an die Goldoberfläche^[75]. Sie können *side-on* mit einem Fc und einem Fab Fragment an der Oberfläche, *tail-on* mit dem Fc Fragment an der Oberfläche, *head-on* mit beiden Fab Fragmenten an der Oberfläche oder *flat-on* mit allen drei Fragmenten auf der Oberfläche orientiert sein^[72]. Nur die *side-on*- und *tail-on*-Orientierung weisen zugängliche Paratope auf. Die Direktbeschichtung ist eine milde Strategie, bei der es wahrscheinlich ist, dass die native Struktur des Antikörpers erhalten bleibt^[76]. Durch Wahl des passenden Puffers kann die Stabilität der Konjugate optimiert werden^[77,78].

Um eine orientierte Anbindung zu erreichen, kann der Antikörper reduziert werden. Mit UV-Aktivierung werden Disulfidbrücken gebrochen. Dabei handelt es sich um Disulfidbrücken in der Nähe von Tryptophan, die sich in der konstanten Region der leichten und schweren Kette befinden^[79,80]. Der Antikörper bindet in seitlicher Orientierung (*side-on*) an die Goldoberfläche, sodass ein Fab-Fragment herausragt und die Antigenbindungsstelle gut zugänglich ist^[81]. Alternativ ist eine chemische Reduktion mit milden Reduktionsmitteln wie Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) oder 2-Mercaptoethylamin (MEA) möglich^[82]. Sie brechen die Disulfidbrücken auf, wodurch freie Thiolgruppen für die Anbindung zur Verfügung stehen. TCEP reduziert hauptsächlich die Disulfidbrücken in der Fc-Region des Antikörpers und es entstehen Antikörperhälften mit intakten Paratopen^[83]. Die Verwendung von TCEP hat gegenüber MEA den Vorteil, dass es nach der Reaktion nicht entfernt werden muss, da es keine konkurrierenden Thiolgruppen enthält.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Antikörper über einen Linker anzubinden. Hier kann unterschieden werden zwischen kovalenter Anbindung und Anbindung über biomolekulare Wechselwirkungen. Bei der kovalenten Anbindung wird ein Linker verwendet, der eine funktionelle Gruppe wie $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ enthält, die über eine chemische Reaktion kovalent an eine funktionelle Gruppe des Antikörpers gebunden werden kann^[71,84]. Bei der Verwendung von Poly(ethylenglycol)-2-mercaptoethyletheressigsäure

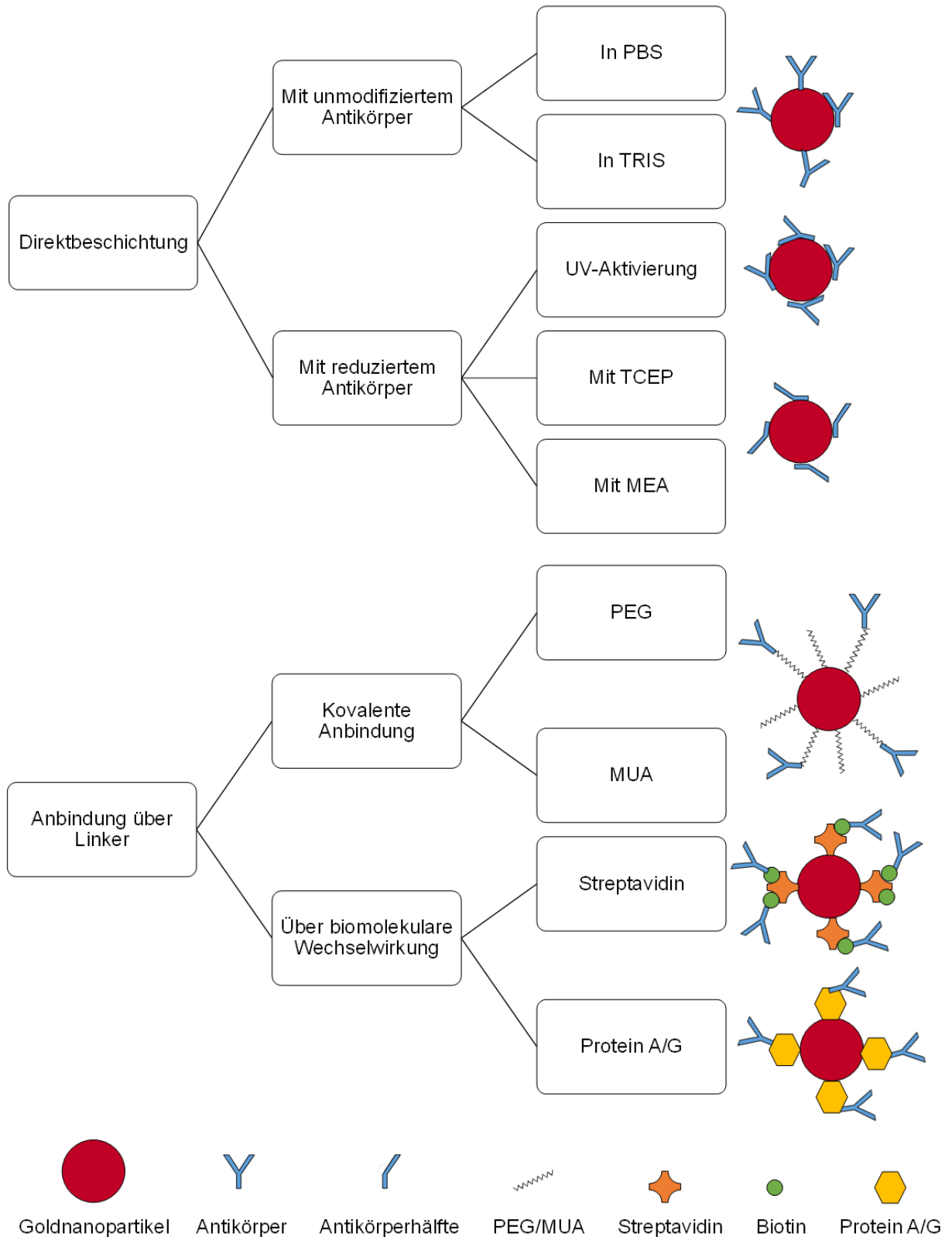


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung von Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugaten. Die Anbindung von Antikörpern an AuNP kann über Direktbeschichtung oder einen Linker erfolgen.

(SH-PEG-COOH) oder Mercaptoundecansäure (MUA) erfolgt die Anbindung an den AuNP über eine Thiolgruppe und es wird über Carbodiimid-Chemie eine kovalente Bindung mit primären Aminogruppen des Antikörpers geknüpft. Bei der Verwendung von PEG wurde festgestellt, dass eine Mischung aus kurzen und langen PEG-Molekülen gute kolloidale Stabilität mit hoher Bioerkennung kombiniert^[85].

Bei der Anbindung über eine Affinitätsreaktion werden Streptavidin oder Protein A/G verwendet. Streptavidin weist mit einer Dissoziationskonstanten von $K_d = 10^{-15}$ M eine hohe Affinität zu Biotin auf^[86]. Damit diese genutzt werden kann, wird Biotin über Carbodiimid-Chemie an den Antikörper angebunden. Der Nachteil ist, dass der Antikörper modifiziert werden muss. Protein A/G bindet das Fc-Fragment des Antikörpers und ermöglicht damit eine orientierte Anbindung^[87].

2.4 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode, mit der Partikelgrößen in kolloidalen Lösungen bestimmt werden können, z. B. die von AuNP. Sie wird auch als Photonenkorrelationspektroskopie oder quasielastische Lichtstreuung bezeichnet. Die Methode eignet sich zur Messung der Größe von Partikeln im Submikrometerbereich. Es wird das Streulicht gemessen, welches von der Brownschen Bewegung beeinflusst wird. Je größer ein Partikel ist, desto langsamer bewegt er sich. DLS bestimmt den hydrodynamischen Durchmesser eines Partikels, bzw. den Durchmesser einer Kugel, die die gleiche Translationsgeschwindigkeit d.h. denselben Diffusionskoeffizienten besitzt wie der Partikel^[88].

Für Partikel, deren Durchmesser d kleiner als die Wellenlänge λ des Lichts ist ($d < \lambda/10$), ist die Rayleigh-Streuung relevant. Wenn bei DLS ein HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm verwendet wird, gilt dies für Partikel bis etwa 60 nm. Für DLS wird die Probe mit Laserlicht bestrahlt. Die Partikel in der Probe streuen das Licht und es kommt zu Interferenz des Streulichts verschiedener Streuzentren. Da sich die Abstände der Streuzentren durch Brownsche Bewegung mit der Zeit verändern, werden Fluktuationen in der Streuintensität beobachtet. Gemessen wird die Rate, mit der die Intensität des gestreuten Lichts fluktuiert. Durch die Brownsche Bewegung hängt die Fluktuationsrate des gestreuten Lichts von der Partikelgröße ab. Es wird eine Autokorrelation (Gl. (2.12)) des Messsignals durchgeführt.

$$C(t) = \frac{\langle I(t)I(0) \rangle}{\langle I(0)I(0) \rangle} \quad (2.12)$$

Dabei wird das Streusignal mit sich selbst zu einem früheren Zeitpunkt verglichen. Die Autokorrelation nimmt mit der Zeit ab. Je größer die Partikel sind, desto langsamer sinkt die Autokorrelation. Diese Abnahme kann mit einem monoexponentiellen Zerfall (Gl.

(2.13)) für verdünnte Lösungen monodisperser Partikel beschrieben werden.

$$C(t) = 1 + \gamma \cdot \exp \left(-2 \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \sin \left(\frac{\theta}{2} \right) \right)^2 \cdot D \cdot t \right) \quad (2.13)$$

Dabei wird der Kohärenzfaktor γ , der Brechungsindex des Lösungsmittels n , die Wellenlänge des Lichts λ , der Streuwinkel θ und der Translationsdiffusionskoeffizient D einbezogen. Aus D kann über die Stokes-Einstein-Gleichung (2.14) mit der Boltzmannkonstante k_B , der absoluten Temperatur T und der Viskosität η der hydrodynamische Radius r bestimmt werden^[89].

$$r = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (2.14)$$

Bei der Rayleigh-Streuung ist die Intensität des gestreuten Lichts proportional zu d^6 . Dadurch besteht die Gefahr, dass das Licht von größeren Teilchen das Streulicht der kleineren überlagert. Ist der Brechungsindex der Probe bekannt, kann über Mie-Theorie bei Partikeln, die größer als 10 nm sind, aus der Intensitätsverteilung die Volumenverteilung und die Zahlenverteilung berechnet werden. Die Zahlenverteilung gibt eine gute Näherung der Größenverteilung an, während die Intensitätsverteilung stark von größeren Agglomeraten beeinflusst wird^[90].

In einem Gerät für DLS befindet sich ein Laser, der die Probe in der Küvette bestrahlt, und ein Detektor, der das Streulicht misst. Beim Detektor kann es sich um einen Sekundärelektronenvervielfacher oder eine Avalanche Photodiode handeln. Zwischen Laser und Probe kann ein Dämpfungselement eingebaut werden, um eine zu hohe Lichteinstrahlung auf den Detektor zu verhindern. Der Detektor befindet sich in einem Winkel von 173°, 158° oder 90° zum Laserlichtstrahl. Unter einem Winkel von 173° wird die Rückstreuung gemessen und überschüssiges Streulicht ausgeschlossen, sodass auch die Streulichtsignale geringer Intensität von kleineren Partikeln aufgenommen werden können. Der Detektor gibt die Streulichtintensität an den Korrelationsmesser weiter, welcher die Streulichtintensität an verschiedenen Zeitintervallen vergleicht, um die Rate der Intensitätsfluktuationen zu bestimmen. Ein Computer berechnet die Größeninformationen^[91].

Bei großen Partikeln, bei Polydispersität, hohen Konzentrationen oder Lösungen mit hohem Brechungsindex kann es zu Fehlinterpretationen kommen. Der optimale Messbereich liegt bei Partikeln, die kleiner als 100 nm sind. DLS eignet sich für die Bestimmung von Partikelgrößen von 0,1 nm bis 10 μm . Damit das Licht nicht mehrfach gestreut wird, sollte die Suspension ausreichend verdünnt werden. Große Partikel streuen das Licht stärker als kleine und können dadurch das Streulicht der kleineren Partikel überdecken, sodass die Größenverteilung nicht richtig berechnet werden kann. Bei Vorliegen von Polydispersität kann die Auflösung von DLS an ihre Grenzen kommen, da DLS Partikel, deren Größen eng beieinander liegen, nicht trennen kann. Damit verschiedene Partikelgrößen aufgelöst werden können, muss sich ihre Größe um einen Faktor von mindestens 3 unterscheiden.

Andernfalls werden breite Peaks mit großem Polydispersitätsindex (PDI) erhalten^[90].

2.5 Aufstockverfahren

Für eine quantitative Bestimmung eines Analyten wird üblicherweise zunächst eine Kalibrierung aufgenommen. Die Kalibriermessungen enthalten mehrere Nullmessungen (blank) und bekannte Analytkonzentrationen^[92]. Die Matrix der zukünftigen Probe wird nach Möglichkeit in den Kalibriermessungen nachgebildet. Je nach Komplexität der Matrix kann es schwierig sein, diese zu imitieren. Der Effekt der Matrix muss bereits in den Kalibriermessungen berücksichtigt werden, da Komponenten in der Probe zu unspezifischen Effekten führen können^[93]. Ändert sich die Matrix häufig, ist eine Anpassung und Neukalibrierung zeitaufwändig und teuer. Um diese Problematik zu umgehen, wird in der klassischen Analytik das Aufstockverfahren, auch Standardadditionsmethode genannt, angewandt^[94].

Das Aufstockverfahren kann nur für Systeme, deren Kalibrierkurven mit Ursprungsgeraden beschrieben werden können, verwendet werden. Dabei wird die Probe in Aliquots mit gleichem Volumen aufgeteilt. Die Aliquots werden mit bekannten und variierenden Analytkonzentrationen dotiert. Bei Auftragung der gemessenen Signale gegen die bekannten Aufstockkonzentrationen kann die Analytkonzentration der Probe nach einer linearen Regression als negativer x-Achsenabschnitt bestimmt werden (Abbildung 2.7)^[95]. Beim Aufstockverfahren wird davon ausgegangen, dass bei Nichtvorhandensein des Analyten in der Probe ein Signal von Null erhalten wird^[96]. Da bei Immunoassays die erhaltenen

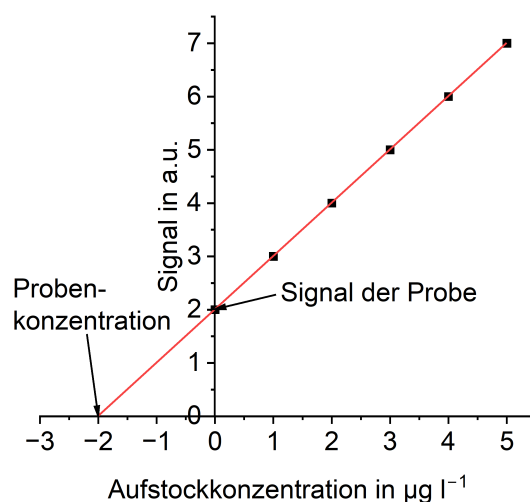


Abbildung 2.7: Prinzip des Aufstockverfahrens: Das Signal der Probe und die Signale der Probe, die mit Aufstockkonzentrationen versetzt wurde, werden gegen die Aufstockkonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression wird die Probenkonzentration am Schnittpunkt mit der x-Achse abgelesen.

Kalibrierkurven weder linear sind noch den Ursprung schneiden, kann das herkömmliche Aufstockverfahren auf Immunoassays nicht angewandt werden. Eine neue Auswertemethode für nichtlineare Kalibrierkurven wird benötigt.

3. Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit ihren Herstellern aufgelistet.

Tabelle 3.1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Cellulose-Pad	Sure Wick CFSP	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Glasfaser-Pad	Sure Wick GFCP	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Einwegküvetten	40 µl Küvetten ZEN0040 für DLS	Malvern Panalytical, Nürnberg, DE
Glastransducer	1 mm Glassubstrat mit 10 nm Ta ₂ O ₅ und 330 nm SiO ₂ für Referenzierung: 1 mm Glassubstrat mit 10 nm Ta ₂ O ₅	Schott AG, Mainz, DE
Halogenlampe	12 V, 20 W, 320 lm, Osram, Halostar, Standard	Osram, Augsburg, DE
Lichtleiter	aus Polymethylmethacrylat (1 mm Faserdurchmesser mit 50%/50%-Y-Faserkoppler)	Laser Components, Olching, DE
LoBind Tubes	Protein LoBind [®] Tubes, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Nitrocellulosemembran	CN-140 UniSart	Sartorius, Göttingen, DE
Präzisionsküvetten	aus Quarzglas, Suprasil [®] , 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim, DE
Reaktionsgefäße	1,5 ml mit Deckel, PP, natur mit Schraubverschluss	Ratiolab, Dreieich, DE Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zentrifugenfilter	AmiconUltra, 0,5 ml, Ultracel, 30 K	Merck Millipore, Darmstadt, DE

3.1.1 Chemikalien und Puffer

In Tabelle 3.2 sind die verwendeten Chemikalien mit ihren Herstellern und in Tabelle 3.3 die verwendeten Puffer aufgelistet.

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien

Abkürzung	Chemikalienname	Hersteller
Aceton	Aceton, EMSURE [®] , $\geq 99,8\%$	Merck, Darmstadt, DE
AMT	Amitriptylinhydrochlorid	LKT Labs, St. Paul, US
AuNP	Goldkolloidlösung (20 nm, $c = 7,00 \cdot 10^{11}$ Partikel ml^{-1} , $\text{OD}_{520\text{nm}} = 1,0$)	BBI Solutions, Crumlin, GB
CBZ	Carbamazepin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DCM	Dichlormethan, wasserfrei, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DCM-C, AMT- Ab-Gold	Konjugat über Direktbeschichtung von Microcoat, anti-AMT Ak 202 - AuNP (40 nm)	Microcoat Biotechnologie, Bernried, DE
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DMF	N,N-Dimethylformamid, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
GA	Glutarsäureanhydrid	Fluka, Buchs, DE
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
GOPTS	(3-Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilan	Fluka, Buchs, DE
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid (30 %)	Fluka, Buchs, DE
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure (konz., 95 - 97 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
HCl	Salzsäure (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
HS-PEG-COOH	HS-PEG(8)-COOH (459 Da)	Iris Biotech, Marktredwitz, DE
	HS-PEG-COOH (3000 Da)	Rapp Polymere, Tübingen, DE
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
KOH	Kaliumhydroxid-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
MNP	Goldbeschichtete magnetische Nanopartikel Au/Fe ₃ O ₄ , 40 nm, OD = 53	Nanopartz, Loveland, US
NaCl	Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NHS	N-Hydroxysuccinimid, 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NHS-PEG4- Biotin	EZ-Link [™] NHS-PEG4-Biotin, No-Weigh [™]	Thermo Scientific, Rockford, US

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Verwendete Chemikalien Fortsetzung

Abkürzung	Chemikalienname	Hersteller
NRT	Nortriptylinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
OPP	Opipramol Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
PEG-DA	Bis-amino-poly(ethylenglycol), MW = 2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen, DE
PEG-MA	α -Methoxy- ω -amino-poly(ethylen-glycol), MW = 2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen, DE
Saccharose	Saccharose	Fluka, Buchs, DE
SA-AuNP	Streptavidin-Goldnanopartikel (40 nm, OD = 28,18)	Microcoat Biotechnologie, Bernried, DE
SDS	Natriumdodecylsulfat 10 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Speichel	künstlicher Speichel für pharmazeu-tische Forschung	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Testosteron	Testosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Testosteronoxim	Testosteron-3-(O-carboxymethyl)-oxim	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
TRIM	Trimipramin (als Maleat), ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tween [®] 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-mono-laurat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Tabelle 3.3: Verwendete Puffer

Abkürzung	Herstellung
GdnHCl	Guanidin-Hydrochlorid (6 M, pH 1,5)
Hydrogencarbonat	Hydrogencarbonat (10 mM, pH 8)
Konjugat-Pad-Puffer	10 mg ml ⁻¹ BSA in PBS pH 7,4
MES	10 mM MES mit HCl auf pH 5 oder pH 6 titriert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung: 8,76 g NaCl und 1,36 g KH ₂ PO ₄ auf 1l Bidest, mit KOH und HCl auf pH 7,4 oder pH 6,8 titriert
Piranha	3:2 (v/v) konz. H ₂ SO ₄ und 30 % H ₂ O ₂

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Verwendete Puffer Fortsetzung

Abkürzung	Herstellung
Sample-Pad-Puffer	100 mM TRIS pH 8,0 mit 0,5 % BSA und 0,25 % Tween: 12,11 g TRIS in 800 ml Bidest gerührt, 5,0 g BSA und 2,5 g Tween20 hinzugegeben, mit HCl auf pH 8 titriert und auf das finale Volumen von 1000 ml aufgefüllt
TRIS	10 mM TRIS in Bidest mit HCl auf pH 7,4 titriert

3.1.2 Proteine und Antikörper

In Tabelle 3.4 sind die verwendeten Proteine und Antikörper aufgelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Proteine und Antikörper

Abkürzung	Protein/Antikörper	Hersteller
Ak202	anti-AMT Ak (monoklonal, Klon 202, Maus, 1,2 mg ml ⁻¹)	Aviva Systems Biology, San Diego, US
Ak8F9	anti-AMT Ak (monoklonal, Klon 8F9, Maus, 1,2 mg ml ⁻¹)	Biomol, USBiological, Salem, US
AkTU11	anti-AMT Ak (monoklonal, Klon TU-11, Maus, 1 mg ml ⁻¹)	antibodies-online, Aachen, DE
anti-Maus IgG	Goat anti-Mouse IgG (polyklonal, Ziege, 1 mg ml ⁻¹)	Antikoerper-Online, Aachen, DE
anti-Testosteron	monoklonal, Klon 14P2C8, Maus, Invitrogen [®]	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
BSA	Rinderserumalbumin, $\geq 96\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NRT-BSA	Nortriptylin-Rinderserumalbumin-Konjugat (1 mg ml ⁻¹)	CalBioagents, San Mateo, US
OVA	Albumin aus Hühnereiweiß, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Die Antikörperlösungen wurden nach Erhalt aliquotiert und eingefroren. Bei den drei anti-Amitriptylin Antikörper (anti-AMT Ak)-Lösungen wurden je 10 μ l in Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss gegeben, bei anti-Maus IgG und Nortriptylin-Rinderserumalbumin-Konjugat (NRT-BSA) je 40 μ l. Der Testosteron-Antikörper wurde auf 25 μ g ml⁻¹ in

1 mg ml⁻¹ Ovalbumin (OVA) in Phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) (PBS) verdünnt und jeweils 100 µl in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Die Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und im Gefrierfach aufbewahrt.

3.2 Software

Die für die Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Angaben zu der verwendeten Software

Software	Typ	Firma
BIAevaluation	BIAevaluation 4.1.1	General Electric Company, SE
Citavi	Citavi 6.14 Literaturmanangement	Lumivero, Denver, US
IFZ	Programm zur Berechnung der optischen Schichtdicke	AK Gauglitz, Tübingen, DE
Lambda-SPX	Anwendungssoftware für UV/Vis-Spektrometer	PerkinElmer, Überlingen, DE
LFA-Auswertung	Programm zur Auswertung für strukturierte LFA	OFFIS, Oldenburg, DE
Matlab	MATLAB R2019a	MathWorks, Natick, US
Measure	Programm zur Steuerung und Spektrenaufnahme	AK Gauglitz, Tübingen, DE
Microsoft Office 365	Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond, US
Origin	OriginPro 2023	OriginLab Corporation, Northampton, US
Zetasizer	Zetasizer Software 7.13	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, GB

3.3 Geräte

Die für die Arbeit benutzten Geräte sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Angaben zu den verwendeten Geräten

Gerät	Typ	Firma
Chemikalienofen	F62700 Furnace Thermolyne TM , Muffelofen	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, US
Diodenzeilen- spektrometer	SPEKOL [®] 1100	Analytik Jena, Jena, DE
Fotobox	tragbarer Fotolichtkasten mit LED Streifen (3400 lm)	Samtian, Shenzhen, CN
Hebelschneider	dahle 533 Hebel-Schneidemaschi- ne	Novus Dahle, Lingen, DE
Kamera	Kompaktkamera (EXMOR R [®] CMOS Sensor, ZEISS [®] Vario- Sonnar T* Objektiv)	Sony, Weybridge, GB
Kontakt-Spotter	BioOdyssey TM Calligrapher TM Mi- niArrayer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Kontaktlos- Spotter	M2-Automation MDC07	instrumentTWO, Berlin, DE
Magnet Mikro- Zentrifuge	SuperMag Multitube Separator TM Mikro-Zentrifuge, SD, 220 VAC, 6000 rpm	Ocean NanoTech, San Diego, US Roth, Karlsruhe, DE
Pipetten	Eppendorf [®] Reference Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, DE
pH-Meter	inoLab [®] pH 7110	Xylem Analytics, Weilheim, DE
Reinstwasseran- lage	PureLab Classic Reinstwasseran- lage	ELGA LabWater Veolia Water Technologies, Celle, DE
Spritzenpumpe	microlab [®] 500 series, Zweispritzen- dispenser (100 µl-Spritzen)	Hamilton, Reno, US
Thermomixer	Eppendorf [®] Thermomixer Com- pact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Sonorex TM Super 10P	BANDELIN electronic, Berlin, DE
UVP Crosslinker	CL-1000 Shortwave Crosslinker 254 nm UV	Analytik Jena, Jena, DE
UV/Vis- Spektrometer	Lambda 9	Perkin-Elmer, Waltham, US
Vier-Wege- Ventil	microlab [®] , MVP	Hamilton, Reno, US

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Angaben zu den verwendeten Geräten Fortsetzung

Gerät	Typ	Firma
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, US
Waage	Analysenwaage, XS205 Dual Range	Mettler-Toledo, Gießen, DE
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zetasizer	Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, GB

3.3.1 Aufbau Fluidik für RIfS

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)-Messungen. Um die Probe und weitere Reagenzien kontinuierlich zum Transducer zu transportieren, wurden eine Hamilton-Spritzenpumpe (100 μl) und ein Vier-Wege-Ventil verwendet. An den vier Ports waren Teflon-Schläuche

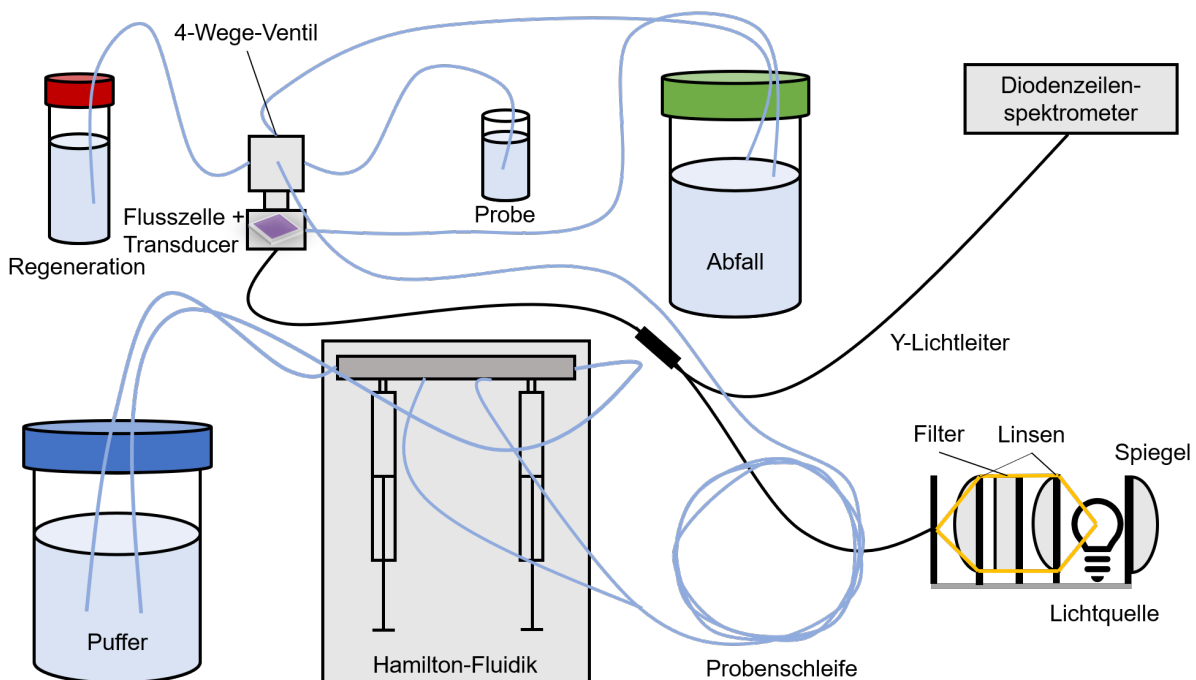


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten RIfS-Anlage. Fluidik mit Spritzenpumpen (Mitte) und Vier-Wege-Ventil (links oben), die Probe, Puffer und Regenerationslösung zur Flusszelle mit Transducer pumpt, und Optik mit Halogenlampe als Weißlichtquelle (unten rechts) mit Diodenzeilen-Spektrometer als Detektor zur Datenerfassung (rechts), verbunden mit einem optischen Y-Wellenleiter.

(Innendurchmesser 1,5 mm) zur Probe, zur Pumpe, zur Regeneration und zum Abfall angeschlossen. Als Lichtquelle wurde eine Halogenlampe eingesetzt. Die Lichtleitung zum Transducer in der Flusszelle erfolgte über einen Y-Lichtwellenleiter (50/50). Das am Transducer reflektierte Licht wurde über denselben Lichtleiter zur Detektion der Interferenzspektren zu einem Diodenzeilenspektrometer geführt.

3.4 Methoden

3.4.1 BIA-Kinetik-Simulation

Kinetische Daten wurden mit dem 1:1 Langmuir Bindungsmodell mit der Software BIA-evaluation 4.1.1 mit $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_d = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ simuliert. Die gewählten Ratenkonstanten liegen im Bereich typischer Werte von Antikörpern, da deren Affinitätskonstanten meistens zwischen 10^5 und 10^{11} M^{-1} [30] liegen. Die maximale Analytbindungs-kapazität (Rmax) wurde auf 1 nm festgelegt und der Beitrag des Volumenbrechungsindex (RI) auf 0 eingestellt. Die Analytkonzentrationen für die Simulationen waren 500 nM, 333 nM, 167 nM, 133 nM, 100 nM, 67 nM und 33 nM. Für die Dauer der Assoziations- und Dissoziationsphase wurden 600 s und 900 s gewählt. Mit Matlab wurde statistisches Rauschen mit einer Amplitude von $r = 0,01 \text{ nm}$ mit dem Befehl Gl. (3.1) hinzugefügt, wobei y die unverrauschten Werte mit einem Messwert alle 5 s darstellt.

$$y_{Noisy} = y + 2 \cdot r \cdot \text{rand}(\text{length}(y), 1) - 2 \cdot r \cdot 0,5 \quad (3.1)$$

3.4.2 Oberflächenmodifizierung der RIfS-Transducer

Es wurden zehn Transducer (Schott AG, Mainz, DE) gleichzeitig beschichtet. Die RIfS-Transducer (1 x 1 cm) wurden 30 s in KOH (6 M) geschwenkt und anschließend mit H₂O abgespült. Anschließend wurden sie mit frisch hergestellter Piranha-Lösung (3:2 H₂SO₄ konz. : H₂O₂ (30 %)) 15 min im Ultraschallbad gereinigt und aktiviert. Nach Spülen mit H₂O wurden die Transducer im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Silanisierung wurden die Transducer mit der zu beschichtenden Seite nach oben in eine kleine Petrischale mit (3-Glycidylxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS) (etwa 1,5 ml) gelegt, sodass die Transducer bedeckt waren und 1 h in einer mit Stickstoff gefüllten Glaskammer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden die Transducer mit trockenem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Für die Beschichtung mit Polymer wurde eine Polyethylenglykol (PEG)-Lösung (Mischung aus 1:1000 Diamino-Polyethylenglykol (PEG-DA) : α -Methoxy- ω -amino-Polyethylenglykol (PEG-MA) 4 mg ml⁻¹, 20 - 30 μ l pro Transducer) aufgebracht und die Transducer in einer Petrischale über Nacht bei 70 °C in den Ofen gestellt. Nach der Reaktion wurden

die Transducer kurz in 70 °C heißes H₂O gelegt, mit H₂O ab gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Umfunktionalisierung wurde Glutarsäureanhydrid (GA) (50 mg) in N,N-Dimethylformamid (DMF) (75 µl) gelöst. Die Transducer wurden im Sandwich-Verfahren mit 10 µl je Sandwich beschichtet und in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer bei RT aufbewahrt. Nach mindestens 6 h wurden sie mit DMF und H₂O ab gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Für eine Carbodiimid-vermittelte Immobilisierung von Nortriptylin (NRT) wurde N-Hydroxysuccinimid (NHS) (150 mg) in DMF abs. (1 ml) gelöst. Zu der NHS-Lösung wurde N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) (302 µl) hinzugegeben und gevortext. Die NHS-DIC-Lösung wurde auf die aktivierten Transducer in einer kleinen Petrischale gegeben, sodass die Transducer mit der Lösung bedeckt waren und 4 h in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer bei RT inkubiert. Nach Spülen mit DMF und Aceton wurden die Transducer im Stickstoffstrom getrocknet.

In einer kleinen Petrischale wurden die Transducer mit einer NRT-Lösung (6 mg in 3 ml H₂O) bedeckt. Nach Reaktion über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer bei RT wurden die Transducer mit H₂O ab gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Transducer wurden im Kühlschrank bei 3 °C aufbewahrt.

Für Testosteron-Messungen mit Aufstockverfahren wurden die Transducer nach der Immobilisierung von PEG-DA ohne Ausdünnung für Messungen in Puffer und Milch, von 5 % PEG-DA und 95 % PEG-MA für Messungen in Speichel und Serum im Sandwichverfahren mit 1 mg Testosteronoxim in 10 µl DMF und 1,5 µl DIC pro Sandwich beschichtet. Nach Inkubation bei RT in einer DMF-Dampf gesättigten Kammer über Nacht, wurden die Transducer mit DMF und H₂O gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.4.3 RIfS-Messungen

Für die Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) wurden Messungen nach Tabelle 3.7 durchgeführt. Zur Aufnahme der Basislinie wurde die Transducer-Oberfläche zunächst mit Puffer gespült. Anschließend wurden verschiedene Antikörper-Konzentrationen (33 - 500 nM anti-AMT Ak) in PBS pH 7,4 bei einer Flussrate von 0,5 µl s⁻¹ bei RT injiziert. Nach 600 s Assoziationsphase folgten 900 s Dissoziationsphase. Probe und Puffer wurden dabei durch eine Luftblase voneinander getrennt, um Diffusion zwischen den Lösungen zu verhindern. Die Transduceroberfläche wurde mit Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) 400 s regeneriert, um gebundene Antikörper abzulösen. Zum Abschluss wurde eine Basislinie mit Puffer aufgenommen. Alle Konzentrationen wurden dreifach vermessen.

Tabelle 3.7: RIfS-Programm für BIA mit Volumen V und Pumpgeschwindigkeit v

Schritt	V in μl	v in $\mu\text{l s}^{-1}$
Basislinie	100	0,5
Luft laden	40	20
Probe laden	420	20
Probe injizieren	300	0,5
verwerfen	340	50
Dissoziation	450	0,5
Regeneration laden	250	20
Regeneration injizieren	200	0,5
verwerfen	300	20
Basislinie	180	0,5

3.4.4 Auswertung der Bindungskurven

Es wurden sowohl simulierte als auch gemessene Bindungskurven mit verschiedenen Methoden ausgewertet. Für die Auswertung der gemessenen Bindungskurven wurden die ersten fünf, da in den ersten Messwerten häufig Artefakte durch die Fluidik auftreten, und die letzten 20 Werte der Assoziation nicht berücksichtigt, sodass 500 s der Assoziationsphase ausgewertet wurden. Die verwendeten Methoden zur Bestimmung der kinetischen Konstanten k_a und k_d aus den Werten der Assoziationsphase waren exponentielle Kurvenanpassung, Auswertung über die Ableitung und Auswertung über die Integration. Die Dissoziationsphase wurde mittels einer exponentiellen Zerfallsfunktion und über eine Linearisierungsmethode ausgewertet. Die Bestimmung der Affinitätskonstante erfolgte über die berechneten Ratenkonstanten und einen Scatchard-Plot. Zur Bewertung der Auswertemethoden bei den simulierten Bindungskurven wurde mittels der relativen Abweichung (Gl. (3.2)) berechnet, wie gut die Methoden die richtigen Werte der Simulation bestimmen.

$$\Delta k = \frac{k_{\text{berechnet}} - k_{\text{simuliert}}}{k_{\text{simuliert}}} \quad (3.2)$$

Auswertung der Assoziationsphase

Die Assoziationsphase der simulierten Daten wurde mit drei Methoden in drei Bereichen ausgewertet, da häufig unklar ist, welcher der Bereich der Messung verwendet werden sollte. Es wurde die gesamte, die erste Hälfte (300 s) und die Assoziation bis zu einer Schichtdicke von 0,5 nm ausgewertet. Damit wurden verschiedene Varianten gewählt, wie der Auswertebereich reduziert werden kann. Für die gemessenen Bindungskurven wurde der Bereich ausgewertet, der in der Ableitung ein lineares Verhalten aufwies.

Exponentielle Kurvenanpassung Die Bindungskurven wurde mit der MnMolecular Formel (Gl. (3.3)) von Origin Pro 2021 angepasst.

$$y = A \cdot (1 - e^{-k \cdot (x - x_c)}) \quad (3.3)$$

Der erhaltene Parameter k entspricht der scheinbaren Ratenkonstante k_s und A der Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} aus Gl. (2.6), x_c bezeichnet den Startpunkt der Assoziation.

k_s -Linearisierung Die erhaltenen k_s bei verschiedenen Konzentrationen wurden verwendet, um die Ratenkonstanten k_a und k_d über Gl. (2.5) zu berechnen. Bei Auftragung von k_s gegen die Konzentration c wurde nach linearer Regression k_a als Steigung und k_d als y-Achsenabschnitt erhalten.

Ableitung Für die Auswertung über die Ableitung wurde Gl. (2.4) herangezogen. Die Ableitung der Beladung $d\Gamma(t)/dt$ (hier $d\Delta nd/dt$) wurde gegen die Beladung $\Gamma(t)$ (hier Δnd) aufgetragen und die scheinbare Ratenkonstante k_s als negative Steigung bei linearer Regression erhalten.

Integration Für eine Auswertung nach Gl. (2.7) wurden die Daten der Assoziationsphase integriert und durch entsprechende Zeitintervalle geteilt, um die X-Werte zu erhalten. Die Integration von Δnd wurde mit Origin (mathematische Fläche) durchgeführt. Die Differenz zwischen der optischen Schichtdicke am Ende und zu Beginn der Integration lieferte die Y-Werte. Bei der Auftragung von $\Gamma(t)/t$ gegen $\int_0^t \Gamma(t)dt/t$ wurde k_s als negative Steigung erhalten. Die Integration kann in zwei Richtungen durchgeführt werden, entweder mit Start am Beginn (vorwärts Integration) oder am Ende der Assoziationsphase (rückwärts Integration).

Auswertung der Dissoziationsphase

Die Kurven der Dissoziationsphase wurden über eine exponentielle Kurvenanpassung nach Gl. (2.9) und über eine Linearisierungsmethode ausgewertet. Für die exponentielle Kurvenanpassung wurde die ExpDecay1-Funktion (3.4) von Origin verwendet.

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{\left(-\frac{x-x_0}{t_1}\right)} \quad (3.4)$$

Die Dissoziationsratenkonstante k_d wurde aus t_1 über $k_d = 1/t_1$ erhalten. Der y-Achsenabschnitt y_0 dieser Funktion erlaubt Abweichungen von einer Eins-zu-Eins-Wechselwirkung, da er Rückbindung des Analyten erlaubt und der Analyt damit nicht vollständig dissoziieren muss, x_0 bezeichnet den Startpunkt der Dissoziation. Für die Linearisierung wurde Gl.

(2.10) verwendet. Bei Auftragung von $\ln(\Gamma(0)/\Gamma(t))$ gegen die Zeit t wurde k_d nach linearer Regression aus der Steigung erhalten.

3.4.5 Entwicklung Lateral-Flow-Teststreifen

Die Teststreifen bestanden aus Sample-Pad, Konjugat-Pad, Nitrocellulosemembran und Absorbent-Pad. Die Komponenten wurden auf eine Backing-Card aus Polyvinylchlorid geklebt, wobei die einzelnen Bestandteile überlappten siehe Abbildung 3.2. Die Nitrocellu-

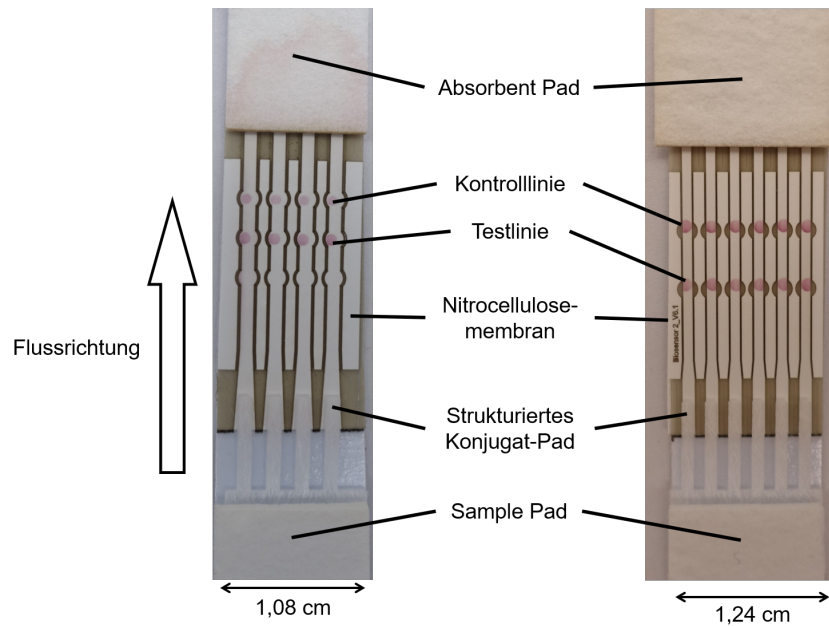


Abbildung 3.2: Teststreifen mit vier (V2, links) und sechs (V6, rechts) strukturierten Kanälen. Jeder Teststreifen besteht aus Sample Pad, Konjugat Pad, Nitrocellulosemembran mit Test- und Kontrolllinie und Absorbent Pad.

losemembran wurde in mehrere Kanäle strukturiert (vier oder sechs) und wies mehrere Testzonen auf (drei oder zwei), siehe Abbildung 3.3. Die Membranstrukturierung wurde von Esteban Builes-Münden am Institut für Mikrotechnik in Braunschweig durchgeführt wie in Conrad et al (2023)^[97] beschrieben. Teststreifen der Version V2 wiesen vier Kanäle mit drei Testzonen auf. Bei den Versionen V4.1 und V6 wurden sechs Kanäle mit zwei Testzonen strukturiert. Im Vergleich zu V2 waren die Kanäle bei den Teststreifen mit sechs Kanälen schmaler. Der Unterschied zwischen V4.1 und V6 bestand darin, dass bei Version V6 die Nitrocellulose im Bereich der Ausbuchtung der Testzone ebenfalls abgetragen wurde, sodass die Flusskanäle durchgehend parallel waren.

Test- und Kontrolllinie wurden mit einem Kontakt- oder Kontaktlos-Spotter aufgebracht. Der Kontaktlos-Spotter wurde von der Firma Lilian Labs in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Es wurden Proteinlösungen einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} verwendet, NRT-BSA für die Testlinie und IgG anti-Maus für die Kontrolllinie. Beim Kontakt-Spotter wurden die in Abbildung 3.4 gezeigten Einstellungen verwendet. Beim

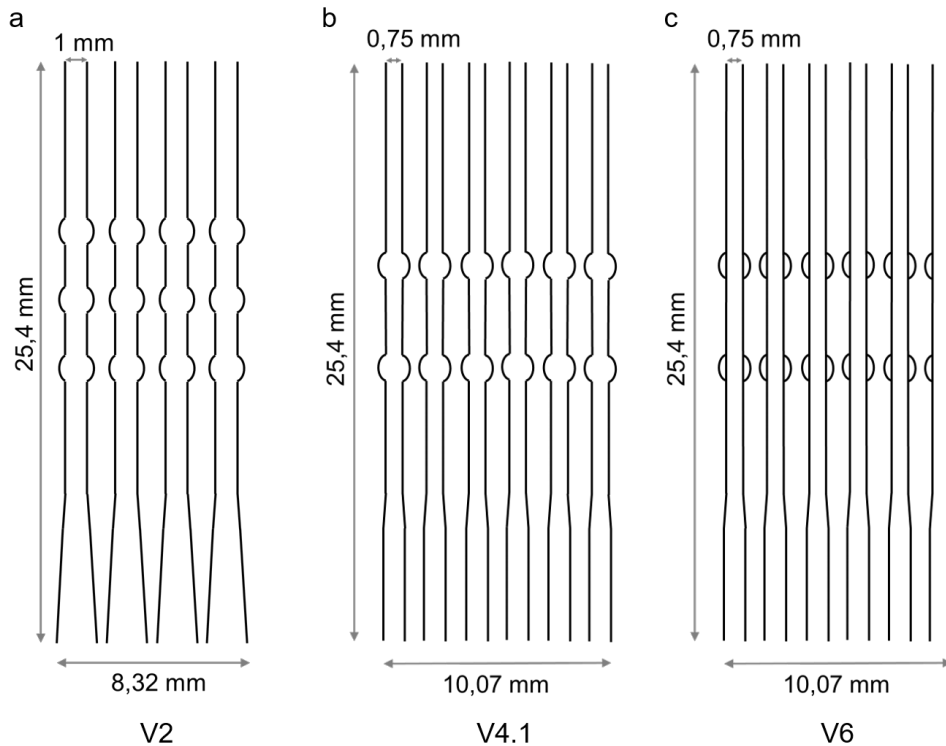


Abbildung 3.3: Maße der Teststreifen a) mit vier Kanälen V2, b) mit sechs Kanälen V4.1 oder c) V6.

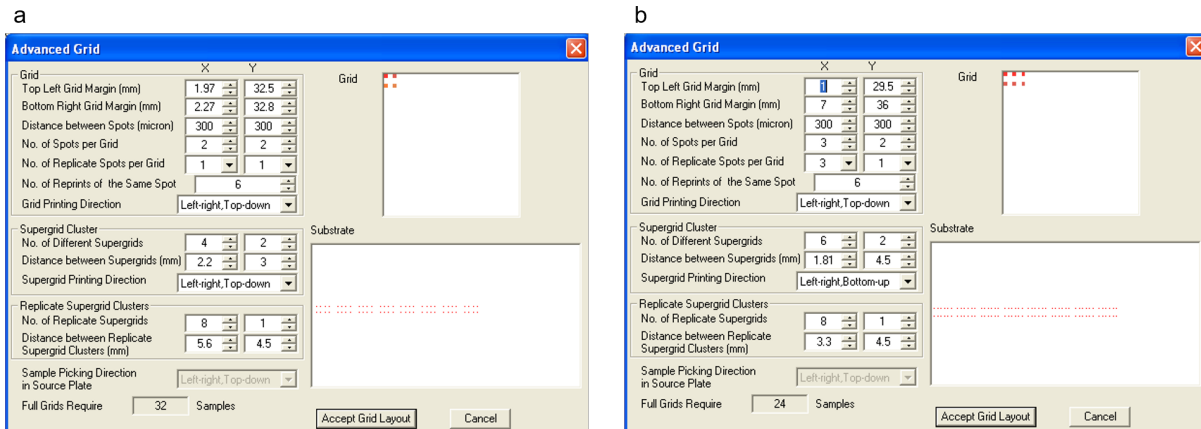


Abbildung 3.4: Einstellungen im Advanced Grid für Kontaktpotter a) für Spotting auf Teststreifen mit vier Kanälen V2 und b) mit sechs Kanälen V4.1 oder c) V6.

Kontaktlos-Spotting wurden zweimal pro Testzone 40 - 50 nl gespottet. Nach dem Spotting wurden die Proteine bei 50 °C 10 min immobilisiert.

Für die Sample-Pads wurden Cellulose-Pads in Sample-Pad-Puffer 4 h bei RT bei leichtem Schütteln imprägniert, die Konjugat-Pads 1 h bei RT in Konjugat-Pad-Puffer. Alle Pads wurden über Nacht bei RT getrocknet. Auf die Stege der Konjugat-Pads wurden mit einer Pipette jeweils 4 µl 1,0 OD Konjugatlösung aufgebracht und 1 h bei 37 °C getrocknet.

Konjugatsynthesen

Die Versuche zum Konjugatvergleich wurden mit anti-AMT Ak 202 durchgeführt. Die Konjugatsynthesen erfolgten in Eppendorf Protein LoBind®Tubes.

Direktbeschichtung DCP-C und DCT-C Die Direktbeschichtung wurde in zwei verschiedenen Puffern durchgeführt: PBS pH 7,4 für DCP-C und TRIS pH 7,4 für DCT-C. Zunächst wurde ein Flokkulationstest nach Paek et al (1999)^[98] durchgeführt und die UV/Vis-Spektren nach Salzzugabe gemessen, um die optimale Antikörperkonzentration zu bestimmen. Goldnanopartikel (AuNP) (1 ml, 1 OD, $\varnothing = 20$ nm) wurden mit anti-AMT Ak (5 μ l, 1,2 mg ml⁻¹) gemischt und 40 min bei RT und 300 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung (100 μ l, 10 mg ml⁻¹) wurde hinzugefügt und weitere 20 min inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, folgten drei Waschschrte. Die Suspension wurde 30 min zentrifugiert (6000 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und der Rückstand in BSA-Lösung (1 ml, 1 mg ml⁻¹) resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Rückstand in BSA-Lösung (1 ml, 0,1 mg ml⁻¹) resuspendiert und Saccharose (100 mg) hinzugefügt. BSA stabilisiert das Konjugat und Saccharose erhält die native Konformation des Proteins.

Direktbeschichtung mit UV-aktiviertem Antikörper UV-C anti-AMT Ak (5 μ l, 1,2 mg ml⁻¹) wurden in H₂O (1 ml) verdünnt und im UVP Crosslinker-1000 UV in einer kleinen Petrischale belichtet (254 nm, $E = 90 \cdot 100 \mu$ J cm⁻¹). AuNP (1 ml, 1 OD) wurden hinzugefügt. Die folgenden Schritte waren wie bei der Direktbeschichtung.

Direktbeschichtung mit durch TCEP reduzierten Antikörper TCEP-C In PBS pH 6,8 (40 μ l) wurden anti-AMT Ak (4,2 μ l, 1,2 mg ml⁻¹) und TCEP (5 μ l, 5 mM) 1 h bei 300 rpm und RT auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden AuNP (1 ml, 1 OD) hinzugefügt und die Lösung wurde 2 h bei 300 rpm und RT inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden drei Waschschrte wie bei der Direktbeschichtung durchgeführt mit Resuspension in BSA-Lösung (15 mg ml⁻¹ in PBS pH 6,8). Nach dem letzten Waschschrte wurde der Rückstand in BSA-Lösung (1 ml, 0,1 mg ml⁻¹) resuspendiert und Saccharose (100 mg) hinzugefügt.

Kovalente Anbindung des Antikörpers an PEG-beschichteten Goldnanopartikel PEG-C SH-PEG-COOH (459 Da, 2,4 μ l, 1 mg ml⁻¹) und SH-PEG-COOH (3000 Da, 15,6 μ l, 1 mg ml⁻¹) in H₂O wurden zu AuNP (1 ml, 1 OD) gegeben und über Nacht bei 650 rpm und RT inkubiert. Die Suspension wurde dreimal gewaschen, um überschüssiges PEG zu entfernen. Dafür wurde die Suspension 20 min zentrifugiert (16 000 g) und nach Überstandabnahme in H₂O resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Rückstand in 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) (2 μ l,

10 mg ml⁻¹) und sulfo-NHS (3,6 µl, 10 mg ml⁻¹) in MES pH 5 resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 650 rpm und 37 °C wurden 500 µl MES pH 5 hinzugefügt. Die Mischung wurde 10 min zentrifugiert (16 000 g), der Überstand abgenommen und der Rückstand in anti-AMT Ak (16 µl, 1,2 mg ml⁻¹) und 400 µl MES pH 5 resuspendiert. Die Lösung wurde über Nacht bei 300 rpm und RT inkubiert. Es folgten Waschschritte mit 30 min Zentrifugation (6000 g, 4 °C), Resuspension in Hydrogencarbonatpuffer und 30 min Inkubation. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Rückstand in BSA-Lösung (20 mg ml⁻¹ in MES pH 6) resuspendiert und 1 h inkubiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Rückstand in BSA-Lösung (1 ml, 0,1 mg ml⁻¹) resuspendiert und Saccharose (100 mg) hinzugefügt.

Anbindung des biotinylierten Antikörpers an Streptavidin-Gold SA-C Für die Biotinylierung des Antikörpers wurde anti-AMT Ak (5 µl, 1,2 mg ml⁻¹) mit 50 µl PBS pH 7,4 verdünnt, NHS-PEO₄-Biotin (0,47 µl, 1,0 mg ml⁻¹) wurde hinzugefügt und die Lösung 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Biotinylierungsreagenzien wurden durch drei Waschschritte mit 400 µl PBS mit Zentrifugenfiltern (AmiconUltra 0,5 ml Ultracel, 30 000 Da) durch 20 min Zentrifugation bei 6000 g entfernt. Die biotinylierten anti-AMT Ak wurden zu Streptavidin-Goldnanopartikeln (SAuNP) (1 ml, 1 OD, $\varnothing = 40$ nm) hinzugefügt und 1 h bei 300 rpm und RT inkubiert. Es folgten drei Waschschritte wie bei der Direktbeschichtung.

Konjugatcharakterisierung

UV/Vis-Messungen Die Messung von UV/Vis-Spektren wurde mit einem Lambda 9 UV/Vis-Spektrometer durchgeführt. Die zu vermessenden Lösungen wurden in Standard 1 cm-Quarzküvetten gefüllt. Als Referenzlösung wurde PBS pH 7,4 verwendet. Die Spektren wurden von 450 nm bis 700 nm mit einer spektralen Auflösung von 1 nm aufgenommen.

Dynamische Lichtstreuung Dynamische Lichtstreuung (DLS)-Messungen wurden in 40 µl-Einwegküvetten mit dem Zetasizer durchgeführt. Für die Berechnung der Größenverteilung wurde ein Brechungsindex von 0,135 für die kolloidalen Partikel und 1,330 für das Lösemittel angenommen und für die Viskosität der Probe die des Lösemittels Wasser 0,8872. Die Messungen wurden bei RT nach einer Äquilibrierungszeit von 10 s in Triplikaten mit automatischer Messdauer, automatischer Positionierung und automatischer Dämpfung unter einem Messwinkel von 170° (Rückstreuung) durchgeführt. Die Wellenlänge des HeNe-Lasers war 633 nm. Aus den Mehrfachmessungen wurden Durchschnittsergebnisse gebildet.

Aufnahme von Kalibrierungen auf Teststreifen

Für die Aufnahme von Kalibrierungen wurden 250 µl Amitriptylin (AMT)-Lösung mit Konzentrationen von 0, 1, 10, 30, 100, 300, 1000 und 10 000 µg l⁻¹ in PBS pH 7,4 und in

zehnfach verdünntem Fetalem Kälberserum (engl. *Fetal Calf Serum*) (FCS) als Probe auf das Sample-Pad aufgegeben. Für den Konjugatvergleich wurden Teststreifen der Version V2 mit vier Kanälen verwendet.

Für die Multi-Analyt-Kalibrierung wurden Proben mit 0, 1, 10, 30, 100, 300, 1000 und 10 000 $\mu\text{g l}^{-1}$ AMT und Testosteron in PBS pH 7,4 verwendet. Die Test- und Kontrolllinie wurden auf die verwendeten Teststreifen der Version V4.1 mit sechs Kanälen mit dem Kontaktpotter aufgebracht. Dabei war auf der Testlinie in drei Kanälen NRT-BSA für die spezifische Erkennung von AMT und in den anderen drei Kanälen Testosteron-BSA für die spezifische Erkennung von Testosteron immobilisiert. Auf den Stegen der Konjugat-Pads wurde entsprechendes Konjugat, welches über Direktbeschichtung mit UV-Aktivierung mit anti-AMT Ak 8F9 oder anti-Testosteron Ak hergestellt wurde, aufgebracht.

Für die Berechnung von Kalibrierfunktionen wurde der Quotient aus Test- und Kontrolllinie gebildet und dieser auf das Signal der Nullkonzentration normiert. Eine logistische Funktion (Gl. (3.5)) wurde für die Kurvenanpassung verwendet

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (3.5)$$

Die minimal detektierbare Konzentration (engl. *Minimum Detectable Concentration*) (MDC) wurde als Konzentration am Schnittpunkt der unteren Grenze des 95 %-Konfidenzbandes bei der Nullkonzentration mit der Kalibrierfunktion und die zuverlässige Erkennungsgrenze (engl. *Reliable Detection Limit*) (RDL) am Schnittpunkt mit der oberen Grenze des 95 %-Konfidenzbandes berechnet^[99].

Untersuchung der Kreuzreaktivitäten auf den Teststreifen

Für die Untersuchung der Kreuzreaktivitäten wurden 400 nM der Trizyklischen Antidepressiva (TZA) AMT, Opipramol (OPP), Doxepin (DOX), Imipramin (IMI), Trimipramin (TRIM) und Clomipramin (CLOM), sowie Carbamazepin (CBZ) als Probe auf Teststreifen der Version V4.1 aufgegeben. Auf dem Konjugat-Pad war über die Direktbeschichtung mit UV-aktiviertem Antikörper hergestelltes anti-AMT Ak 8F9-AuNP-Konjugat eingetrocknet. Es wurde die relative Inhibition i_T im Vergleich zur Inhibition von AMT I_{AMT} über die Berechnung der Inhibition I_T mit dem Signal S_T im Vergleich zum Signal einer Leermessung (PBS) S_{leer} berechnet (Gl.(3.6)).

$$I_T = \frac{S_{\text{leer}} - S_T}{S_{\text{leer}}} \quad (3.6)$$

$$i_T = \frac{I_T}{I_{AMT}}$$

Auswertung der Teststreifen

Fotos wurden mit der Kompaktkamera (1/100 s, f3,5, ISO 100) in einer Fotobox unter künstlicher Beleuchtung aufgenommen, nachdem die Teststreifen getrocknet waren. Die im OFFIS (Insitut für Informatik, Oldenburg) von Sven Wagner und Markus Wieghaus entwickelte Software wurde für die Auswertung der Signale auf den Teststreifen verwendet wie in Conrad et al (2023)^[97] beschrieben.

Durchführung magnetische Separation

Um die Nachweisgrenze zu verschieben, wurde eine Methode zur magnetischen Separation entwickelt. Dafür wurde ein Konjugat mit magnetischen Nanopartikeln (MNPs) (40 nm) über Direktbeschichtung mit UV-aktiviertem anti-AMT Ak 8F9 hergestellt. Für die magnetische Separation wurden 10 µl des Konjugats (1,17 OD) mit der Probe (1 ml verschiedene AMT-Konzentrationen in PBS) und Tween (10 µl 1 % Tween in PBS) 5 min inkubiert und anschließend 30 min auf einen Magneten gestellt. Durch den Magneten bewegten sich die MNPs zu diesem und der Überstand (970 µl) wurde vorsichtig mit einer schmalen Pipettenspitze abgenommen, ohne die separierten MNPs zu resuspendieren. Der Rückstand wurde nach 5 min im Ultraschallbad (50 %, RT) zur Resuspension auf das Sample Pad aus Glasfaser aufgegeben. Weitere 220 µl PBS wurden für einen guten Fluss auf ein zweites Sample Pad aus Cellulose aufgegeben. Das Konjugat-Pad war wie die Sample-Pads mit Sample-Pad-Puffer imprägniert. Darauf befanden sich keine getrockneten Konjugate, da das Konjugat gemeinsam mit der Probe auf das Sample Pad aufgegeben wurde.

3.4.6 Aufstockverfahren

Simulation des Aufstockverfahrens

Ein Auswerteverfahren für das Aufstockverfahren wurde in Matlab simuliert. Dafür wurden Signale über verschiedene Funktionen berechnet, eine sigmoidale Kurve (3.5) und Kalibrierkurven, die aus dem Massenwirkungsgesetz für einen monovalenten (3.7) oder bivalenten (3.8) Rezeptor hergeleitet wurden^[100].

$$s_{\text{mono}} = \left(\frac{c_{0,R} - c_{0,L} - 1/K}{2} + \sqrt{\frac{(c_{0,R} + c_{0,L} + 1/K)^2}{4} - c_{0,R} \cdot c_{0,L}} \right) \cdot \frac{1}{c_{0,R}} \quad (3.7)$$

$$s_{\text{bi}} = 1 - \frac{\left(\frac{c_{0,R} + c_{0,L} + 1/K}{2} + \sqrt{\frac{(c_{0,R} + c_{0,L} + 1/K)^2}{4} - c_{0,R} \cdot c_{0,L}} \right)^2}{c_{0,R}^2} \quad (3.8)$$

Bei der sigmoidalen Kalibrierfunktion wurden in den Simulationen nur p und x_0 variiert und $A_1 = 1$ und $A_2 = 0$ gesetzt, da die Signale bei Immunoassays üblicherweise normiert

werden, sodass sie sich zwischen 0 und 1 bewegen. Die Werte für p und x_0 stammten aus der AMT-Kalibrierung in Puffer und zehnfach verdünnten Serum-Proben. Außerdem wurden Simulationen mit $x_0 = 10^{-7} M$ mit $p = 0,15, 1,0$ und $3,2$ durchgeführt, um die Breite der möglichen sigmoidalen Kalibrierfunktionen abzudecken. Bei den aus dem Massenwirkungsgesetz hergeleiteten Kalibrierfunktionen steht $c_{0,R}$ für die Ausgangskonzentration des Rezeptors (Antikörpers), $c_{0,L}$ für die Ausgangskonzentration des Liganden (Analyten) und K für die Affinitätskonstante.

$c_{0,R}$ wurde variiert und $K = 10^8 M^{-1}$ gesetzt, da festgestellt wurde, dass für das Verfahren nur das Verhältnis von $c_{0,R}$ und K entscheidend war. Für die Simulationen wurde für die Kalibrierkurven der Arbeitsbereich bestimmt (10 % - 90 % der Signaldynamik). In diesem Konzentrationsbereich wurden sechs logarithmisch äquidistante Aufstockkonzentrationen berechnet. Dabei rief die kleinste Konzentration 10 % Hemmung hervor. Für die Konzentrationsbestimmung über das Aufstockverfahren wurden 100 Probenkonzentrationen im Arbeitsbereich ausgewählt. Zu diesen wurden jeweils die Aufstockkonzentrationen addiert und die Signale mit der Kalibrierfunktion berechnet. Von den Signalen s wurde für die Auftragung zum Test der Linearität entweder der natürliche Logarithmus gebildet oder die Logit-Funktion (3.9) angewandt.

$$y = \ln \left(\frac{s}{1-s} \right) \quad (3.9)$$

Für die Bestimmung der Probenkonzentration wurde als Indikator für die Linearität für jede geschätzte Konzentration die Residuenquadratsumme (SS_{res}) berechnet. Durch lineare Regression bei Auftragung von der logit-Funktion des Signals bzw. des natürlichen Logarithmus des Signals gegen die logarithmierte (dekadischer Logarithmus) geschätzte Gesamtkonzentration wurde die SS_{res} erhalten. Die bestimmte Konzentration $c_{ermittelt}$ lag im Minimum von SS_{res} (3.10), wobei die geschätzten Probenkonzentrationen für die Simulationen zwischen der Konzentration, die 10 % Inhibition hervorrief c_{EC10} und der Konzentration, die 90 % Inhibition hervorrief c_{EC90} lag.

$$\arg \min_{c \in [c_{EC10}, c_{EC90}]} SS_{res}(c) = c_{ermittelt} \quad (3.10)$$

Das Matlab-Skript für die Simulation des Aufstockverfahrens ist im Anhang A.1 auf S. 118.

RIfS-Messung für Aufstockverfahren

Die Details des Messprogramms für die Aufstockmessungen sind in Tabelle 3.8 aufgeführt. Zur Aufnahme der Basislinie wurde die Transducer-Oberfläche zunächst mit Puffer gespült. Für die Messungen von Pufferproben wurde nach der Basislinie die Probe bei einer Flussrate von $0,4 \mu l s^{-1}$ bei RT injiziert. Die Probe bestand aus $400 \mu l$ Testosteron-Probe ($3,0 \mu g l^{-1}$

Testosteron) in PBS pH 7,4, 50 μl 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron und 50 μl Aufstocklösung. Nach 250 s Assoziationsphase folgten 100 s Dissoziationsphase. Die Transduceroberfläche wurde mit GdnHCl 40 s regeneriert. Zum Abschluss wurde eine Basislinie mit Puffer aufgenommen.

Tabelle 3.8: RIfS-Programm für Aufstockmessungen mit Volumen V und Pumpgeschwindigkeit v

Matrix Schritt	Puffer		Milch		Speichel		Serum	
	V μl	v $\mu\text{l s}^{-1}$	V μl	v $\mu\text{l s}^{-1}$	V μl	v $\mu\text{l s}^{-1}$	V μl	v $\mu\text{l s}^{-1}$
Basislinie	100	0,4	240	2	60	0,5	100	0,5
Luft laden					60	20	60	20
Probe laden	300	20	950	20	600	20	600	20
Assoziation					40	20	40	20
verwerfen	100	0,4	800	2	450	0,5	450	0,5
Dissoziation	300	50	500	20	1000	50	1000	50
Regeneration laden			600	20				
Regeneration	100	1	120	2	360	2	1200	2
injizieren	250	20	500	20	500	20	500	20
verwerfen	50	20	50	20	50	20	50	20
Basislinie	200	5	400	2	400	2	400	2
	300	20	500	20	300	20	300	20
	200	20	3000	20	200	20	100	20
	150	0,4	300	2	100	0,5	100	0,5

Für die Messungen der Proben mit Testosteron in Milch wurde H-fettarme Milch (ultrahocherhitzt) mit 1,5 % Fett von Schwarzwaldmilch, Freiburg im Breisgau, DE verwendet. Die Transducer-Oberfläche wurde zur Aufnahme der Basislinie zunächst mit Puffer gespült. Anschließend wurde die Probe bei einer Flussrate von $2 \mu\text{l s}^{-1}$ bei RT injiziert. Die Probe bestand aus 900 μl Testosteron-Probe ($0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron) in Milch, 20 μl 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron und 80 μl Aufstocklösung. Nach 400 s Assoziationsphase folgten 400 s Dissoziationsphase. Die Transduceroberfläche wurde mit Natriumdodecylsulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) (SDS) (0,5 %, pH 1,6) 200 s regeneriert. Zum Abschluss wurde eine Basislinie mit Puffer aufgenommen.

Für die Regeneration der Transduceroberfläche bei Messungen in Speichel und Serum wurde ebenfalls mit SDS (0,5 %, pH 1,6) regeneriert. Für die Messung von Testosteron in Speichel bestand die Probe (700 μl) aus 630 μl Testosteron-Probe mit $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Speichel mit 7 μl OVA (10 mg ml^{-1}), 11,2 μl anti-Testosteron ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), Aufstocklösung und PBS (10x, 1,5 M NaCl, 100 mM KH_2PO_4 , pH 6,8). Für die Messung von Testosteron in FCS wurden 70 μl Probe mit 10 oder $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in FCS mit 7 μl OVA (10 mg ml^{-1}), 5,6 μl anti-Testosteron ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), Standardlösung und PBS auf ein Zielvolumen von 700 μl gemischt. Für die Messung von AMT in FCS wurden 70 μl

Probe mit $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ AMT in FCS mit $7 \mu\text{l}$ OVA (10 mg ml^{-1}), $1,166 \mu\text{l}$ anti-AMT Ak 8F9 ($1,2 \text{ mg ml}^{-1}$), Aufstocklösung und PBS auf ein Zielvolumen von $700 \mu\text{l}$ gemischt. Einen Überblick der Probenzusammensetzung für die Messungen zeigt Tabelle 3.9.

Tabelle 3.9: Probenzusammensetzung für Aufstockmessungen mit Antikörpervolumen V_{Stamm} , Probenvolumen V_{Probe} , Gesamtvolumen der Messungen V_{Ziel} und Antikörperkonzentration in den Messungen (Antikörper c_{Ziel})

Analyt	Matrix	Antikörper- V_{Stamm} in μl	Antikörper c_{Ziel} in $\mu\text{g ml}^{-1}$	V_{Probe} in μl	V_{Ziel} in μl
Testosteron	Puffer	50	2,50	400	500
	Milch	20	0,50	900	1000
	Serum	5,6	0,20	70	700
	Speichel	11,2	0,40	630	700
Amitriptylin	Serum	1,166	2,00	70	700

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Quantitative Biomolekulare Interaktionsanalyse

Für den zu entwickelnden Lateral-Flow-Assay (LFA) müssen zunächst passende Detektionsantikörper gefunden werden. Die kommerziell erhältlichen anti-Amitriptylin Antikörper (anti-AMT Ak) werden dafür mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) untersucht, um ihre kinetischen und thermodynamischen Konstanten zu ermitteln und den am besten geeigneten auszuwählen. Die RIfS ist als direkte optische Methode, die zeitaufgelöste Daten liefert, hervorragend für die Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) geeignet. Thermodynamische und kinetische Daten der biomolekularen Wechselwirkung lassen sich über verschiedene Algorithmen bestimmen. Aufgrund der Vielzahl an verfügbaren Auswertemethoden werden diese zunächst mit simulierten Bindungskurven auf ihre Eignung zur BIA untersucht, bevor die Auswertung für die Antikörpermessungen durchgeführt wird.

4.1.1 Vergleich von Auswertalgorithmen mit simulierten Bindungskurven

Für die Simulation von Bindungskurven wird eine Kinetik pseudo-erster Ordnung mit $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ angenommen und die erhaltenen Bindungskurven mit einer maximalen Amplitude von 0,01 nm statistisch verrauscht (siehe Abbildung 4.1). Ein Rauschen dieser Größenordnung kann bei realistischen Messungen auftreten und sollte durch Verbesserung der experimentellen Bedingungen reduziert werden. Die simulierten Bindungskurven beginnen mit einer Basislinie, anschließend folgt die Assoziationsphase. In der Assoziationsphase steigt das gemessene Signal an; je höher die Antikörperkonzentration, desto größer ist der Anstieg. Auf die Assoziationsphase folgt die Dissoziationsphase, in der sich der Antikörper von der Oberfläche löst. Das gemessene Signal folgt einem exponentiellen Zerfall. Im Idealfall einer 1:1 Kinetik nähert sich das Signal bei vollständiger Ablösung des Antikörpers der Basislinie zu Beginn der Messung an.

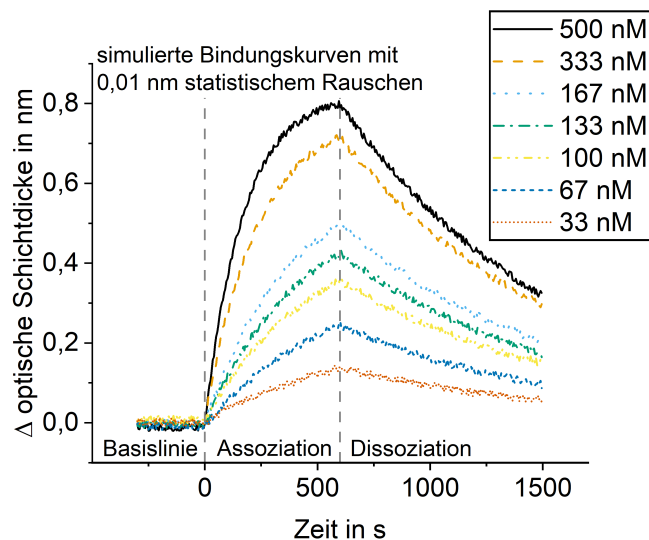


Abbildung 4.1: Simulierte Bindungskurven für sieben Antikörper-Konzentrationen mit 300 s Basislinie, 600 s Assoziation und 900 s Dissoziation für $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Die Simulationen wurden mit BIAevaluation 4.1.1 mit dem 1:1 (Langmuir) *binding model* durchgeführt. Statistisches Rauschen mit einer Amplitude von 0,01 nm wurde mit Matlab hinzugefügt.

Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten

Die Berechnung der kinetischen Konstanten erfolgt mit verschiedenen Methoden. Zur Bestimmung von k_a wird die gesamte Assoziationsphase der Messung betrachtet. Um k_a zu ermitteln, wird zunächst die scheinbare Ratenkonstante k_s mit verschiedenen Methoden bestimmt. Die erste Methode nutzt einen monoexponentiellen Fit der Bindungskurven, wobei k_s aus der Krümmung der Kurven erhalten wird. Bei der zweiten Methode wird eine Linearisierung der Kurven mithilfe der Ableitung durchgeführt. Bei Auftragung der Ableitung gegen die Beladung entspricht die negative Steigung der linearen Regression k_s . Die dritte Methode verwendet eine Linearisierung der Bindungskurven über Integration. Der Start der Integration kann dabei entweder zu Beginn der Assoziationsphase bei 0 s liegen, oder es wird rückwärts mit Start am Ende der Assoziationsphase (hier bei 600 s) integriert. Bei Auftragung von k_s gegen die Konzentration und einer linearen Regression wird k_a aus der Steigung erhalten, während der Y-Achsenabschnitt k_d entspricht.

Als erstes wird die Auswertung über die Ableitung betrachtet. Abbildung 4.2 a) zeigt die Auftragung der Ableitung gegen die Beladung. Die scheinbare Ratenkonstante k_s wird aus der negativen Steigung erhalten. Es fällt auf, dass die Ableitung das Rauschen verstärkt. Bei Auftragung der Ableitung gegen die Beladung für die kleinste Antikörperkonzentration ist kein klarer Trend der Datenpunkte zu erkennen. Eine lineare Regression liefert bei einer Konzentration von 33 nM ein Ergebnis, bei dem sich die Steigung nicht signifikant von Null unterscheidet. Bei den höheren Konzentrationen tritt dieses Phänomen nicht auf, da hier die Signaländerungen im Vergleich zum Rauschen höher sind.

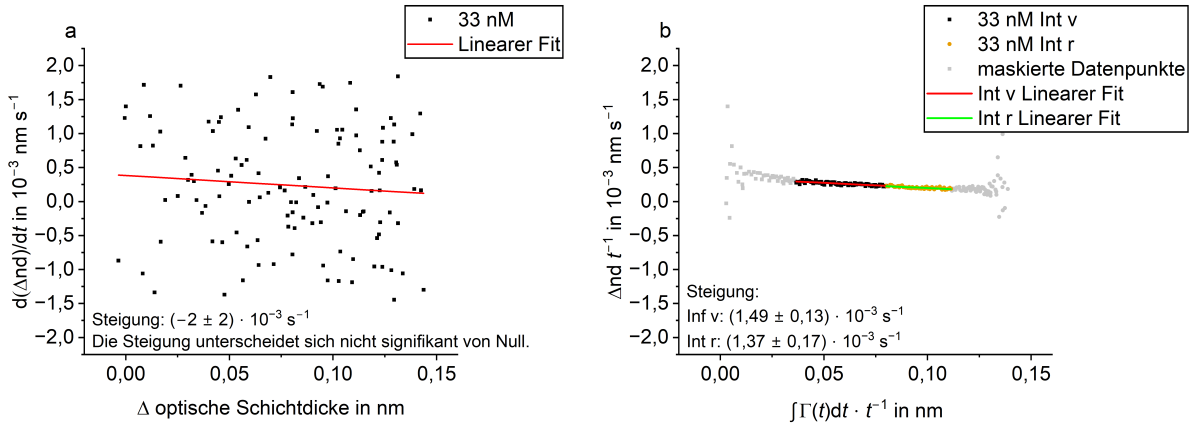


Abbildung 4.2: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante durch Linearisierung. a) Lineare Regression der Ableitung der simulierten Bindungskurve mit 0,01 nm statistischem Rauschen für 33 nM zu Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s b) Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s über Integration (vorwärts Int v und rückwärts Int r) der simulierten Bindungskurve mit 0,01 nm statistischem Rauschen für 33 nM. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.1 aufgeführt.

Ableiten verstärkt in der Regel das Rauschen der Daten. Dabei sind kleinere Konzentrationen vom Rauschen stärker betroffen, da das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) kleiner wird. Die starke Beeinflussung der Ableitung durch das Rauschen zeigt, dass die Ableitungsmethode für verrauschte Messdaten wenig geeignet ist.

Abbildung 4.2 b) zeigt die Auswertung über Integration für die kleinste Konzentration von 33 nM. Im Gegensatz zur Auswertung über die Ableitung lässt sich hier eine lineare Regression mit dem Ergebnis einer Steigung, die sich signifikant von Null unterscheidet, durchführen, wenn die ersten Werte maskiert werden. Je weiter die Integration voranschreitet, desto besser liegen die erhaltenen Datenpunkte auf einer Geraden. Dies ist sowohl bei der Integration von Beginn der Assoziationsphase (Int v) als auch bei der Integration mit Beginn am Ende der Assoziationsphase (Int r) der Fall.

Im Gegensatz zur Ableitung reduziert die Integration das Rauschen, da sie einen Glättungseffekt bewirkt. Bei den ersten Werten, die durch die Integration erhalten werden, beeinflusst das Rauschen die berechneten Werte noch stark. Je weiter die Integration voranschreitet, desto stärker ist der Glättungseffekt. Für die Berechnung von der scheinbaren Ratenkonstante k_s über die Integration werden die X-Werte für die Linearisierung durch Integration vom Start bis zum entsprechenden Zeitpunkt durch das Zeitintervall geteilt. Der Glättungseffekt der Integration hebt das Rauschen durch Mittelung auf. Die Y-Werte für die Linearisierung als Differenz der optischen Schichtdicke spiegeln das Rauschen stärker wider und erst bei größeren Schichtdickendifferenzen spielt es eine geringere Rolle. Da sich der Glättungseffekt der Integrationsmethode erst nach einem gewissen Intervall bemerkbar macht, sollten die ersten Werte der Auftragung maskiert werden (4.2 b). Außerdem sollte der Start der Integration dort liegen, wo der Signalanstieg groß ist, zu

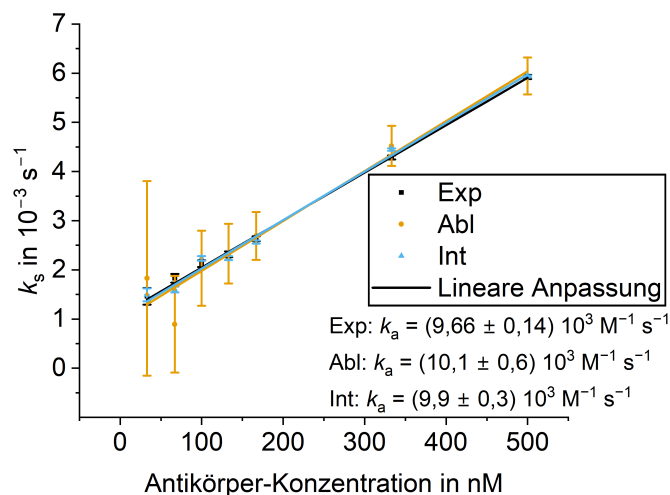


Abbildung 4.3: k_s -Linearisierung für simulierte Bindungskurven: Auftragung von k_s gegen die Konzentration. k_s wurde mit verschiedenen Methoden für simulierte Bindungskurven mit 0,01 nm statistischem Rauschen ermittelt. Bestimmung von k_s über nichtlineare Kurvenanpassung (Exp), über die Ableitung (Abl) und über vorwärts Integration (Int) über die gesamte Assoziationsphase (0 - 600 s). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Kurvenanpassung. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.2 aufgeführt.

Beginn der Assoziationsphase.

Um aus den erhaltenen scheinbaren Ratenkonstanten k_s die Assoziationsratenkonstanten k_a zu erhalten, wird k_s gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildung 4.3). Nach linearer Regression gibt die Steigung k_a und der Y-Achsenabschnitt k_d an. Die Standardfehler der Kurvenanpassung der berechneten k_s liegen für die Bestimmung über die Ableitung neun bis zwölfmal höher als bei der Bestimmung von k_s über eine Exponentialfunktion und 15 bis 18mal höher als bei der Bestimmung von k_s über die vorwärts Integration. Bei der vorwärts Integration wird die Integration zum Start der Assoziationsphase begonnen, während bei der rückwärts Integration die Integration am Ende des gewählten Auswertebereichs der Assoziationsphase startet und die Integration von hinten nach vorne durchgeführt wird. Die über die verschiedenen Methoden erhaltenen k_s weichen bei den höheren Konzentrationen kaum voneinander ab, während bei den kleineren Konzentrationen die über die Ableitung bestimmten k_s gegenüber den anderen Methoden bis zu 50 % abweichen. Hier wird deutlich, dass die Ableitung das Rauschen verstärkt und dementsprechend die erhaltenen k_s mit einem größeren Fehler behaftet sind. Die erhaltenen k_a liegen dennoch für alle Methoden ausreichend nah an den richtigen Werten.

Abbildung 4.4 zeigt, dass bei Auswertung der gesamten Assoziationsphase alle Methoden eine Abweichung geringer als 10 % vom in der Simulation eingesetzten $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ aufweisen. Bei einer Reduktion des Auswertebereichs erhöhen sich die Fehler bei allen Auswertemethoden. Die Auswertung der ersten Hälfte der Assoziationsphase (0 - 300 s) ergibt, dass die vorwärts Integration mit einer Abweichung von 1 % die besten Ergebnisse

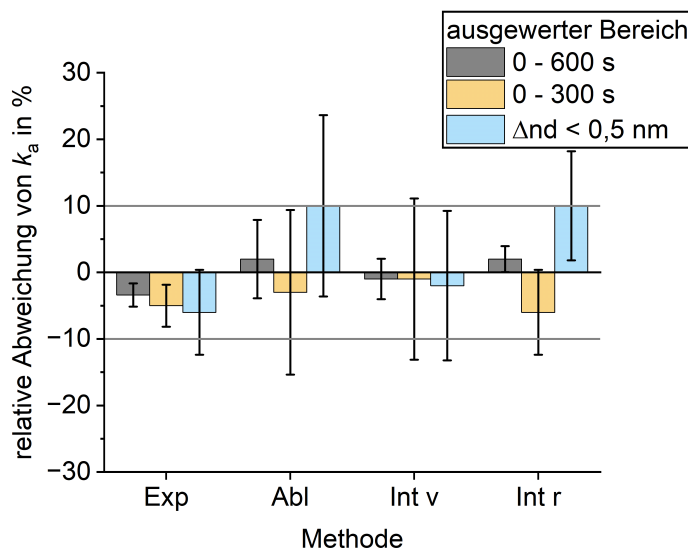


Abbildung 4.4: Relative Abweichung bei Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a aus k_s von simulierten Bindungskurven mit $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_d = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und 0,01 statistischem Rauschen. Die scheinbare Ratenkonstante k_s wurde mit monoexponentiellem Fit (Exp), über die Ableitung (Abl), über Integration vorwärts (Int v) und rückwärts (Int r) über die gesamte Assoziationsphase (0 - 600 s), in der ersten Hälfte der Assoziationsphase (0 - 300 s) und für eine optische Schichtdicke $\Delta nd < 0,5 \text{ nm}$ bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Kurvenanpassung an.

liefert. Die anderen Methoden weisen größere Abweichungen auf. Bei der Auswertung bis zu einer bestimmten Schichtdicke ($\Delta nd < 0,5 \text{ nm}$) kommt es bei der Auswertung über die Ableitung und rückwärts Integration zu Abweichungen von 10 %.

Mit allen Methoden lässt sich k_a mit einer Abweichung kleiner als 10 % bestimmen. Das zeigt, dass alle Methoden prinzipiell zur Bestimmung von k_a geeignet sind. Die größeren Abweichungen bei der Auswertung der ersten Hälfte der Assoziationsphase oder bei Auswertung bis zu einer optischen Schichtdicke von 0,5 nm verdeutlichen, dass eine Verkleinerung des Auswertebereichs zu Abweichungen vom richtigen Wert und größeren Unsicherheiten führt, da die Zahl der Datenpunkte reduziert wird. Daraus folgt, dass der auszuwertende Bereich so groß wie möglich gewählt werden sollte.

Zur Bewertung der Methoden lässt sich sagen, dass sich die Integrationsmethode sehr gut für verrauschte Daten eignet, da die Integration das Rauschen verringert (Tabelle 4.1). Die Bestimmung von k_a liefert für die monoexponentielle Kurvenanpassung und vorwärts Integration zur Bestimmung von k_s zuverlässig richtige Werte unabhängig vom gewählten Auswertebereich, während bei der Bestimmung über die Ableitung und Integration rückwärts in einem eingeschränkten Datenbereich größere Fehler auftreten. Bei der Auswertung über die Integration ist zu beachten, dass bei der k_s -Bestimmung die berechneten Werte am Beginn der Integration maskiert werden sollten, da diese stark vom Rauschen beeinflusst sind.

Tabelle 4.1: Bewertung der Auswertungsmethoden zur Bestimmung von k_a . k_a wird über k_s -Linearisierung ermittelt, wobei k_s über einen monoexponentiellen Fit (Exp), die Ableitung (Abl), Integration vorwärts (Int v) oder rückwärts (Int r) berechnet wird.

Methode	Exp	Abl	Int v	Int r
Robust gegenüber Rauschen	-	-	++	+
Robust gegenüber Variation des Auswertebereichs	+	-	+	-
Ohne Datenmaskierung	+	+	-	-

Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten

Auch zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k_d liegen verschiedene Auswertalgorithmen vor. Zum einen kann k_d nach k_s -Bestimmung mit den verschiedenen Methoden bei k_s -Linearisierung als Y-Achsenabschnitt abgelesen werden. Zum anderen kann k_d aus der Dissoziationsphase der Messung über die Anpassung einer Exponentialfunktion oder eine Linearisierung über die Ableitung bestimmt werden. Dabei können entweder alle Konzentrationen über einen globalen Fit in die Bestimmung einbezogen oder alternativ kann die höchste gemessene Konzentration zur Bestimmung herangezogen werden (hier 500 nM), da bei hohen Anlagerungen der exponentielle Zerfall am besten zu sehen ist. Abbildung 4.5 zeigt die Abweichungen von k_d bei verschiedenen Auswertemethoden.

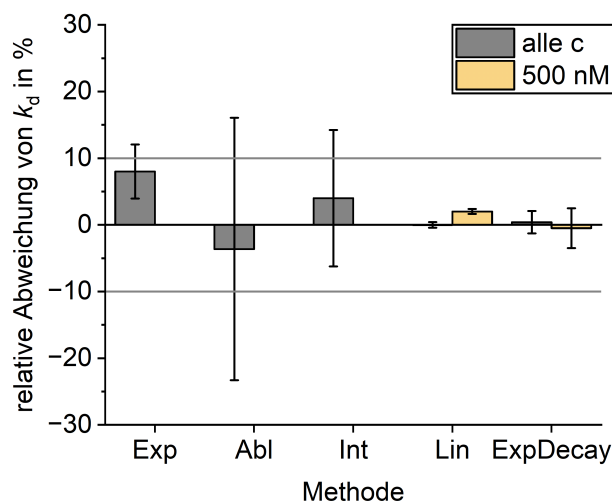


Abbildung 4.5: Relative Abweichung bei Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k_d von simulierten Bindungskurven mit $k_a = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und 0,01 nm statistischem Rauschen. Die Bestimmung von k_d erfolgt über den Y-Achsenabschnitt aus k_s -Linearisierung, bei der k_s mit monoexponentiellem Fit (Exp), über die Ableitung (Abl) und über Integration vorwärts (Int) über die gesamte Assoziationsphase (0 - 600 s) bestimmt wird, oder über Auswertung der Dissoziationsphase mit Linearisierung über die Ableitung (Lin) oder Anpassung einer Exponentialfunktion (ExpDecay) für alle Konzentrationen (alle c) oder für die höchste Konzentration 500 nM. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Kurvenanpassung an.

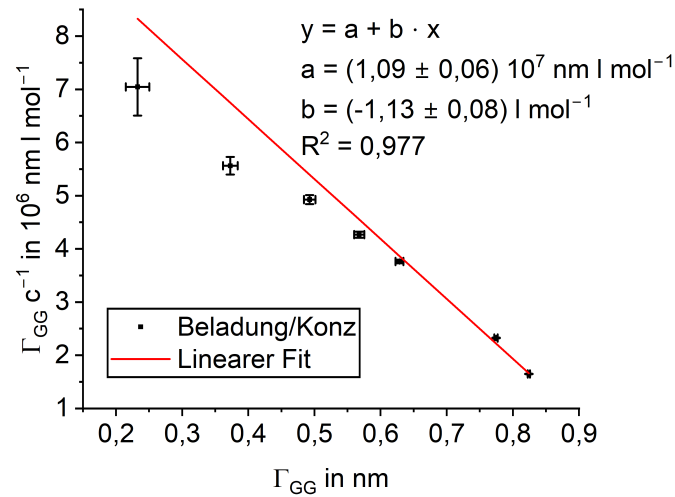


Abbildung 4.6: Scatchard-Plot zur Bestimmung der Affinitätskonstante von simulierten Bindungskurven mit $K = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ und $0,01 \text{ nm}$ statistischem Rauschen, wobei die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} über einen monoexponentiellem Fit (Exp) bestimmt wird. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Kurvenanpassung an.

Bei der Bestimmung von k_d über k_s -Linearisierung weicht der erhaltene k_d -Wert $4\% - 8\%$ vom richtigen Wert ab und ist mit Unsicherheiten von $4\% - 20\%$ behaftet. Die größte Unsicherheit tritt bei k_s -Bestimmung über die Ableitung auf. Bei der Bestimmung von k_d über die Auswertung der Dissoziationsphase werden geringere Abweichungen vom richtigen Wert von maximal $(2,0 \pm 0,4)\%$ bei der Auswertung der höchsten Konzentration über die Linearisierung erhalten. Bei Auswertung der Dissoziationsphase wird k_d mit weniger als 3% Abweichung richtig bestimmt. Dabei liefert die Linearisierungsmethode mit allen Konzentrationen die geringste Abweichung des Wertes mit $(0,0 \pm 0,4)\%$.

Insgesamt liefert die Auswertung der Dissoziationsphase sehr gute Werte. Die Auswertung der Assoziationsphase über k_s -Linearisierung ist hingegen stark fehlerbehaftet, bei der Bestimmung von k_d sehr ungenau und damit wenig geeignet für eine zuverlässige Bestimmung von k_d . Es ist eindeutig, dass die Auswertung der Dissoziationsphase besser zur Bestimmung k_d geeignet ist.

Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die erhaltenen Werte von k_a und k_d können zur Berechnung der Affinitätskonstante K verwendet werden. Außerdem ist die Bestimmung von K über einen Scatchard-Plot mit den erhaltenen Gleichgewichtsbeladungen Γ_{GG} aus der monoexponentiellen Kurvenanpassung der Assoziationsphase möglich. Abbildung 4.6 zeigt den Scatchard-Plot für die simulierten Bindungskurven. Dabei wird die erhaltene Gleichgewichtsbeladung dividiert durch die Konzentration gegen die Gleichgewichtsbeladung aufgetragen. Im Scatchard-Plot lässt sich K als negative Steigung ablesen. Die so berechnete K weicht um $(13 \pm 7)\%$ von der

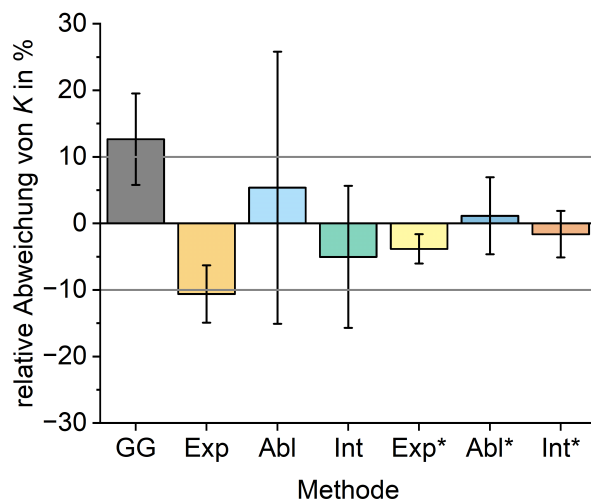


Abbildung 4.7: Relative Abweichung bei Bestimmung der Affinitätskonstante K von simulierten Bindungskurven mit $K = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ und $0,01 \text{ nm}$ statistischem Rauschen. Berechnung von K erfolgt über einen Scatchard-Plot (GG) mit Γ_{GG} , welches mit einem exponentiellen Fit der Assoziationsphase berechnet wird, aus k_a und k_d , welche aus k_s -Linearisierung erhalten werden, wobei k_s über exponentielle Kurvenanpassung (Exp), die Ableitung (Abl) und vorwärts Integration (Int) der gesamten Assoziationsphase berechnet wird. Bei Exp*, Abl* und Int* wird zur Berechnung k_d , welches aus einer exponentiellen Kurvenanpassung der Dissoziationsphase erhalten wird, verwendet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Kurvenanpassung an.

simulierten K ab.

Mit einer Abweichung von mehr als 10% im Ergebnis ist der Scatchard-Plot bei diesen Daten zur Bestimmung von K nicht gut geeignet. Dies kann zum einen am relativ starken simulierten Rauschen liegen. Zum anderen wird bei der Simulation nach 600 s Assoziation bei den gewählten Ratenkonstanten noch kein Plateau und damit keine Gleichgewichtsbeladung erreicht. Daher lässt sich die Gleichgewichtsbeladung nur ungenau aus den Bindungskurven ermitteln und ist mit einem Fehler behaftet. Bei einer schnelleren Kinetik, würde die Gleichgewichtsbeladung schneller erreicht und sie könnte besser über die exponentielle Kurvenanpassung bestimmt werden.

Bei einer Berechnung der kinetischen Daten lässt sich K als Quotient von k_a und k_d berechnen. Dazu werden einerseits k_a und k_d , welche aus der k_s -Linearisierung erhalten werden, verrechnet. Die scheinbare Ratenkonstante k_s wird über exponentiellen Fit, die Ableitung und über Integration der Assoziationsphase berechnet. Andererseits wird k_a aus der k_s -Linearisierung mit k_d verrechnet, wobei k_d aus einem exponentiellen Fit der Dissoziationsphase aller Konzentrationen erhalten wird. Abbildung 4.7 stellt die erhaltenen Abweichungen vom simulierten Wert für K dar.

Die erhaltenen K weichen für die Berechnung über den Scatchard-Plot und für die Berechnung über k_s -Linearisierung mit über die Exponentialfunktion berechnetem k_s mehr

als 10 % von dem simulierten Wert ab. Bei Berechnung von k_s über die Ableitung ist der berechnete Wert mit der größten beobachteten Unsicherheit von 20 % behaftet. Bei den K , bei denen k_d über die Dissoziationsphase berechnet wird, liegen die beobachteten Abweichungen unter 10 %. Die geringste Abweichung wird bei der Methode der k_a -Berechnung über die Ableitung mit (1 ± 6) % erreicht.

Die Berechnung von K zeigt, dass die Bestimmung über den Scatchard-Plot bei verrauschten Messdaten mit relativ langsamer Kinetik wenig zuverlässig ist. Auch die Bestimmung mit k_d aus k_s -Linearisierung ist mit einem großen Fehler behaftet. Am besten geeignet zur Bestimmung von K ist die Ermittlung von k_a über k_s -Linearisierung und Verrechnung mit aus der Dissoziationsphase berechneter k_d . Hierbei wird das beste Ergebnis mit guter Präzision und geringer Unsicherheit bei der Berechnung von k_s über Integration erzielt.

4.1.2 Vergleich monoklonaler Antikörper

Um Bindungskurven realer Messungen in Hinblick auf die Kinetik der Antikörper-Antigen-Reaktion auswerten zu können, ist es wichtig, die Qualität der Messungen zu überprüfen. Bei Aufnahme der Probe in den Schlauch ist es bei Kontakt der Probe mit dem Laufpuffer möglich, dass über den Zeitraum der Assoziationsphase die Probe mit der Zeit durch Diffusion im Kontakt mit dem Laufpuffer verdünnt wird^[101]. In der folgenden Dissoziationsphase kann eine Verunreinigung des Laufpuffers mit Probe zu einer Verfälschung der Dissoziation führen. Eine Möglichkeit, diese Vermischung von Probe und Laufpuffer zu unterbinden, ist eine Luftblasentrennung vorzunehmen.

Es werden Messungen mit und ohne Luftblasentrennung durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Vermischung von Laufpuffer und Probe während der Messung zu abweichenden Bindungskurven führt (Abbildung 4.8). Die Dreifachmessung von 33 nM anti-AMT Ak 8F9 zeigt, dass der Kurvenverlauf sich stark ähnelt. Mit Luftblasentrennung wird eine Zunahme der optischen Schichtdicke während der Assoziationsphase um $1,02 \pm 0,05$ nm beobachtet, ohne Luftblasentrennung beträgt der Anstieg $0,94 \pm 0,06$ nm. Die Messung ohne Luftblasentrennung zeigt eine geringfügig niedrigere Anlagerung auf der Oberfläche und leicht reduzierte Dissoziation. Im Rahmen der Standardabweichung unterscheiden sich die Messungen mit und ohne Luftblasentrennung nicht signifikant.

Die etwas geringere Anlagerung und geringere Dissoziation im Fall ohne Luftblasentrennung können auf eine Vermischung von Probe und Laufpuffer hindeuten. Daher werden die folgenden Messungen mit Luftblasentrennung durchgeführt.

Für die Bestimmung kinetischer Konstanten sollte die Anlagerung an der Oberfläche unter kinetisch kontrollierten Bedingungen stattfinden. Um zu überprüfen, ob der Massentransport zur Oberfläche die Anbindung beeinflusst, kann die Flussgeschwindigkeit variiert werden^[31,32,101,102]. Für die anti-AMT Ak 202 und 8F9 wird bei der niedrigsten Konzentra-

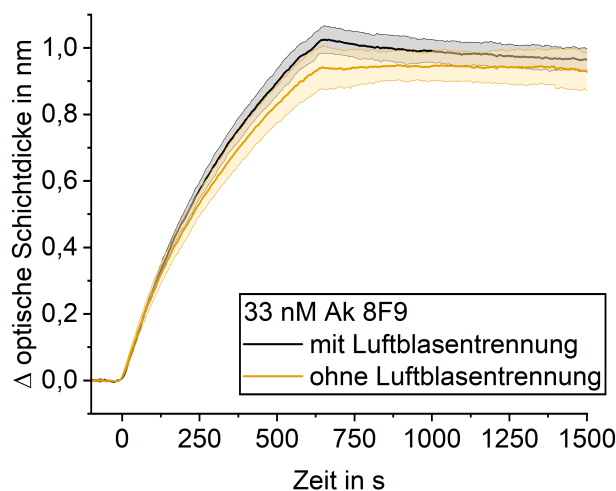


Abbildung 4.8: RIfS-Messungen mit (schwarz) und ohne (orange) Luftblasentrennung von 33 nM anti-AMT Ak 8F9. Die Fläche um die Kurven gibt die Standardabweichung von drei Messungen an.

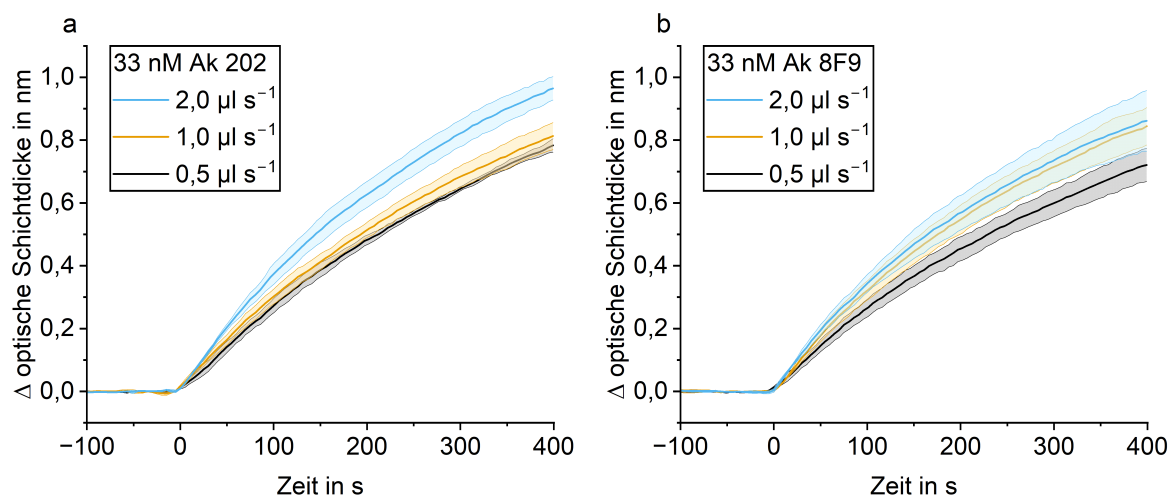


Abbildung 4.9: RIfS-Messungen bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten für a) 33 nM Ak 202 und b) 33 nM Ak 8F9. Die Fläche um die Kurven gibt die Standardabweichung von drei Messungen an.

tion 33 nM überprüft, ob sich die Bindungsraten bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten unterscheiden (Abbildung 4.9). Bei niedrigen Konzentrationen machen sich die Effekte des Massentransports stärker bemerkbar, da eine geringere Antikörperkonzentration einer verhältnismäßig größeren Oberflächenbelastung gegenübersteht.

Es ist eine leichte Zunahme der Bindungsrate mit steigender Flussgeschwindigkeit bei beiden Antikörpern zu beobachten. Dabei unterscheiden sich für Ak 202 (Abbildung 4.9 a) die Messungen bei $0,5 \mu\text{l s}^{-1}$ und $1,0 \mu\text{l s}^{-1}$ kaum, während sich bei Ak 8F9 (Abbildung 4.9 b) die Messungen bei $1,0 \mu\text{l s}^{-1}$ und $2,0 \mu\text{l s}^{-1}$ kaum unterscheiden. Insbesondere in den

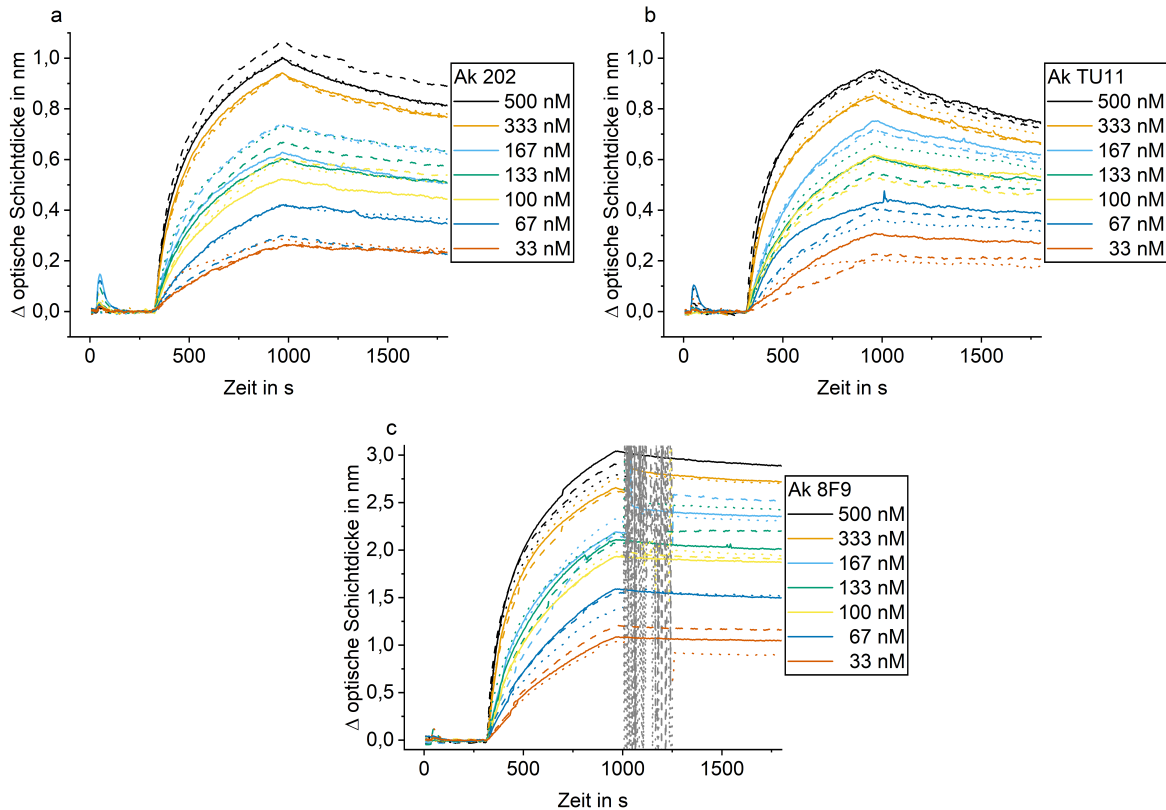


Abbildung 4.10: RfS-Messungen der anti-AMT Ak 202, TU11 und 8F9 bei verschiedenen Konzentrationen mit Luftblasentrennung und mit einer Flussrate von $0,5 \mu\text{l s}^{-1}$ mit 300 s Basislinie, 600 s Assoziation und 900 s Dissoziation. Jede Antikörper-Konzentration wird dreifach gemessen.

ersten 100 s liegen die Kurven sehr nah aneinander.

Im Falle einer kinetisch kontrollierten Reaktion sollten die Bindungsraten unabhängig von der Flussgeschwindigkeit sein. Steigt die Bindungsrate mit steigender Flussrate ist die Reaktion massentransportlimitiert. Da hier ein geringer Anstieg der Bindungsrate zu sehen ist, scheint der Massentransport eine Rolle zu spielen. Um kinetisch limitiert zu messen, wäre ein weiteres Ausdünnen der Oberfläche sinnvoll. Allerdings wurde festgestellt, dass ein weiteres Ausdünnen (0,01 bis 0,0001 %) zu keiner Verringerung der Anbindungsplätze führt, sondern die Signale konstant bleiben^[103]. Dies wurde auf mögliche Verunreinigungen des α -Methoxy- ω -amino-Polyethylenglykol (PEG-MA) mit Diamino-Polyethylenglykol (PEG-DA) zurückgeführt. Um einen hohen Antikörperverbrauch durch die Messungen zu vermeiden, werden die weiteren Messungen mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,5 \mu\text{l s}^{-1}$ durchgeführt.

Charakterisierung der Antikörper

Abbildung 4.10 zeigt die RfS-Messungen der anti-AMT Ak-Klone 202 (a), TU11 (b) und 8F9 (c). Bei Ak 8F9 traten nach Beginn der Dissoziationsphase häufig Luftblasen auf,

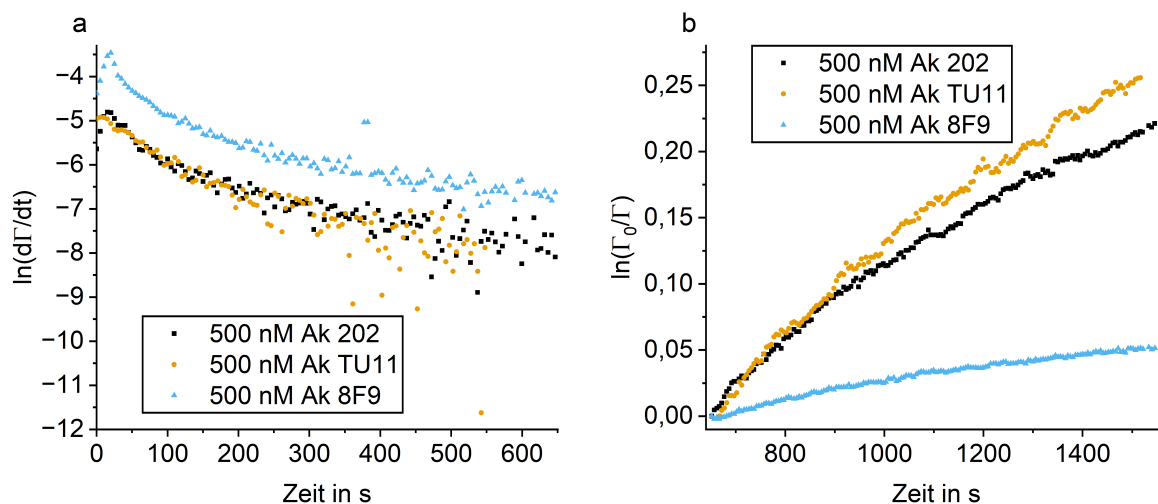


Abbildung 4.11: Überprüfung auf Kinetik pseudo-erster Ordnung für 500 nM Ak 202 (schwarz), Ak TU11 (orange) und Ak 8F9 (blau) a) Auftragung von $\ln(d\Gamma/dt)$ gegen die Zeit während der Assoziationsphase, b) Auftragung von $\ln(\Gamma_0/\Gamma)$ gegen die Zeit während der Dissoziationsphase.

diese werden maskiert und sind in der Abbildung grau dargestellt. Die Messungen von Ak 202 wurden von Christina Schanbacher durchgeführt, die von Ak 8F9 von Albert Kraft. Bei Ak 8F9 treten deutlich größere Schichtdickenänderungen als bei den anderen beiden Antikörpern auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Messungen von Ak 8F9 auf einer anderen Charge Transducer durchgeführt wurden. Um kinetisch kontrollierte Bedingungen zu gewährleisten, wird PEG-DA in ausgedünnter Form als Biopolymer verwendet. Eine geringe Oberflächenbeladung mit dem Liganden minimiert den Einfluss des Massentransports. Außerdem sorgt die Ausdünnung dafür, dass die einzelnen immobilisierten Liganden räumlich voneinander getrennt sind, sodass sich die anbindenden Antikörper nicht gegenseitig sterisch behindern und nur an einen Liganden gleichzeitig binden^[32,101]. Durch die Ausdünnung der immobilisierten Liganden auf der Oberfläche wird die Annahme einer Kinetik pseudo-erster Ordnung ermöglicht.

Die erhaltenen Bindungskurven werden zunächst auf das Vorliegen einer Kinetik pseudo-erster Ordnung untersucht. Da die Antikörper zwei Paratope aufweisen, können sie an zwei auf der Oberfläche immobilisierte Antigene binden, wodurch keine Assoziation pseudo-erster Ordnung vorliegt. Durch das Ausdünnen der Oberfläche könnte erreicht werden, dass es sterisch nicht möglich ist mit beiden Paratopen anzubinden, sodass eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden kann. Um dies zu überprüfen, wird in Abbildung 4.11 im Bereich der Assoziationsphase $\ln(d\Gamma/dt)$ gegen die Zeit aufgetragen und im Bereich der Dissoziationsphase $\ln(\Gamma_0/\Gamma)$ gegen die Zeit und auf Linearität geprüft^[102]. In Abbildung 4.11 a) zeigt sich, dass das Verhalten von $\ln(d\Gamma/dt)$ gegen die Zeit für Ak 202 im Bereich 20 - 110 s, für Ak TU11 von 25 - 170 s und für Ak 8F9 von 25 - 150 s in der Assoziationsphase linear ist. Während der Dissoziationsphase werden Abweichungen von der Linearität bei

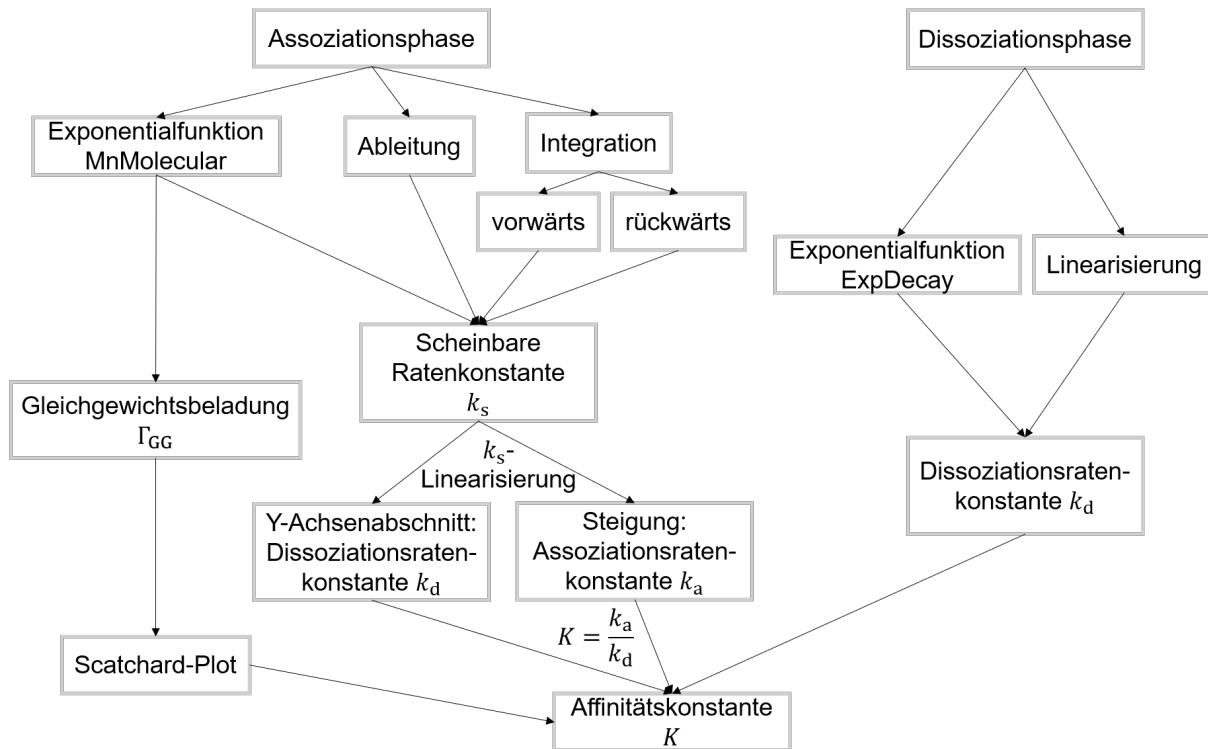


Abbildung 4.12: Vorgehen bei der BIA zur Charakterisierung der Thermodynamik und Kinetik. Mit verschiedenen Methoden werden die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante sowie die Affinitätskonstante bestimmt.

Auftragung von $\ln(\Gamma_0/\Gamma)$ gegen die Zeit (Abbildung 4.11 b) beobachtet.

Die beobachteten Abweichungen von der Linearität in der Assoziationsphase weisen darauf hin, dass keine 1:1 Kinetik vorliegt. Ein Teil der Ableitung zu Beginn der Assoziationsphase zeigt ein lineares Verhalten. Für diesen Teil kann eine Kinetik pseudoerster-Ordnung angenommen werden. Dieses einfache Modell erlaubt einen Vergleich der Antikörper. In der Dissoziationsphase weicht die Ableitung von der Linearität ebenfalls ab, die Kriterien für eine Kinetik erster Ordnung sind damit nicht erfüllt. Die Abweichung ist jedoch gering, da die Ableitung nur eine leichte Krümmung aufweist.

Die Abweichungen von der Linearität können aus der Avidität des Antikörpers resultieren^[101]. Der Antikörper kann mit beiden Paratopen an die Oberfläche binden und folglich liegt keine Dissoziation erster Ordnung mehr vor. Damit besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper nicht dissoziiert und Rückbindung auftritt. Trotz Ausdünnung der Oberfläche, die eine geringe Oberflächenbeladung mit dem Antigen gewährleistet, und einer hohen Flussrate von $30 \mu\text{l min}^{-1}$ sind die Bedingungen für eine Eins-zu-Eins-Interaktion nicht erfüllt. Die Abweichung von der Kinetik pseudo-erster Ordnung kann auf die Bivalenz des Antikörpers oder Inhomogenitäten der Oberfläche zurückzuführen sein.

Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstanten

Abbildung 4.12 zeigt die verwendeten Auswertemethoden der BIA. Mit verschiedenen

Methoden wird zunächst die scheinbare Ratenkonstante k_s aus der Assoziationsphase der Messungen bestimmt. Die k_s -Bestimmung erfolgt über die Anpassung einer Exponentialfunktion (MnMolecular) und über Linearisierung mittels Ableitung und Integration. Dabei wird die Integration vorwärts und rückwärts durchgeführt. Aus dem exponentiellen Fit wird neben der scheinbaren Ratenkonstante k_s auch die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} erhalten, mit der über einen Scatchard-Plot die Affinitätskonstante K ermittelt wird. Aus der scheinbaren Ratenkonstante k_s werden bei linearer Auftragung die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante aus Steigung und y-Achsenabschnitt erhalten. Bei Auswertung der Dissoziationsphase wird über das Anpassen einer exponentiellen Zerfallsfunktion (ExpDecay) oder über eine Linearisierungsmethode die Dissoziationsratenkonstante k_d bestimmt. Aus Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante lässt sich die Affinitätskonstante errechnen.

Auswertung über die Ableitung Da bei der Kontrolle auf Vorliegen einer Kinetik pseudo-erster Ordnung festgestellt wurde, dass diese nur in einem Teil der Assoziationsphase erfüllt ist, wird zunächst die Auswertung über die Ableitung betrachtet. Dabei wird die Ableitung gegen die Beladung aufgetragen, siehe Abbildung 4.13.

Je höher die Antikörperkonzentration, desto größer ist der Betrag der Steigung. Die Auftragung der Ableitung gegen die Schichtdicke weist einen Knick für Ak 202 bei 0,5 nm, für Ak TU11 bei 0,6 nm und für Ak 8F9 bei 1,5 nm auf. Der Knick ist vor allem bei den höheren Antikörperkonzentrationen von 500 nM und 333 nM deutlich zu sehen. Vor dem Knick zeigen die Werte einen linear steil fallenden Bereich. Nach dem Knick fallen die Werte weniger steil. Die lineare Regression wird im Bereich der Beladung bis 0,5 nm für Ak 202, bis 0,6 nm für Ak TU11 und bis 1,5 nm für Ak 8F9 für alle Konzentrationen durchgeführt, um k_s als negative Steigung zu bestimmen. Dabei fällt auf, dass der Betrag der Steigung der höchsten Konzentration bei Ak TU11 am geringsten ist.

Die Linearität ist nur in einem bestimmten Schichtdickenbereich gegeben. Eine Kinetik pseudo-erster Ordnung liegt aufgrund der zwei Paratope des Antikörpers wahrscheinlich nicht vor. Der Knick in der Ableitung könnte auch auf verschiedenen leicht zugängliche Oberflächenplätze zurückzuführen sein. Aufgrund der Abweichung von der Linearität kann eine Kinetik pseudo-erster Ordnung nur bei Schichtdicken bis zu einem Grenzwert von 0,5 nm für Ak 202, 0,6 nm für Ak TU11 und 1,5 nm für Ak 8F9 angenommen werden. Daher werden die verschiedenen Auswertemethoden nur in diesem Bereich durchgeführt. Der geringste Betrag der Steigung bei höheren Antikörperkonzentrationen für Ak TU11 weist auf eine langsamere Assoziation hin.

Bei Massentransportlimitierung würden bei der Ableitung konstante Werte erhalten. Da dies in den Kurven nicht beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung an die Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die gemessenen Kurven enthalten somit relevante Informationen über die Kinetik der Reaktion und

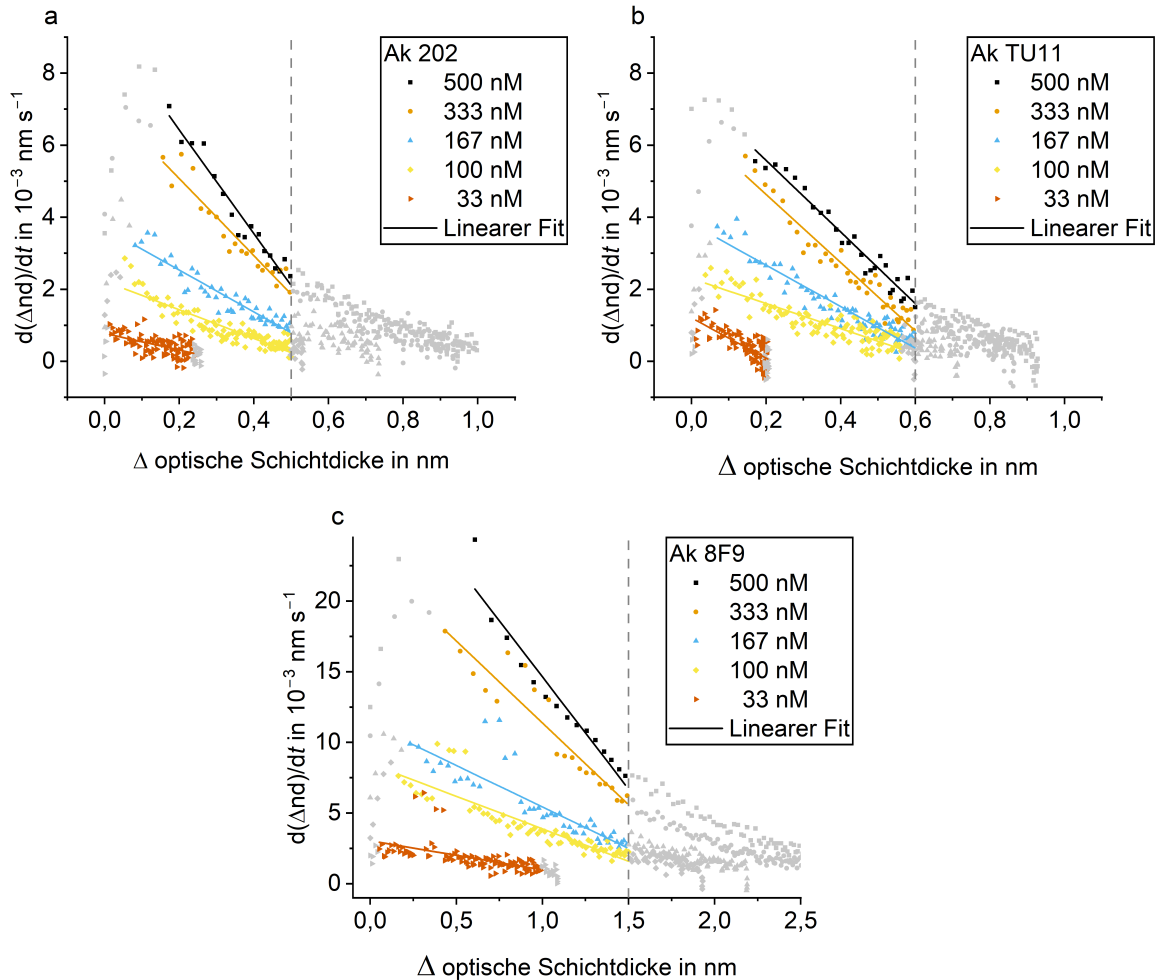


Abbildung 4.13: Auswertung der Assoziationsphase über die Ableitung. a) Beispielab-
 leitungen für anti-AMT Ak 202. Die lineare Anpassung wird 25s nach Start der Asso-
 ziationsphase begonnen und bis $\Delta nd < 0,5$ nm durchgeführt, die letzten 20 Werte der
 Assoziationsphase sind maskiert (grau). b) anti-AMT Ak TU11, lineare Anpassung bis
 $\Delta nd < 0,6$ nm c) anti-AMT Ak 8F9, lineare Anpassung bis $\Delta nd < 1,5$ nm.

erlauben die Bestimmung der Ratenkonstanten.

Auswertung über die Exponentialfunktion Aufgrund des in der Ableitung beob-
 achteten Knicks wird für die Auswertung über eine exponentielle Kurvenanpassung der
 gleiche Bereich ausgewählt. Abbildung 4.14 zeigt die Assoziationsphase der Messungen mit
 dem ausgewählten Bereich. Je höher die Antikörperkonzentration, desto stärker gekrümmt
 sind die Bindungskurven in der Assoziationsphase.

Auswertung über die Integration Für die Auswertung über die Integration wird der
 gleiche Bereich ausgewählt wie bei der Ableitungsmethode. Die Integration startet für
 vorwärts Integration bei Beginn der Assoziationsphase und für rückwärts Integration am
 Ende der Assoziationsphase. Die Auftragung zur Bestimmung von k_s aus der negativen

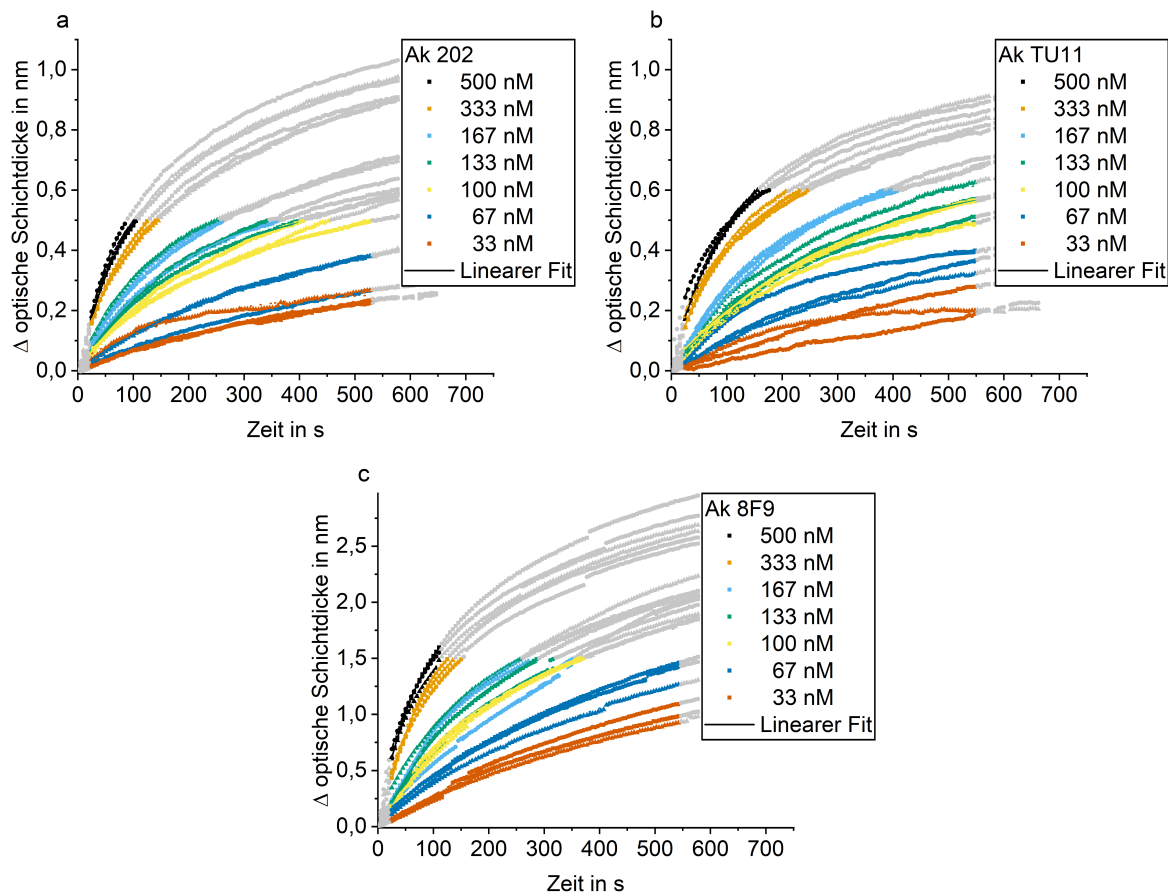


Abbildung 4.14: Auswertung der Assoziationsphase über exponentielle Kurvenanpassung. a) Assoziationsphase der Messungen von anti-AMT Ak 202, die Kurvenanpassung wird 25 s nach Start der Assoziationsphase begonnen und bis $\Delta nd < 0,5$ nm durchgeführt, die letzten 20 Werte der Assoziationsphase sind maskiert (grau). b) anti-AMT Ak TU11, Kurvenanpassung bis $\Delta nd < 0,6$ nm c) anti-AMT Ak 8F9, Kurvenanpassung bis $\Delta nd < 1,5$ nm.

Steigung ist in Abbildung 4.15 zu sehen.

Bei Ak TU11 in Abbildung 4.15 b) wird bei manchen Konzentrationen zu Beginn der Auftragung ein steiler Anstieg der Werte beobachtet. Bei der Rückwärtsintegration werden stark streuende Werte zu Beginn bei den drei Antikörpern beobachtet (Abbildung 4.15 d,e,f). Da diese nicht dem erwarteten Signalverlauf entsprechen, werden sie zur Bestimmung von k_s maskiert. Auch bei der Auswertung über die Ableitung und die Exponentialfunktion wurden die Anfangswerte maskiert, da hier Artefakte durch die Fluidik auftreten können. Wie aus den Ergebnissen für simulierte Daten hervorging, macht sich der Glättungseffekt der Integration stärker bemerkbar, je weiter die Integration voranschreitet. Daher kann es sinnvoll sein, die Anfangswerte zu maskieren.

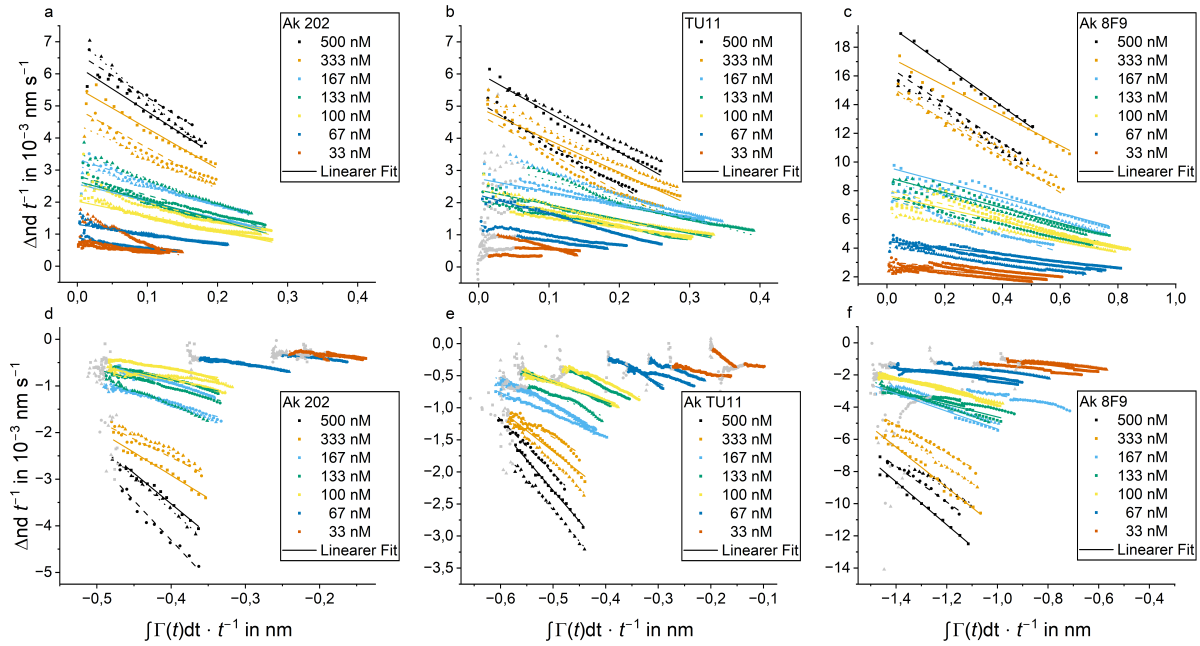


Abbildung 4.15: Auswertung der Assoziationsphase über Integration. a) Bestimmung von k_s über Integration vorwärts für anti-AMT Ak 202, b) anti-AMT Ak TU11, c) anti-AMT Ak 8F9, d) Bestimmung von k_s über Integration rückwärts für anti-AMT Ak 202 e) anti-AMT Ak TU11 und f) anti-AMT Ak 8F9.

k_s -Linearisierung

Aus den über verschiedene Methoden erhaltenen k_s werden unter Verwendung der bekannten Antikörper-Konzentrationen die Assoziationsratenkonstante k_a und die Dissoziationsratenkonstante k_d nach Gl. (2.5) bestimmt. Abbildung 4.16 zeigt die Auftragung von k_s gegen die Konzentration. Die Assoziationsratenkonstante k_a entspricht der Steigung aus der linearen Regression und k_d dem Y-Achsenabschnitt.

Bei den Antikörpern 202 und TU11 wird die steilste Gerade bei über vorwärts Integration berechneten k_s erhalten und die geringste Steigung bei über rückwärts Integration berechneten k_s . Bei Antikörper 202 werden bei der Bestimmung von k_s aus der Krümmung einer Exponentialfunktion und über die Ableitung sehr ähnliche Werte erhalten. Im Gegensatz dazu wird bei Antikörper 8F9 bei vorwärts und rückwärts Integration im Rahmen der Standardabweichung die gleiche Steigung erhalten. Zudem wird bei Antikörper 8F9 die größte Steigung bei der Auswertung über die Ableitung und die geringste Steigung bei Auswertung über die Exponentialfunktion erhalten. Im Rahmen der Standardabweichung überlappen alle berechneten k_s . Die erhaltenen k_d sind größer als Null und kleiner als alle berechneten k_s , was ein Kriterium für die Annahme einer Eins-zu-Eins-Interaktion ist^[104]. Damit liefern die aus dem Y-Achsenabschnitt erhaltenen k_d ein sinnvolles Ergebnis.

Abbildung 4.17 stellt die aus k_s -Linearisierung erhaltenen Assoziationsratenkonstanten k_a dar. Für Ak 202 liegen die bestimmten Assoziationsratenkonstanten zwischen

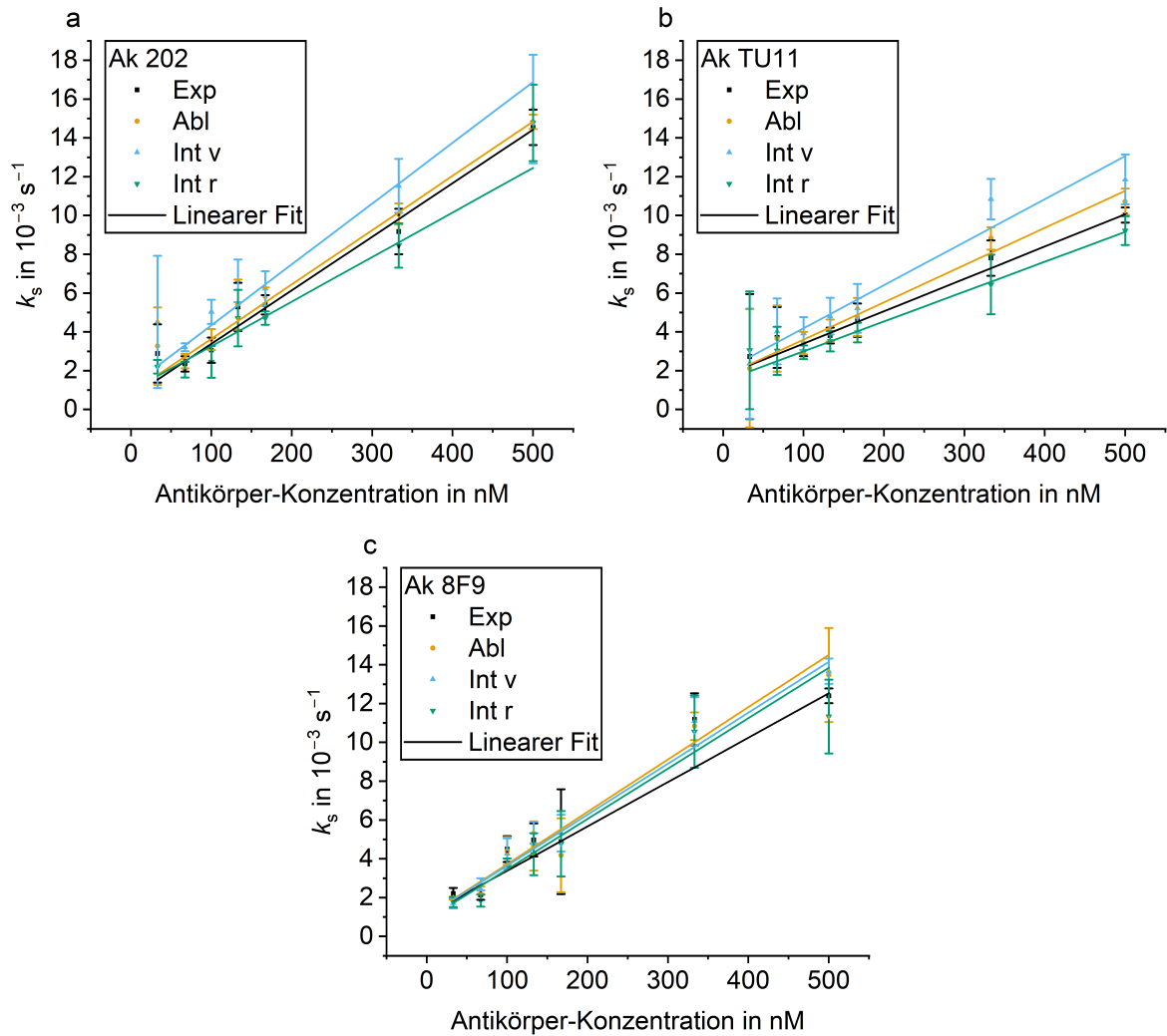


Abbildung 4.16: k_s -Linearisierung für Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9. Bestimmung von k_a und k_d aus k_s , k_s wird mit verschiedenen Methoden bestimmt: über die Anpassung einer Exponentialfunktion (Exp), über die Ableitung (Abl), über Integration vorwärts (Int v) und Integration rückwärts (Int r) für a) anti-AMT Ak 202, b) für anti-AMT Ak TU11 und c) für anti-AMT Ak 8F9. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.3 aufgeführt.

$(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei rückwärts Integration und $(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei vorwärts Integration. Dabei ist auffällig, dass über die Exponentialfunktion, die Ableitung und vorwärts Integration innerhalb der Standardabweichung der gleiche Wert für die Assoziationsratenkonstante erhalten wird und nur der über die rückwärts Integration berechnete Wert deutlich geringer ausfällt. Dies deutet darauf hin, dass die Auswertung über die rückwärts Integration bei den realen Messungen zu einer Verfälschung des Ergebnisses führt. Bei Ak TU11 liegen die bestimmten Assoziationsratenkonstanten zwischen $(1,54 \pm 0,05) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei rückwärts Integration und $(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei vorwärts Integration und bei Ak 8F9 zwischen $(2,29 \pm 0,15) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Berechnung über die Exponentialfunktion und $(2,7 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Berechnung über die Ablei-

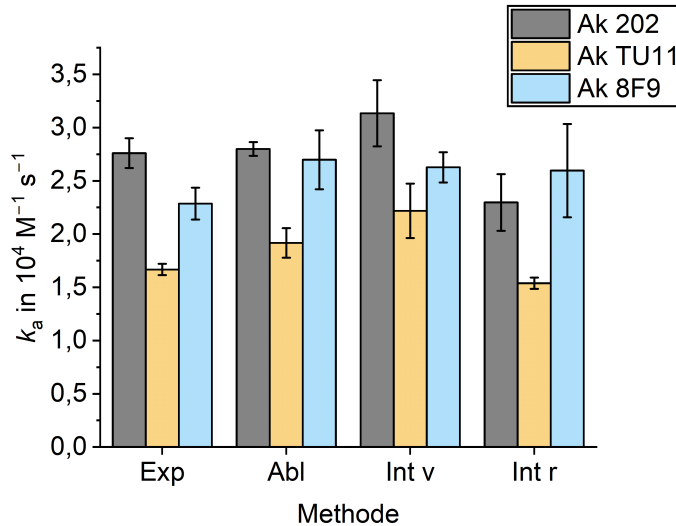


Abbildung 4.17: Assoziationsratenkonstanten für anti-AMT Ak 202, TU11 und 8F9. Bestimmung von k_a aus k_s , wobei k_s mit verschiedenen Methoden bestimmt wird, über Anpassung einer Exponentialfunktion (Exp), über die Ableitung (Abl), über Integration vorwärts (Int v) und Integration rückwärts (Int r). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Fits an.

tung. Insgesamt liegen die ermittelten Assoziationsratenkonstanten bei allen Methoden für Ak 202 und Ak 8F9 höher als für Ak TU11. Der größte Unterschied zwischen Ak 202 und Ak TU11 wird bei der Auswertung über die Exponentialfunktion beobachtet mit $(2,76 \pm 0,14) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Ak 202 und $(1,67 \pm 0,05) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Ak TU11. Bei der Auswertung über die Exponentialfunktion liegt Ak 8F9 mit einer Assoziationsratenkonstanten von $(2,29 \pm 0,15) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zwischen Ak 202 und Ak TU11.

Ak 202 bindet je nach Auswertemethode 1,4 bis 1,7mal schneller an das auf der Oberfläche immobilisierte Nortriptylin (NRT) als Ak TU11 und Ak 8F9 1,2 bis 1,7mal schneller als Ak TU11. Abgesehen von der Auswertung über die rückwärts Integration werden für Ak 202 höhere Assoziationsratenkonstanten als für Ak 8F9 erhalten. Da für einen LFA eine schnelle Assoziation des Antikörpers erwünscht ist, wäre Ak 202 am besten geeignet. Eine geringe Dissoziationsratenkonstante ist für einen LFA wichtig, daher wird diese im Folgenden ermittelt.

Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten

Die Simulationen zeigten bereits, dass die Bestimmung von k_d aus dem Y-Achsenabschnitt unzuverlässig ist. Daher wird zusätzlich die Dissoziationsphase der Messung ausgewertet. Im Bereich der Bindungskurve von 650 s bis 1500 s wird eine nichtlineare Kurvenanpassung als globaler Fit der Dissoziationsphase durchgeführt (Abbildung 4.18).

Bei einer Messung von 500 nM anti-AMT Ak 202 trat eine leichte Verschiebung der Messwerte nach oben im Bereich von 818 - 973 s auf. Hier geriet eine kleine Luftblase

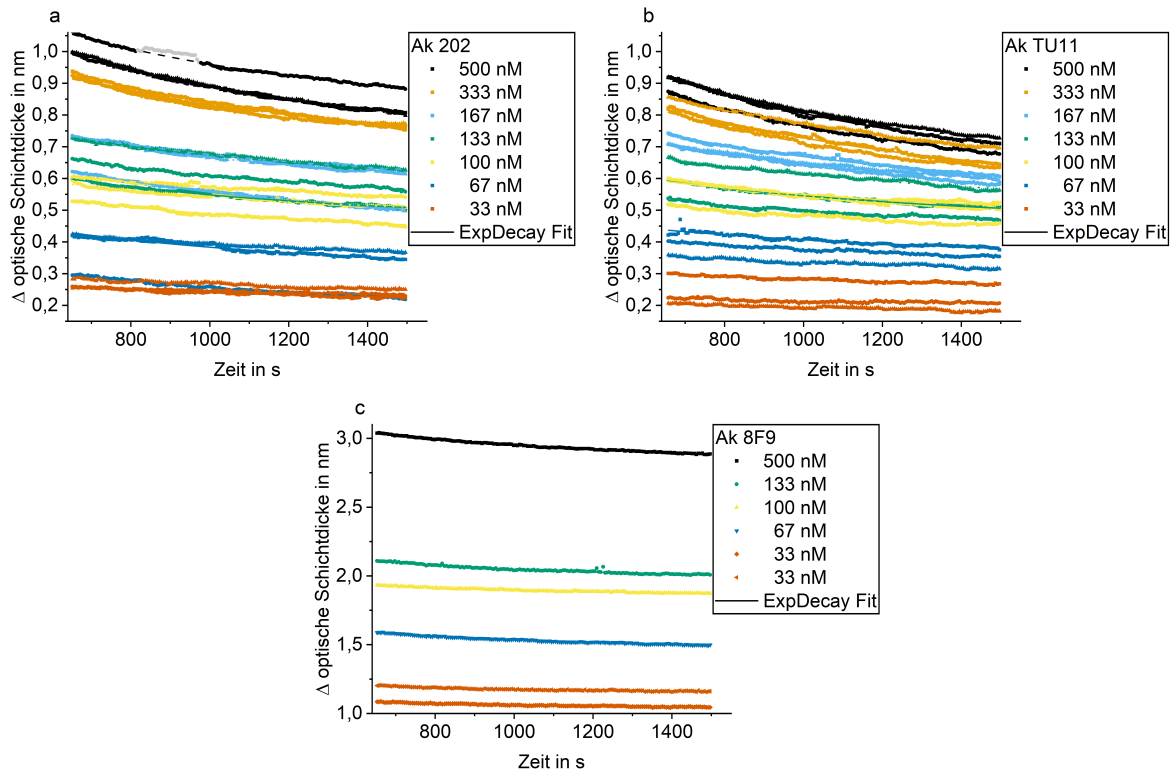


Abbildung 4.18: Bestimmung von k_d über nichtlineare Kurvenanpassung. Auswertung der Dissoziationsphase unter der Annahme, dass Rückbindung vorliegt, für a) anti-AMT Ak 202, b) anti-AMT Ak TU11 und c) anti-AMT Ak 8F9.

in die Flusszelle, die eine leichte Veränderung des Brechungsindex bewirkte. Daher wurden diese Messwerte bei der Bestimmung von k_d maskiert. Bei den Messungen von anti-AMT Ak 8F9 traten bei Beginn der Dissoziation häufig Luftblasen auf, daher wurden nur die Messungen für die Auswertung der Dissoziationsphase herangezogen, in denen keine Luftblasen auftraten.

Der ermittelte Y-Offset, der Rückbindung in das Modell einbezieht, liegt für Ak 202 zwischen $(0,222 \pm 0,012)$ nm bei der kleinsten Konzentration 33 nM und $(0,75 \pm 0,05)$ nm bei der höchsten Konzentration von 500 nM. Für Ak TU11 liegt der Y-Offset zwischen $(0,21 \pm 0,04)$ nm und $(0,60 \pm 0,02)$ nm. Für Ak 8F9 liegt der Y-Offset zwischen $(1,09 \pm 0,08)$ nm und $(2,845 \pm 0,002)$ nm. Allerdings wurden bei Ak 8F9 deutlich weniger Messungen in die Auswertung der Dissoziationsphase mit einbezogen (sechs) im Gegensatz zu 21 bei den anderen Antikörpern. Zusätzlich wurde Ak 8F9 auf einer anderen Charge Transducer gemessen und zeigte darauf eine deutlich stärkere Zunahme der optischen Schichtdicke als die anderen beiden Antikörper. Bei Ak 202 und Ak TU11 war zum Start der Dissoziationsphase eine ähnliche optische Schichtdicke erreicht.

Unter der Annahme, dass keine Rückbindung vorliegt, ist eine Linearisierung der Kurven möglich und k_d wird als negative Steigung bestimmt (Abbildung 4.19). Hierbei werden die gleichen Werte wie bei der Auswertung über eine nichtlineare Kurvenanpassung

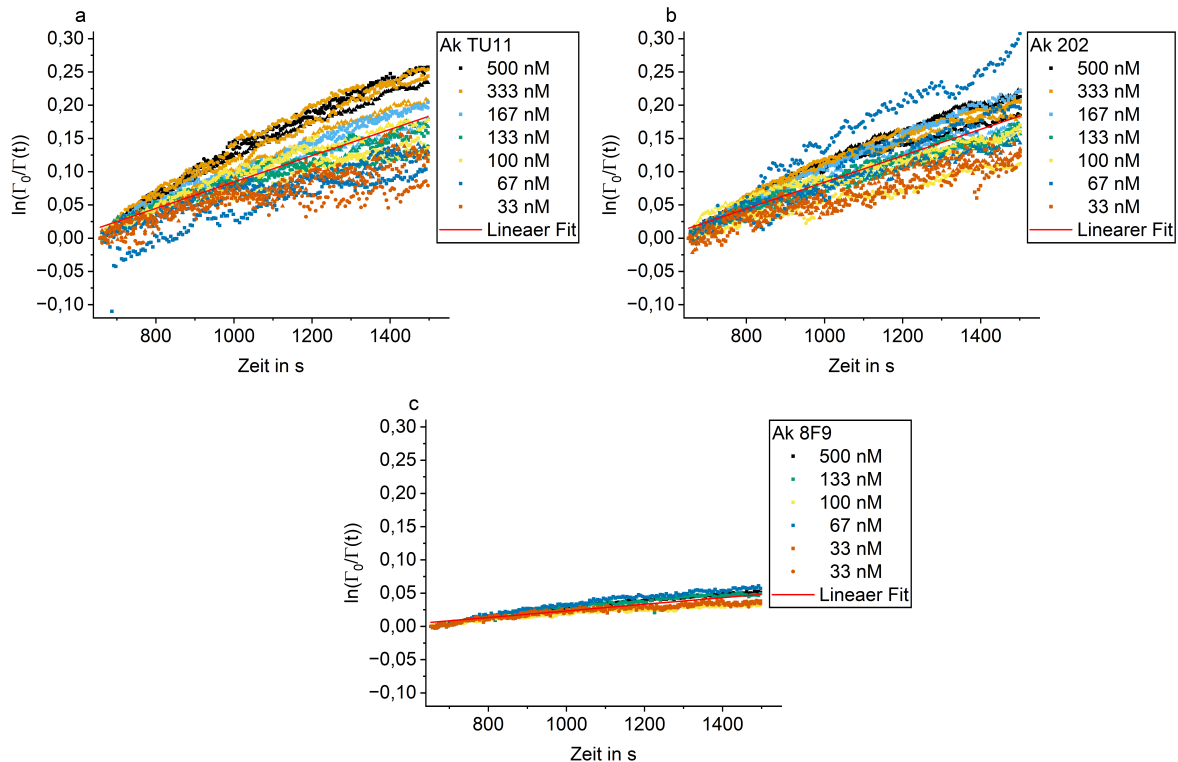


Abbildung 4.19: Bestimmung von k_d mittels Linearisierung. Auswertung der Dissoziationsphase unter der Annahme, dass keine Rückbindung vorliegt, für a) anti-AMT Ak 202, b) anti-AMT Ak TU11 und c) anti-AMT Ak 8F9. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.4 aufgeführt.

verwendet. Bei der Linearisierung der Dissoziationsphase in Abbildung 4.19 fällt auf, dass die Daten eine leichte Krümmung aufweisen und damit von der erwarteten Linearität leicht abweichen. Zudem weist Ak 8F9 bei dieser Auswertung eine deutlich geringere Steigung auf als Ak 202 und Ak TU11 und damit eine geringere Dissoziationsratenkonstante.

Bei Auftragung von $\ln(\Gamma_0/\Gamma(t))$ gegen die Zeit ist der Verlauf linear, wenn eine Kinetik erster Ordnung vorliegt. Bei der Dissoziation eines Antikörpers von der Oberfläche ist dies nur gegeben, wenn der Abstand zwischen den Antigenen auf der Oberfläche so groß ist, dass ein Antikörper nicht mit beiden Paratopen anbindet. Die Abweichung von der Kinetik erster Ordnung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Oberflächenbeladung mit Antigenen zu hoch ist, sodass der Antikörper mit beiden Paratopen anbinden kann. Für eine Dissoziation des Antikörpers müssten sich beide Paratope lösen, womit keine Kinetik erster Ordnung angenommen werden kann.

Da der exponentielle Zerfall der Kurve bei hohen Konzentrationen am stärksten ausgeprägt ist und Rückbindung nahe der Maximalbeladung weniger wahrscheinlich ist, kann es sinnvoll sein, die Ermittlung von k_d nur mit der höchsten Konzentration durchzuführen (Abbildung 4.20). Aufgrund von Luftblasen in den Messungen wird bei Ak 8F9 nur eine der drei 500 nM Messungen in die Auswertung der Dissoziationsphase

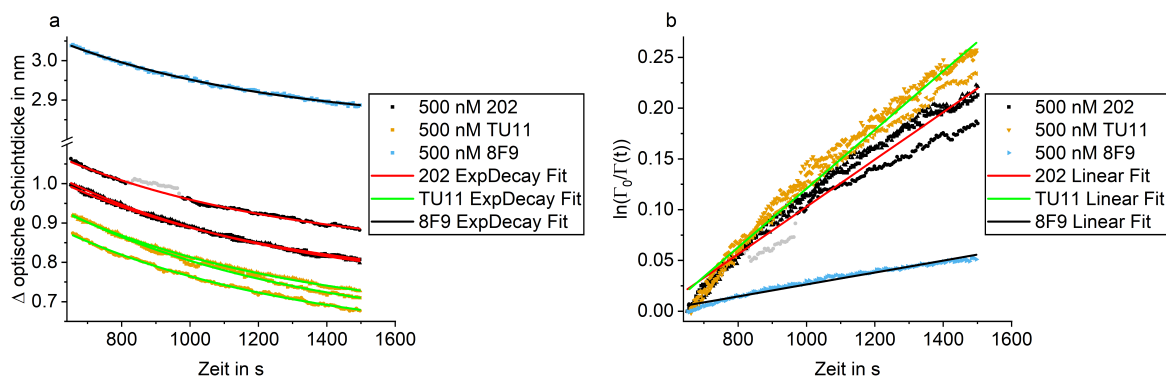


Abbildung 4.20: Bestimmung von k_d aus der Dissoziationsphase von 500 nM Antikörper für anti-AMT Ak 202, anti-AMT Ak TU11 und anti-AMT Ak 8F9 a) über nichtlineare Kurvenanpassung unter der Annahme, dass Rückbindung vorliegt, b) mittels Linearisierung unter der Annahme, dass keine Rückbindung vorliegt. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.5 und A.6 aufgeführt.

einbezogen. Bei der Auswertung der Dissoziationsphase der höchsten Konzentration zeigt sich, dass die Exponentialfunktion den Verlauf der Kurven besser beschreibt als die lineare Regression nach Linearisierung.

Da bei der Ermittlung von k_d über die Anpassung einer Exponentialfunktion bei beiden Antikörpern und bei allen Konzentrationen ein deutlicher Y-Offset ermittelt wurde, scheint es, dass die Antikörper nicht vollständig dissoziieren und damit die Auswertung über die Exponentialfunktion die Realität besser beschreibt. Dies erklärt auch die Abweichungen von der Linearität bei der Linearisierungsmethode. Die Linearisierung ist nur zur Bestimmung von k_d geeignet, wenn keine Rückbindung vorliegt.

In Abbildung 4.21 sind die mit den verschiedenen Methoden berechneten k_d dargestellt. Die über k_s -Linearisierung der Assoziationsphase ermittelten k_d sind mit mindestens zehnfach größeren Standardfehlern behaftet als die über die Dissoziationsphase berechneten. Bei der Auswertung über den Y-Achsenabschnitt werden für k_d von Ak TU11 größere Werte erhalten als für Ak 202, bis zu 2,8fach höhere Werte im Falle der k_s -Bestimmung über die Exponentialfunktion. Für Ak 8F9 werden ähnliche k_d erhalten wie für Ak 202. Bei den Berechnungen von k_d aus der Dissoziationsphase werden für Ak202 und Ak TU11 sowohl bei Einbeziehung aller Konzentrationen, als auch bei der Verwendung nur der höchsten Konzentration von 500 nM ähnliche Werte erhalten. Ein großer Unterschied besteht zwischen der Verwendung der Exponentialfunktion und der Linearisierung. Mit der Exponentialfunktion werden bis zu siebenfach höhere Werte für k_d bei Ak 202 mit allen Konzentrationen im Vergleich zur Linearisierung erhalten. Für Ak 8F9 liegen die über die Auswertung der Dissoziationsphase über die Exponentialfunktion erhaltenen k_d in einem ähnlichen Bereich wie die der anderen Antikörper, während die über Linearisierung erhaltenen k_d von Ak 202 und TU11 viermal größer ausfallen.

Bei Betrachtung des Y-Achsenabschnitts der k_s -Linearisierung scheint Ak TU11 schnel-

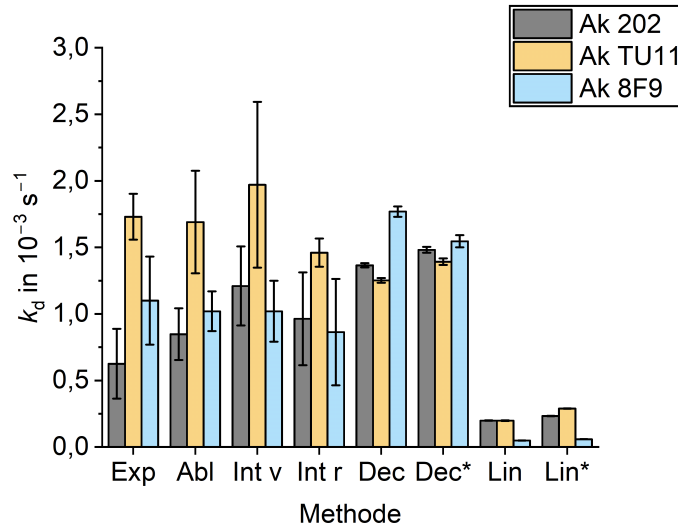


Abbildung 4.21: Dissoziationsratenkonstanten k_d für anti-AMT Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9. Bestimmung von k_d aus k_s , wobei k_s über verschiedene Methoden bestimmt wird: über die Anpassung einer Exponentialfunktion (Exp), über die Ableitung (Abl), über Integration vorwärts (Int v) und Integration rückwärts (Int r) während der Assoziationsphase und über eine Exponentialfunktion (Dec) und Linearisierung (Lin) während der Dissoziationsphase, *Auswertung für 500 nM anti-AMT Ak. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Fits an.

ler zu dissoziieren als Ak 202 und Ak 8F9, wohingegen bei Betrachtung der Dissoziationsphase mit Einbeziehung von Rückbindung Ak 8F9 geringfügig schneller dissoziiert. Die größeren Fehler bei einer Bestimmung von k_d aus k_s -Linearisierung sind darauf zurückzuführen, dass die Bestimmung über den Y-Achsenabschnitt generell unzuverlässig ist. Hier bestätigt sich, was sich bereits bei der Auswertung simulierter Daten zeigte. Die Auswertung der Dissoziationsphase ist genauer und besser zur Bestimmung von k_d geeignet. Ob in der Auswertung der Dissoziationsphase alle Konzentrationen oder nur die höchste Konzentration berücksichtigt wird, scheint keinen großen Unterschied zu machen. Ein bis zu siebenfacher Unterschied der k_d wird beim Vergleich der Auswertung der Dissoziationsphase über die Exponentialfunktion und Linearisierung beobachtet. Bei Auswertung der Dissoziationsphase über die Linearisierung wird eine deutlich geringere Dissoziationsratenkonstante erhalten als über die anderen Auswertemethoden.

Der große Unterschied liegt darin, dass die Anpassung über die Exponentialfunktion über den Y-Offset Rückbindung des Antikörpers erlaubt, sodass der Antikörper nicht vollständig dissoziieren muss. Die erhaltenen Fehler liefern keine Hinweise darauf, ob Rückbindung vorliegt. Für beide Annahmen können k_d bestimmt werden. Allerdings zeigt sich in der Linearisierung, dass die Daten von der erwarteten Linearität abweichen und eine leichte Krümmung aufweisen. Dies spricht dafür, dass die Voraussetzungen zur Bestimmung von k_d über die Linearisierung nicht erfüllt sind, möglicherweise durch Rückbindung. Die Exponentialfunktion mit Rückbindung scheint die Kurven besser zu beschreiben. Bei dieser

Auswertemethode liegen die Affinitätskonstanten in einem ähnlichen Bereich. Ak 8F9 dissoziiert 1,4mal schneller als Ak TU11 und Ak 202 liegt dazwischen.

Bestimmung der Affinitätskonstante

Die Affinitätskonstante kann sowohl aus den Ratenkonstanten als auch aus der Gleichgewichtsbeladung über einen Scatchard-Plot (Abbildung 4.22) berechnet werden. Die Auftragung nach Scatchard erlaubt die direkte Bestimmung der Affinitätskonstanten aus der Gleichgewichtsbeladung, wobei jedoch nur Informationen über die Thermodynamik und nicht über die Kinetik der Reaktion erhalten werden. Die nichtlineare Kurvenanpassung mit einer Exponentialfunktion liefert die Gleichgewichtsbeladung. In Verbindung mit der bekannten Antikörper-Konzentration wird über einen Scatchard-Plot die Affinitätskonstante aus der negativen Steigung bestimmt.

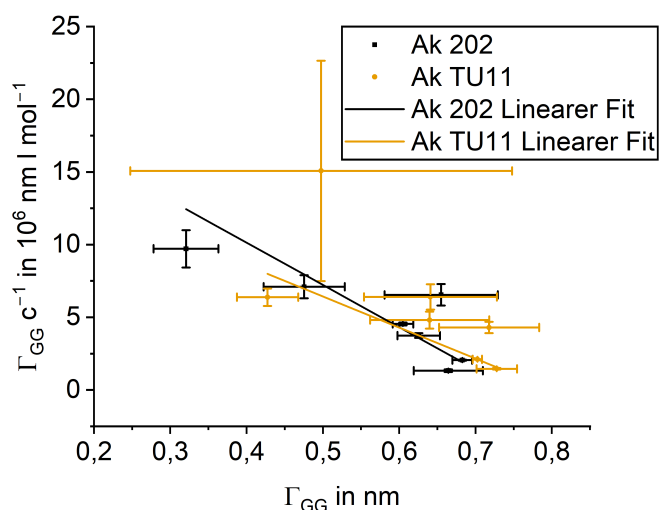


Abbildung 4.22: Bestimmung der Affinitätskonstante über Scatchard-Plot für Ak 202 und Ak TU11. Die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} wird über die Exponentialfunktion bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Fits an. Die Fit-Parameter sind in Tabelle A.7 aufgeführt.

Auffällig sind die großen Standardfehler, die bei der Bestimmung der Gleichgewichtsbeladung auftreten. Bei der kleinsten Konzentration von Ak TU11 (33 nM) liegt der relative Fehler bei 50%. Die anderen Konzentrationen weisen relative Fehler der Gleichgewichtsbeladung von maximal 14% auf. Die lineare Regression ergibt für Ak 202 eine betragsmäßig größere Steigung als für Ak TU11. Für Ak 8F9 ist eine Auswertung über den Scatchard-Plot nicht möglich. Hier müssten Messungen mit längerer Assoziationsphase durchgeführt werden, um die Gleichgewichtsbeladung daraus zu bestimmen.

Die großen Fehler bei 33 nM Ak TU11 sind darauf zurückzuführen, dass die Kurven bei kleinen Konzentrationen schlechter reproduzierbar waren. Trotz der hohen Standardfehler lassen sich über den Scatchard-Plot die Affinitätskonstanten berechnen. Die größere

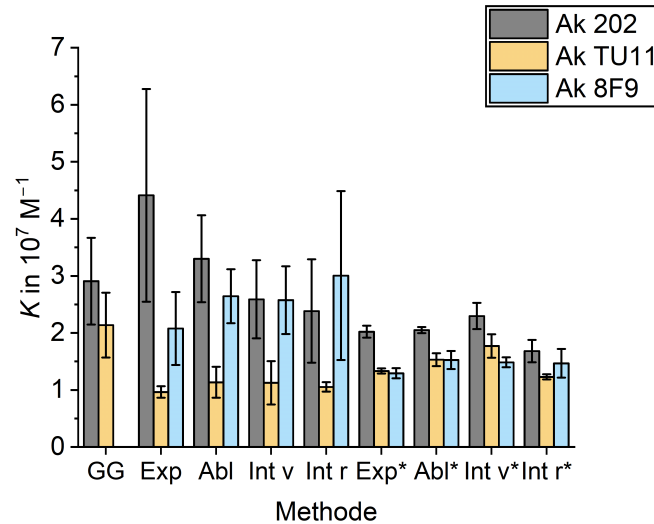


Abbildung 4.23: Affinitätskonstanten für anti-AMT Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9. Die Affinitätskonstante K wird mit verschiedenen Methoden ermittelt. GG: Bestimmung von K über Scatchard-Plot aus der Gleichgewichtsbeladung; Exp, Abl, Int v, Int r: Bestimmung von K aus k_a und k_d aus k_s -Linearisierung, k_s bestimmt über die Anpassung einer Exponentialfunktion (Exp), über die Ableitung (Abl), über Integration vorwärts (Int v) und Integration rückwärts (Int r) während der Assoziationsphase. *Bestimmung von k_d über eine nichtlineare Kurvenanpassung (Exponentialfunktion) während der Dissoziationsphase unter der Annahme, dass Rückbindung vorliegt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Fits an.

negative Steigung von Ak 202 zeigt, dass dieser eine höhere Affinitätskonstante aufweist. Abbildung 4.23 zeigt die berechneten Affinitätskonstanten der Antikörper. Ak TU11 weist bei den Auswertungen über k_s -Linearisierung die geringste Affinitätskonstante auf. Bei Einbeziehung der Dissoziationsphase weisen Ak TU11 und Ak 8F9 ähnliche Affinitätskonstanten auf, die kleiner sind als die von Ak 202.

In Tabelle 4.2 sind alle berechneten Konstanten zusammengefasst. Aus den Erkenntnissen der Simulationen folgt, dass die Berechnung der Assoziationsratenkonstante über die vorwärts Integration bei verrauschten Daten ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Bei Vergleich dieses Werts für die drei Antikörper weist Ak 202 mit $(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ die höchste Assoziationsratenkonstante auf. Für die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante ist die Auswertung der Dissoziationsphase über Anpassung einer Exponentialfunktion am besten geeignet. Hier zeigt sich, dass Ak 8F9 mit $(1,77 \pm 0,04) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ am schnellsten dissoziiert, während Ak 202 und Ak TU11 ähnliche Werte aufweisen. Da Ak 202 die größere Assoziationsratenkonstante und Affinität mit einer langsamen Dissoziationsratenkonstante aufweist, wird dieser für die Entwicklung eines LFAs ausgewählt.

Tabelle 4.2: Vergleich der Konstanten. Aufgeführt sind die erhaltenen Raten- und Affinitätskonstanten für die Bindung von anti-AMT Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9 an PEG-immobilisiertem NRT. Bei Scatchard wird K über einen Scatchard-Plot berechnet, wobei die Gleichgewichtsbeladung über eine nichtlineare Kurvenanpassung (Exponentialfunktion) der Assoziationsphase berechnet wird, bei Exp wird k_s aus der Krümmung einer angepassten Exponentialfunktion, bei Abl nach Linearisierung über die Ableitung, bei Int nach Linearisierung durch Integration vorwärts (Int v) und rückwärts (Int r) erhalten. Diss: Bestimmung von k_d über eine nichtlineare Kurvenanpassung (Exponentialfunktion) während der Dissoziationsphase mit Rückbindung.

Antikörper	Methode	k_a in $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_d in 10^{-3} s^{-1}	K in 10^7 M^{-1}
Ak 202	Scatchard			$2,9 \pm 0,8$
	Exp	$2,76 \pm 0,14$	$0,6 \pm 0,3$	$4,4 \pm 1,9$
	Abl	$2,80 \pm 0,06$	$0,8 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,8$
	Int v	$3,1 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,7$
	Int r	$2,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,9$
	Exp / Diss	$2,76 \pm 0,14$	$1,365 \pm 0,016$	$2,02 \pm 0,10$
	Abl / Diss	$2,80 \pm 0,06$	$1,365 \pm 0,016$	$2,05 \pm 0,05$
	Int v / Diss	$3,1 \pm 0,3$	$1,365 \pm 0,016$	$2,3 \pm 0,2$
	Int r / Diss	$2,3 \pm 0,3$	$1,365 \pm 0,016$	$1,7 \pm 0,2$
Ak TU11	Scatchard			$2,1 \pm 0,6$
	Exp	$1,67 \pm 0,05$	$1,73 \pm 0,17$	$0,96 \pm 0,10$
	Abl	$1,92 \pm 0,14$	$1,7 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,3$
	Int v	$2,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,4$
	Int r	$1,54 \pm 0,05$	$1,46 \pm 0,11$	$1,05 \pm 0,08$
	Exp / Diss	$1,67 \pm 0,05$	$1,252 \pm 0,017$	$1,33 \pm 0,05$
	Abl / Diss	$1,92 \pm 0,14$	$1,252 \pm 0,017$	$1,53 \pm 0,11$
	Int v / Diss	$2,2 \pm 0,3$	$1,252 \pm 0,017$	$1,8 \pm 0,2$
	Int r / Diss	$1,54 \pm 0,05$	$1,252 \pm 0,017$	$1,23 \pm 0,05$
Ak 8F9	Exp	$2,29 \pm 0,15$	$1,1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,6$
	Abl	$2,7 \pm 0,3$	$1,02 \pm 0,15$	$2,6 \pm 0,5$
	Int v	$2,63 \pm 0,14$	$1,0 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,6$
	Int r	$2,6 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,4$	$3,0 \pm 1,5$
	Exp / Diss	$2,29 \pm 0,15$	$1,77 \pm 0,04$	$1,29 \pm 0,09$
	Abl / Diss	$2,7 \pm 0,3$	$1,77 \pm 0,04$	$1,53 \pm 0,16$
	Int v / Diss	$2,63 \pm 0,14$	$1,77 \pm 0,04$	$1,49 \pm 0,09$
	Int r / Diss	$2,6 \pm 0,4$	$1,77 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,3$

4.1.3 Vergleich der Auswertung simulierter und realer Messungen

Mit den Simulationen wurden Bindungskurven für ideale Messungen mit Annahme einer Eins-zu-Eins-Interaktion zwischen Antikörper und immobilisiertem Antigen berechnet. Diese wurden mit einem relativ hohen Rauschen versehen, um zu überprüfen, wie robust sich die Auswertemethoden verhalten. Die gleichen Auswertemethoden wurden auch auf real

gemessene Bindungskurven angewandt, da hier noch weitere Effekte beispielsweise durch die Fluidik auftreten können. Dieses Vorgehen ermöglichte eine umfassende Bewertung der Algorithmen.

Die Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstanten k_s erfolgte über die Ableitung, Integration und eine exponentielle Kurvenanpassung. Bei den simulierten Kurven wurde dabei festgestellt, dass die Ableitung das Rauschen verstärkte, während die Integration einen Glättungseffekt bewirkte. Daher war bei starkem Rauschen die Integration die Auswertemethode der Wahl. Bei realen Messungen ließ sich das Rauschen durch die experimentellen Bedingungen verringern, sodass bei den vorliegenden Messungen auch die Auswertung über die Ableitung möglich war.

Bei Überprüfung der realen Messungen auf Vorliegen einer 1:1 Kinetik wurde festgestellt, dass diese nicht für die gesamten Bindungskurven angenommen werden konnte. Jedoch lag für den Anfang der Assoziationsphase ein linearer Verlauf bei Betrachtung der Ableitung vor, sodass bis zum Erreichen einer bestimmten Schichtdicke, eine Auswertung analog zu den simulierten Bindungskurven durchgeführt werden konnte. Die Abweichungen von einer Kinetik pseudo-erster Ordnung lagen wahrscheinlich darin begründet, dass trotz Ausdünnung der Oberfläche die Antikörpermoleküle mit beiden Paratopen an die Antigene auf der Oberfläche anbinden konnten. Weitere Effekte könnten durch die Avidität des Antikörpers oder Inhomogenitäten der Oberfläche auftreten. Trotz der Abweichung von der erwarteten Linearität in der Ableitung entsprach der Signalverlauf der Assoziationsphase bei Auswertung über die Ableitung bis zu einer bestimmten Schichtdicke dem Verlauf einer Kinetik pseudo-erster Ordnung. Daher wurde dieser Bereich mit den verschiedenen Algorithmen ausgewertet.

Wie auch bei Auswertung der simulierten Kurven konnten die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante mit allen Methoden bestimmt werden. Bei der Auswertung der simulierten Kurven wurde festgestellt, dass eine Verringerung des Auswertebereichs die Fehler erhöht. Daher sollte der Auswertebereich so groß wie möglich gewählt werden. Auch wenn je nach Methode bei den realen Messungen Unterschiede von bis zu 30 % zwischen den bestimmten Assoziationsratenkonstanten lagen, konnte der Antikörper 202 als der mit der schnellsten Assoziationsratenkonstante identifiziert werden.

Für die Berechnung von der Dissoziationsratenkonstante wurde die Bestimmung über k_s -Linearisierung und die Auswertung der Dissoziationsphase betrachtet. Bei den Simulationen wurde festgestellt, dass die Bestimmung über k_s -Linearisierung ungenau und die Auswertung der Dissoziationsphase besser geeignet war. Auch bei den realen Messungen wurden bei Auswertung über k_s -Linearisierung zehnmal höhere Standardfehler als bei Auswertung der Dissoziationsphase erhalten. Die Linearisierung der Dissoziationsphase führte bei den simulierten Bindungskurven zu den Dissoziationsratenkonstanten mit größter Genauigkeit. Bei den realen Messungen wurde beobachtet, dass keine vollständige Dissoziation stattfindet. Daher beschrieb die exponentielle Zerfallsfunktion den Verlauf

der Dissoziationsphase besser, während bei der Linearisierung gekrümmte Kurven erhalten wurden. Die Linearisierung kann nur bei einer vollständigen Dissoziation angewandt werden. Die Ergebnisse der realen Messungen zeigten, dass sich die Dissoziationsratenkonstanten der drei untersuchten Antikörper bei Auswertung über die Exponentialfunktion kaum unterschieden. Der Antikörper 8F9 dissoziierte am schnellsten, was für die Durchführung eines Bindungshemmtests ein Nachteil wäre. Der Antikörper TU11 wäre mit der kleinsten Dissoziationsratenkonstante besser geeignet.

Die Auswertung über den Scatchard-Plot wurde für die Bestimmung der Affinitätskonstante herangezogen. Dieser war sowohl für die simulierten als auch für die gemessenen Bindungskurven ungeeignet, da die Bestimmung der Gleichgewichtsbeladung über die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Assoziationsphase mit einem großen Fehler behaftet war. Dies lag daran, dass die Assoziationsphase für die vorliegende Kinetik zu kurz gewählt war, um die Gleichgewichtsbeladung zuverlässig zu bestimmen. Die Affinitätskonstante konnte dennoch über die Assoziationsratenkonstante aus k_s -Linearisierung und die Dissoziationsratenkonstante aus der Dissoziationsphase bestimmt werden. Der Antikörper 202 wies die höchste Affinität auf und wurde daher für die Entwicklung des LFAs ausgewählt.

4.2 Vergleich der Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugate

Um den ausgewählten Antikörper Klon 202 als Erkennungsstruktur auf dem Konjugat-Pad in einem LFA zu verwenden, muss dieser markiert werden. Als Markierung werden Goldnanopartikel (AuNP) ausgewählt, da diese günstig, inert und stabil sind sowie eine intensiv rote Farbe aufweisen^[60,69]. Es gibt viele Möglichkeiten, Antikörper an Goldoberflächen anzubinden^[71,84]. Diese lassen sich unterteilen in direkte Anlagerung des Antikörpers an die Goldoberfläche über Physisorption und Anbindung über einen Linker mittels Chemisorption. Bei der Direktbeschichtung bzw. Physisorption wird der Antikörper über eine dative Bindung zwischen den Schwefelatomen des Antikörpers und der Goldoberfläche angelagert. Dabei kann der Antikörper entweder unverändert verwendet werden oder es werden im Antikörper freie Thiolgruppen durch Reduktion der Disulfidbrücken erzeugt. Die Reduktion kann über Aktivierung mit UV-Licht oder mit einem milden Reduktionsmittel wie Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) oder 2-Mercaptoethylamin (MEA) erfolgen. Bei der Anbindung über einen Linker kann zwischen der kovalenten Bindung und der Bindung über biomolekulare Wechselwirkungen unterschieden werden. Für die kovalente Anbindung eignen sich Polyethylenglykol (PEG) oder Mercaptoundecansäure (MUA). Protein A/G oder die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung können für die Anbindung über biomolekulare Wechselwirkung genutzt werden. In dieser Arbeit werden die verfügbaren Methoden untersucht. In ersten Vorversuche zeigen die Anbindung nach Reduktion mit MEA, die kovalente Anbindung mit MUA und die Verwendung von Protein A/G keine erfolgversprechenden Ergebnisse. Daher werden im Detail folgende Konjugatsynthesen verglichen: Direktbeschichtung des unveränderten Antikörpers in PBS und TRIS, Direktbeschichtung mit UV-aktiviertem Antikörper, Direktbeschichtung mit TCEP-reduziertem Antikörper, kovalente Anbindung über PEG-Linker und Anbindung des biotinylierten Antikörpers über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. Zusätzlich wurde bei der Firma Microcoat die Herstellung eines Konjugats über Direktbeschichtung in Auftrag gegeben. Bei diesem Konjugat (DCM-C) wurde der monoklonale anti-AMT Ak 202 an AuNP (40 nm) angebunden.

4.2.1 Ausbeute der Konjugatsynthesen

Um die Ausbeute der Synthesen zu ermitteln, werden von den in Triplikaten hergestellten Konjugaten UV/Vis-Spektren aufgenommen. AuNP lassen sich über ihre Absorption charakterisieren, da sie lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz zeigen. Durch elektromagnetische Strahlung werden die Elektronen des Leitungsbandes zu gleichphasigen Schwingungen angeregt. Diese kollektiven Schwingungen der freien Elektronen werden als Plasmonen bezeichnet. Die lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz hängt von der

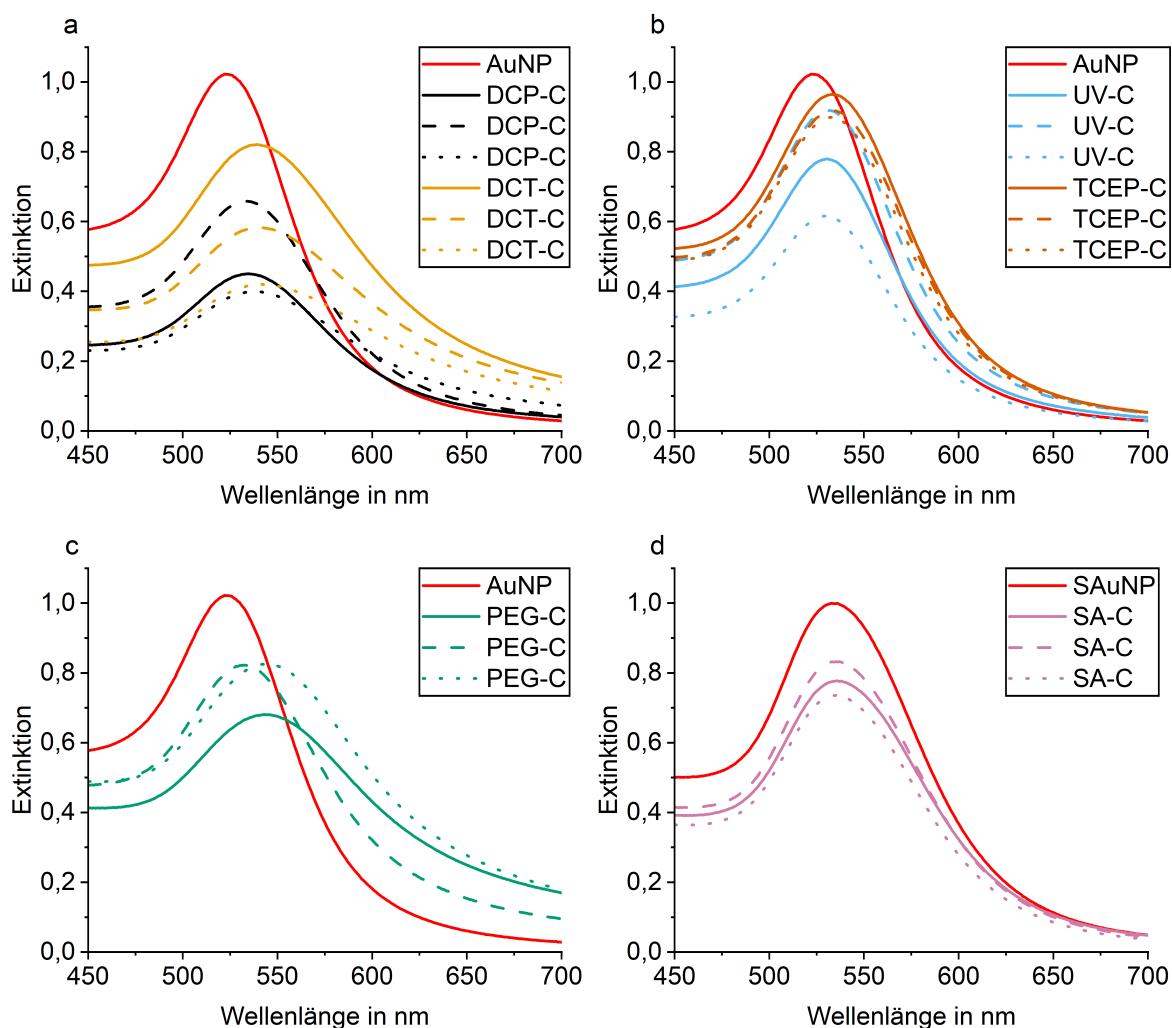


Abbildung 4.24: UV/Vis-Spektren der synthetisierten Konjugate und Ausgangsmaterial. a) Spektren der Konjugate DCP-C und DCT-C mit Ausgangsmaterial AuNP, b) UV-C und TCEP-C, c) PEG-C und d) SA-C mit Ausgangsmaterial SAuNP.

Größe und den Eigenschaften der Partikel ab. Durch Anbindung von Antikörpern an AuNP kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen, worüber sich Aussagen über die Dicke der angebondenen Schicht treffen lassen. Aus der Peakform lässt sich ableiten, ob Agglomeration auftritt. Zudem erlaubt die Höhe des Maximums im UV/Vis-Spektrum Aussagen über die Ausbeute der Synthesen. Abbildung 4.24 zeigt die UV/Vis-Spektren der einzelnen Konjugate im Vergleich zum Ausgangsmaterial AuNP oder Streptavidin-Goldnanopartikeln (SAuNP).

Die AuNP mit einem Durchmesser von 20 nm weisen eine starke Extinktion bei 522 nm auf. Bei Anbindung des Antikörpers verschiebt sich das Extinktionsmaximum zu höheren Wellenlängen. Bei DCP-C und DCT-C kommt es zudem zu einer Peakverbreiterung (Abbildung 4.24 a)), ebenso bei PEG-C (Abbildung 4.24 c)). Bei den Direktbeschichtungen mit modifiziertem Antikörper nach UV-Bestrahlung (254 nm) oder Reduktion mit TCEP

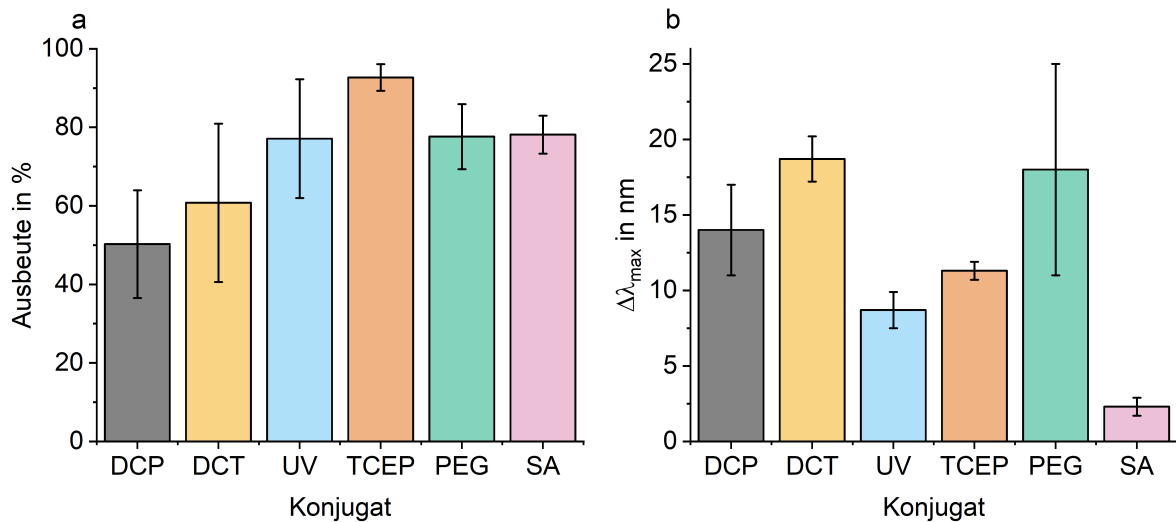


Abbildung 4.25: Ausbeute und Wellenlängenverschiebung der Konjugate. a) Ausbeute der Konjugatsynthesen bestimmt aus der maximalen Extinktion der UV/Vis-Spektren, b) Wellenlängenverschiebung des Extinktionsmaximums $\Delta\lambda_{\max}$ der verschiedenen Konjugate im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Die Balken zeigen den Mittelwert der drei Synthesen mit der Standardabweichung des Mittelwerts als Fehlerbalken.

bleibt die Peakform hingegen erhalten und eine kleine Verschiebung des Maximums tritt auf (Abbildung 4.24 b)). Bei der Anbindung des biotinylierten Antikörpers an SAuNP (40 nm), dessen Extinktionsmaximum bei 533 nm liegt, kommt es nur zu einer geringen Verschiebung des Maximums (Abbildung 4.24 d)).

In Abbildung 4.25 a) sind die aus den Maxima der UV/Vis-Spektren berechneten Ausbeuten der Konjugatsynthesen dargestellt. Hohe Ausbeuten werden bei UV-C, TCEP-C und SA-C erreicht, während bei DCP-C und DCT-C Verluste auftreten. Die beste Reproduzierbarkeit und Ausbeute wird bei TCEP-C erreicht.

Abbildung 4.25 b) zeigt die Verschiebungen der Maxima bei den Konjugatsynthesen. Hierbei ist auffällig, dass die Anbindung des biotinylierten Antikörpers an SAuNP zu einer sehr geringen Verschiebung führt. Bei DCP-C, DCT-C, und PEG-C treten die größten Peakverschiebungen auf. Die großen Fehlerbalken bei DCP-C und PEG-C zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit der Peakverschiebung bei diesen Synthesen an.

Alle Synthesen führen zu einer Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenlängen, was auf eine erfolgreiche Anbindung des Antikörpers hinweist. Die Verschiebung korreliert mit der Schichtdicke der angebondenen Antikörper. Eine große Peakverschiebung in Zusammenhang mit einer Peakverbreiterung wie bei DCP-C, DCT-C und PEG-C weist auf Agglomeration der Partikel hin. Die geringere Verschiebung bei SA-C kann damit zusammenhängen, dass das Ausgangsmaterial SAuNP ein Maximum bei höheren Wellenlängen aufweist, da es sich um doppelt so große Nanopartikel mit angebundenem Streptavidin handelt. Die Anbindung des Antikörpers an Streptavidin hat dadurch möglicherweise keinen so großen Einfluss auf die Resonanzfrequenz der Plasmonen wie die

direkte Anbindung von Proteinen an die Goldoberfläche.

Verluste bei der Synthese können bei den Waschschrritten auftreten durch Agglomeration der Nanopartikel durch die Zentrifugation oder durch Adsorption der Partikel an der Gefäßwand. Die hohe Ausbeute mit gut reproduzierbaren Spektren bei TCEP-C, UV-C und SA-C weist auf eine gute Stabilität dieser Konjugate hin.

4.2.2 Größe und Agglomeration der Konjugate

Um die Stabilität der Konjugate im Hinblick auf Agglomeration zu untersuchen, wird die Größe der Konjugate mit Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. DLS erlaubt die Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers von Nanopartikeln. Die einzelnen Konjugate wurden in Triplikaten vermessen und Abbildung 4.26 zeigt die erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser. Als Ausgangsmaterial für die Synthesen wurden AuNP

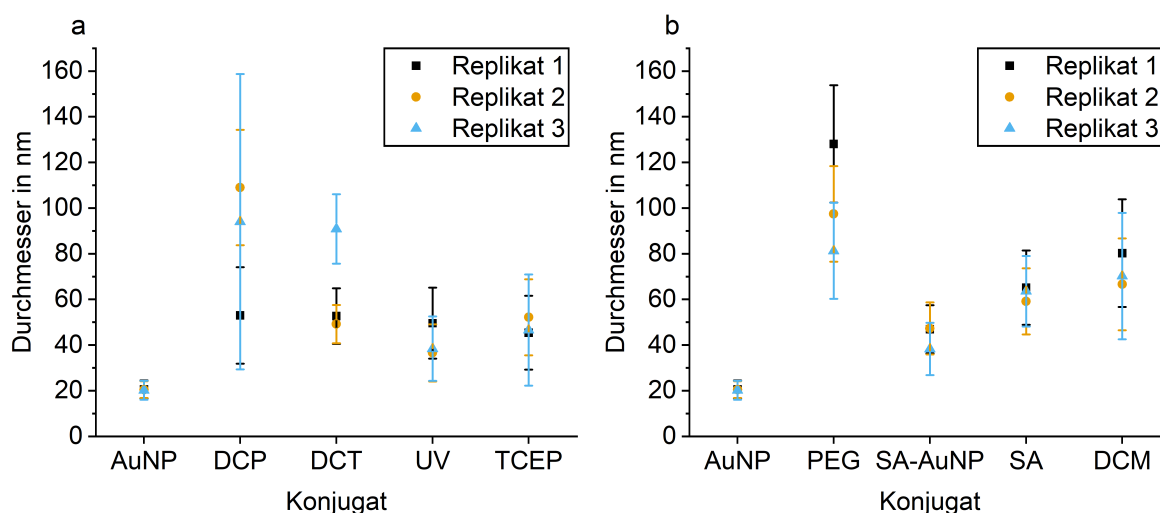


Abbildung 4.26: Hydrodynamischer Durchmesser der Konjugate. a) von DCP-C, DCT-C, UV-C und TCEP-C im Vergleich zum Ausgangsmaterial AuNP, b) von PEG-C im Vergleich zu AuNP, SA-C im Vergleich zu SAuNP und DCM-C. Aufgetragen ist das Durchschnittsergebnis von drei DLS-Messungen für jedes Konjugat, wobei die Fehlerbalken die jeweilige Standardabweichung angeben.

mit einem Durchmesser von 20 nm verwendet. Diese weisen einen hydrodynamischen Durchmesser von 22 nm auf. Die Größe der Partikel nimmt durch die Anbindung der Antikörper bei allen Synthesen zu. Bei DCP-C und PEG-C wird eine breite Verteilung beobachtet. Der Polydispersitätsindex (PdI) (Tabelle 4.3) ist für DCT-C und UV-C größer als 0,4, was auf Polydispersität hindeutet, während bei den anderen Konjugaten moderate Polydispersität ($0,2 < \text{PdI} < 0,4$) beobachtet wird. UV-C hat mit 41 nm den kleinsten hydrodynamischen Durchmesser und PEG-C mit 102 nm den größten. Bei SA-C ist die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers durch Anbindung des Antikörpers mit 9 nm am geringsten.

Tabelle 4.3: Konjugat-Charakterisierung. Wellenlänge des Maximums im UV/Vis-Spektrum λ_{\max} , Verschiebung der Wellenlänge des Maximums im Vergleich zum Ausgangsmaterial $\Delta\lambda_{\max}$, mit DLS bestimmter hydrodynamische Durchmesser $\varnothing_{\text{hydro}}$, Schichtdicke Δd berechnet über die Differenz der hydrodynamischen Durchmesser von Konjugat und Ausgangsmaterial, Z-Average und PDI der DLS-Messungen. Die Durchschnittswerte mit ihren Standardabweichungen von drei Experimenten sind angegeben.

Konjugat	λ_{\max} in nm	$\Delta\lambda_{\max}$ in nm	$\varnothing_{\text{hydro}}$ in nm	Δd in nm	Z-Average	PDI
DCP-C	536 ± 3	14 ± 3	85 ± 29	32 ± 15	204 ± 73	$0,3 \pm 0,05$
DCT-C	$540,7 \pm 1,5$	$19 \pm 1,5$	64 ± 23	22 ± 12	314 ± 200	$0,74 \pm 0,2$
UV-C	$530,7 \pm 1,2$	$9 \pm 1,2$	41 ± 7	11 ± 4	148 ± 59	$0,47 \pm 0,18$
TCEP-C	$533,3 \pm 0,6$	$11 \pm 0,6$	48 ± 4	14 ± 2	109 ± 270	$0,32 \pm 0,06$
PEG-C	540 ± 7	18 ± 7	102 ± 24	41 ± 12	303 ± 30	$0,22 \pm 0,06$
SA-C	$535,3 \pm 0,6$	$13 \pm 0,6$	44 ± 5	9 ± 3	57 ± 4	$0,296 \pm 0,016$
DCM-C	$539,7 \pm 0,6$	-	72 ± 7	-	87 ± 12	$0,26 \pm 0,008$

Die Zunahme der Größe der Partikel bei allen Synthesen weist auf eine erfolgreiche Anbindung des Antikörpers hin. Zudem tritt bei den Konjugaten UV-C, TCEP-C, SA-C und DCM-C nur geringe Agglomeration auf. UV-C und TCEP-C weisen mit 11 nm und 14 nm eine Schichtdicke auf, die mit einer Monolage des Antikörpers ($14,5 \times 8,5 \times 4$) nm³^[105] gut zu erklären ist. Bei einer Monolage würden auf einen AuNP mit 20 nm Durchmesser zehn Antikörper passen. Die geringere Schichtdicke bei UV-C und TCEP-C im Vergleich zu DCP-C und DCT-C kann auf eine unterschiedliche Orientierung des Antikörpers zurückzuführen sein. Beim Vergleich der beiden Direktbeschichtungsmethoden DCP-C und DCT-C weist DCP-C eine breitere Verteilung und größere Durchmesser auf. Dies deutet auf Agglomeration und eine unzureichende Stabilisierung der Partikel in PBS hin. TRIS verbessert die Stabilität. PEG-C weist die höchste Schichtdicke auf, was daran liegt, dass zusätzlich zum Antikörper eine Schicht PEG angebunden wurde. Außerdem scheinen bei PEG-C die Partikel zu agglomerieren. Die Agglomeration kann dadurch zustande kommen, dass kovalente Bindungen zwischen Aminogruppen der Antikörper und PEG-AuNP geknüpft werden. Dabei kann es vorkommen, dass mehrere Aminogruppen eines Antikörpers mit verschiedenen PEG-AuNP Bindungen eingehen und so über einen Antikörper Vernetzungen zwischen mehreren PEG-AuNP und damit Agglomerate entstehen. Die geringe Schichtdickenzunahme bei SA-C liegt daran, dass nur wenige Antikörper angebunden werden, nach der Stöchiometrie der Reaktion sechs Antikörper pro SAuNP. Wenige Antikörper pro AuNP könnten für die Durchführung eines Bindungshemmtests von Vorteil sein, da weniger Analyt für eine sichtbare Hemmung erforderlich ist. Die erforderliche Analytkonzentration für eine Hemmung hängt nicht nur von der Anzahl der Antikörper pro Nanopartikel ab, sondern auch davon, ob diese sterisch zugänglich sind. Ab welcher Konzentration bei den verschiedenen Konjugaten eine Hemmung auftritt, wird mittels LFAs untersucht.

4.2.3 Konjugatvergleich mittels Lateral-Flow-Teststreifen

Um zu vergleichen, wie sich die Konjugate in der Anwendung auf den Teststreifen verhalten, werden Kalibrierungen aufgenommen. Abbildung 4.27 zeigt ein Foto der Teststreifen für eine Kalibrierung mit UV-Konjugat. Als Probe werden acht unterschiedliche Amitriptylin (AMT)-Konzentrationen aufgegeben. Auf der Testlinie sinkt mit steigender AMT-Konzentration das Signal. Das Signal auf der Kontrolllinie ist bei allen Streifen gut erkennbar. Es liegt eine gute intra-Chip-Reproduzierbarkeit vor. Für die Auswertung der Kalibrierung wird für jeden Kanal der Quotient des Signals der Test- und Kontrolllinie gebildet und anschließend der Mittelwert der Signale der vier Kanäle berechnet. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Batches wird auf das Signal der Nullkonzentration normiert.

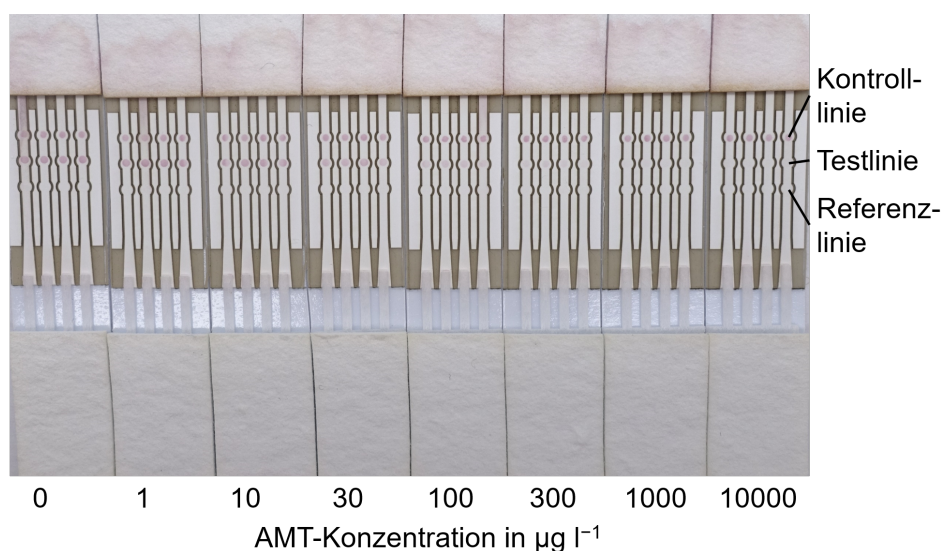


Abbildung 4.27: Foto der Teststreifen einer Kalibrierung mit UV-Konjugat und acht AMT-Konzentrationen ($0, 1, 10, 30, 100, 300, 1000, 10\,000 \mu\text{g l}^{-1}$). Die Intensität auf den Testlinienspots sinkt mit steigender AMT-Konzentration. Die farbigen Spots der Kontrolllinie zeigen den erfolgreichen Testverlauf an.

Abbildung 4.28 zeigt die erhaltene Kalibrierkurve mit sigmoidalem Fit. Um die Konjugate auf den Teststreifen zu vergleichen, werden die minimal detektierbare Konzentration (engl. *Minimum Detectable Concentration*) (MDC) und zuverlässige Erkennungsgrenze (engl. *Reliable Detection Limit*) (RDL) mithilfe des 95 %-Konfidenzbandes berechnet.

Die erhaltenen MDC und RDL stellt Abbildung 4.29 dar. Es ist eine große Varianz zwischen den dreifach hergestellten Konjugaten DCP-C, PEG-C und SA-C zu sehen. Die geringste Variation zwischen den Batches wird bei UV-C und DCM-C erhalten, bei UV-C und DCM-C wird zugleich die niedrigste MDC mit $5 \mu\text{g l}^{-1}$ erreicht.

Da UV-C und DCM-C die beste Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen mit niedriger MDC aufweisen, sind diese Konjugate am besten für einen LFA geeignet. Die erhaltene

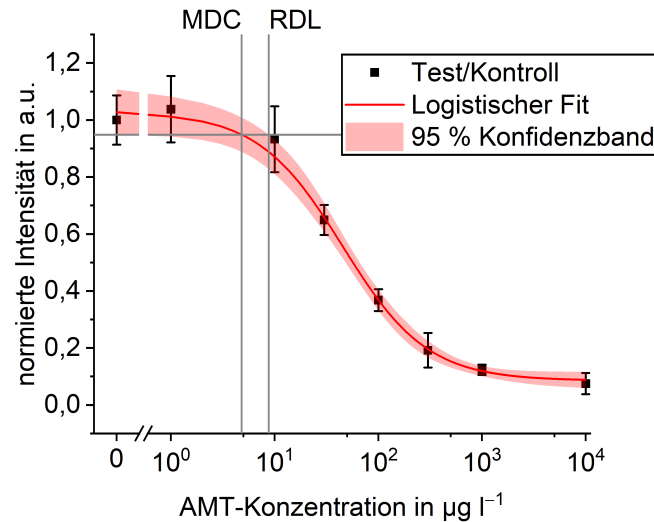


Abbildung 4.28: Beispiel-Kalibrierung mit UV-Konjugat. Die normierten Signale von acht AMT-Konzentrationen sind gezeigt. Die Kurvenanpassung erfolgt mit einem Vier-Parameter-logistischem Fit. MDC und RDL werden über das 95% Konfidenzband bestimmt.

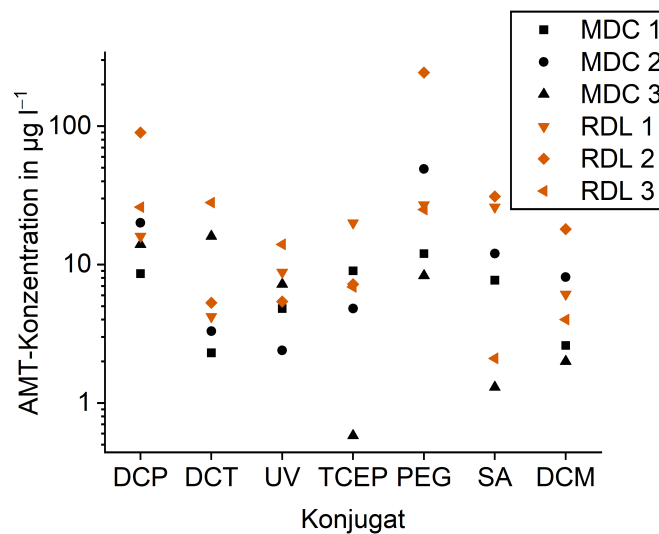


Abbildung 4.29: MDC und RDL der Kalibrierungen mit verschiedenen Konjugaten. Die ermittelten MDC und RDL sind für drei Replikate der Konjugate DCP-C, DCT-C, UV-C, TCEP-C, PEG-C, SA-C und DCM-C mit logarithmischer Skalierung der Y-Achse gezeigt.

MDC eignet sich für die Anwendung im Therapeutischen Drug Monitoring (TDM), da die AMT-Konzentration in Serumproben bei $100 - 200 \mu\text{g l}^{-1}$ liegen sollte^[13]. Plasmaproben könnten vor der Analyse zehnfach mit Puffer verdünnt werden. In weiteren Versuchen wird die Herstellung der Konjugate über UV-Aktivierung verwendet.

4.3 Assayoptimierung Lateral-Flow-Test

4.3.1 Spottingoptimierung

Für die Entwicklung eines LFA müssen alle Bestandteile optimiert werden, neben der Konjugatsynthese auch das Aufbringen der Test- und Kontrolllinie. Die Linien werden zunächst mit einem Kontaktpotter aufgebracht. Beim Spotting gibt es viele Parameter, die optimiert werden sollten. Diese lassen sich unterteilen in physikalische Parameter wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit während des Spottings und Trocknens und chemische Parameter wie die Wahl des Lösungsmittels für die Proteinlösungen. Für die Optimierung wird die NRT-BSA-Lösung für die Testlinie mit PBS-Lösung mit verschiedenen pH-Werten (pH 6,4 und 7,4) verdünnt und die Trocknung der Streifen variiert (1 h bei 37 °C oder 10 min bei 50 °C). Abbildung 4.30 a) zeigt die jeweils bestimmte Testlinienintensität. Die verschiedenen pH-Werte des Puffers beeinflussen die Testlinienintensität kaum, eine Verstärkung der Intensität ist für die zehnmütige Trocknung bei 50 °C zu beobachten.

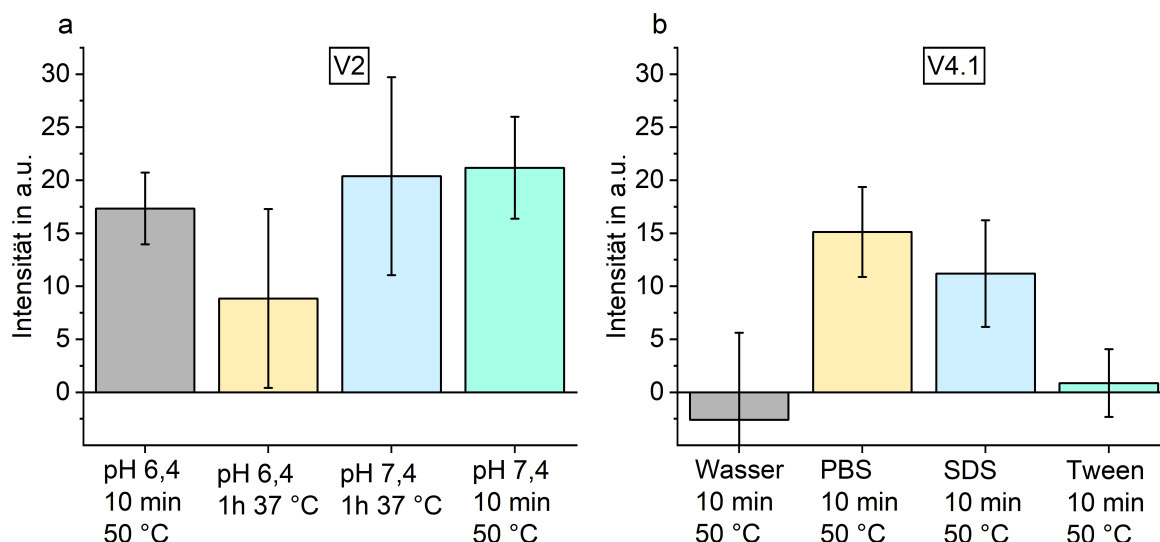


Abbildung 4.30: Testlinienintensität bei verschiedenen Spottingbedingungen. a) Variation des pH der NRT-BSA-Lösung der Trocknungsbedingungen. Tests durchgeführt auf Streifen der Version V2, die Balken stellen den Mittelwert von vier Testzonen mit ihren Standardabweichungen als Fehlerbalken dar. b) Variation des Lösemittels von NRT-BSA. Es wurde H₂O, PBS pH 7,4, 0,1 % SDS in PBS pH 7,4 und 1 % Tween in PBS pH 7,4 getestet. Tests durchgeführt auf Streifen der Version V4.1, die Balken stellen den Mittelwert von sechs Testzonen mit ihren Standardabweichungen als Fehlerbalken dar.

Außerdem werden verschiedene Zusätze der NRT-BSA-Lösung getestet. In Abbildung 4.30 b) ist die Testlinienintensität für NRT-BSA mit Wasser, PBS pH 7,4, 0,1 % SDS in PBS pH 7,4 und 1 % Tween in PBS pH 7,4 zu sehen. Diese Streifen werden 10 min bei 50 °C getrocknet. Für das Lösemittel PBS pH 7,4 ohne weitere Zusätze wird die höchste Testlinienintensität beobachtet. Daher werden diese Bedingungen für das weitere Spotting

verwendet.

Da mit dem Kontaktpotter trotz Optimierung immer wieder Probleme wie fehlende Spots, Schwierigkeiten bei der Positionierung und der Reproduzierbarkeit auftreten, wird das Spotting auf einen kontaktlosen Spotter übertragen. Die Bedingungen für die Trocknung der Teststreifen hängen nicht mit der Wahl des Spotters zusammen und können für den kontaktlosen Spotter genauso verwendet werden. Mit den für den Kontaktpotter optimierten Bedingungen des Lösungsmittels werden auch mit dem Kontaktlos-Spotter gute Spots produziert, daher werden sie beibehalten. Nachfolgende Experimente wurden mit kontaktlosem Spotting durchgeführt.

4.3.2 Auslesung der Farbdaten

Um die Auswertung der Spots auf den LFAs zu optimieren, wird ein Teststreifen nach Probenaufgabe gefilmt und die Farbdaten der Testlinie ausgelesen. Um das Signal zu berechnen, werden die RGB-Werte der Bereiche Referenzzone links (RefL) und Testzone (Tz) der Testlinie ausgelesen (Abbildung 4.31) a). RefL befindet sich direkt vor dem Spot der Testlinie, Tz ist der Bereich des Spots der Test- oder Kontrolllinie und damit der Ort des Farbumschlags. In allen Farbkanälen sinkt in Tz und RefL in den ersten Minuten die Intensität, danach bleibt die Intensität in Tz konstant mit leichten Fluktuationen (Abbildung 4.31) b). In RefL nimmt die Intensität in den drei Farbkanälen zu und bleibt dann ebenfalls mit Fluktuationen konstant. Für die Auswertung wird über Division (Abbildung 4.31) c) und über Differenzbildung (Abbildung 4.31) d) auf RefL referenziert.

Die Abnahme der Intensität zu Beginn in RefL und Tz ist damit zu erklären, dass die Kanäle durch die Probe nass und dadurch dunkler werden. In RefL nimmt die Intensität anschließend zu, was mit einer Veränderung der Beleuchtung oder einer Farbkorrektur der Kamera zusammenhängen könnte. Durch die Referenzierung ist eine Abnahme des Signals in allen Farbkanälen in den ersten Minuten zu beobachten, danach bleibt das Signal konstant. Die Intensitätsabnahme ist im grünen Farbkanal am stärksten ausgeprägt. Die Fluktuationen lassen sich durch die Referenzierung herausrechnen, sie sind wahrscheinlich durch Schwankungen in der Beleuchtung verursacht.

Beide Referenzierungen führen zu einem sehr ähnlichen Farbverlauf, bei dem die Signaländerung im grünen Farbkanal am größten ist. Durch die Ausbildung der roten Farbe wird das Signal in der Testzone weniger grün. Daher wird dieser Farbkanal für die Auswertung der Teststreifen verwendet. Ob die Referenzierung über Division oder Differenz erfolgt, macht keinen großen Unterschied. Es wird die Referenzierung über die Differenz für weitere Versuche verwendet.

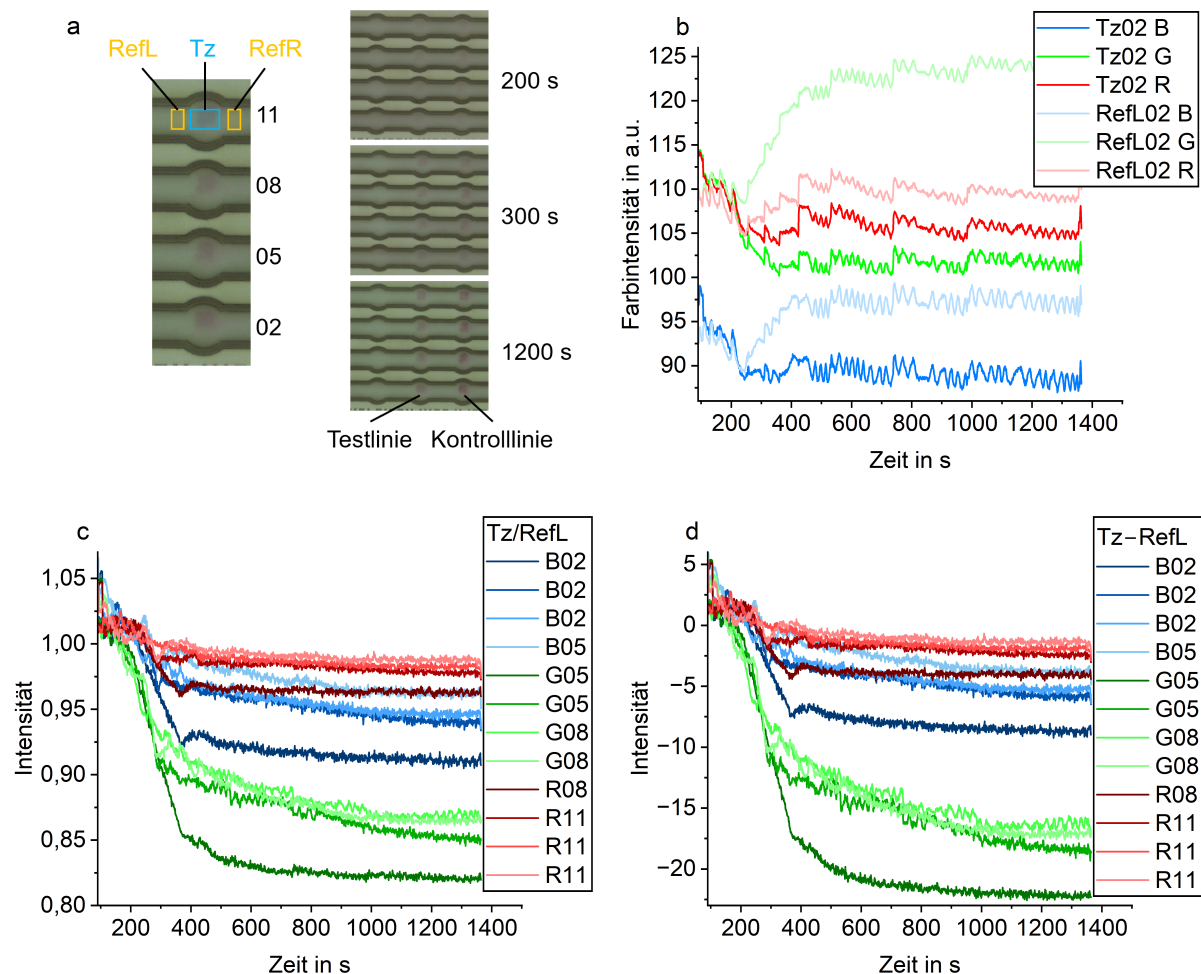


Abbildung 4.31: Farbdaten des Teststreifen-Videos. a) Teststreifenausschnitt eines Streifens der Version V2 mit Tz und RefL der Testlinie, Teststreifen zu verschiedenen Zeitpunkten b) die Intensität in den drei Farbkanälen R (rot) G (grün) B (blau) in der Testzone Tz02 und Referenzzone RefL vor der Testzone über die Zeit c) Referenzierung über Division für die Testzonen im Bereich der Testlinie in vier Kanälen, d) Referenzierung über die Differenz.

4.4 Lateral-Flow-Test für Amitriptylin

4.4.1 Bindungshemmtest mit Kalibrierung

Für die Durchführung eines Bindungshemmtest wird eine Konzentrationsreihe mit acht AMT-Konzentrationen in Puffer und zehnfach verdünntem Fetalem Kälberserum (engl. *Fetal Calf Serum*) (FCS) auf Teststreifen der Version V4.1 mit sechs Kanälen vermessen (Abbildung 4.32). Die bestimmte Kalibrierfunktion in Puffer ergibt einen Arbeitsbereich von $3,8 - 175 \mu\text{g l}^{-1}$ und in Serum von $0,6 - 594 \mu\text{g l}^{-1}$. Die MDC liegen bei $11,4 \mu\text{g l}^{-1}$ in Puffer und $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ in Serum und die RDL bei $14,1 \mu\text{g l}^{-1}$ in Puffer und $8,0 \mu\text{g l}^{-1}$ in Serum.

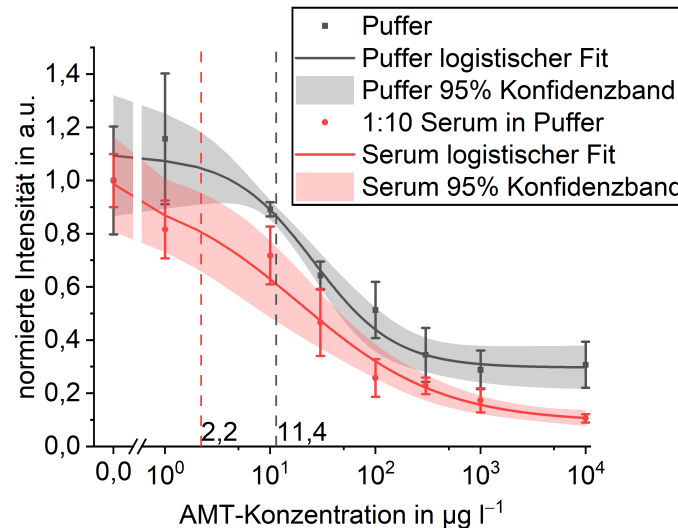


Abbildung 4.32: Kalibrierung auf Teststreifen in Puffer und Serum. Kalibrierung in PBS pH 7,4 (dunkelgrau) und zehnfach verdünntem FCS (rot) für acht AMT-Konzentrationen mit Konjugat aus UV-aktiviertem anti-AMT Ak 8F9 und AuNP mit logistischer Anpassung, 95 % Konfidenzband und MDC. Die Punkte geben den Mittelwert aus den Signalen von sechs Kanälen an, die als Quotient aus Test- und Kontrolllinie berechnet werden, mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Die deutlichen Unterschiede im Arbeitsbereich zeigen, dass mit Serumproben deutliche Matrixeffekte auftreten. Es ist möglich, dass die Serumbestandteile mit dem Antikörper wechselwirken und damit eine Veränderung der Affinität verursachen. Die erhaltene RDL in Serum eignet sich für die Anwendung im TDM, da die AMT-Konzentration in Patientenproben auf 100 - 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ eingestellt werden sollte^[13], dementsprechend lägen zehnfach verdünnte Patientenproben im Bereich von 10 - 20 $\mu\text{g l}^{-1}$. Somit wäre der LFA für die Quantifizierung von Patientenproben geeignet.

4.4.2 Untersuchung der Kreuzreaktivitäten

Auf Teststreifen der Version V4.1 wird die Kreuzreaktivität des anti-AMT Ak 8F9 getestet. Das Inhibitionsvermögen von fünf Trizyklischen Antidepressiva (TZA) und von dem strukturähnlichen Arzneimittel Carbamazepin (CBZ) wird im Vergleich zu AMT bestimmt. Abbildung 4.33 zeigt die Strukturformeln der auf Kreuzreaktivität untersuchten Analyten, wobei die Unterschiede zu AMT farblich hervorgehoben sind. Es werden jeweils 400 nM Analyt zur Inhibition verwendet. AMT inhibiert das Signal am stärksten und reduziert das Signal auf der Testlinie um 77 %. Diesem Wert wird 100 % relative Inhibition zugewiesen und die Inhibition der anderen TZA und CBZ dazu ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 4.34). Auch Opipramol (OPP), Doxepin (DOX) und Imipramin (IMI) inhibieren den Antikörper. Trimipramin (TRIM) und Clomipramin (CLOM) bewirken eine geringere Inhibition. CBZ scheint den Antikörper nicht zu inhibieren.

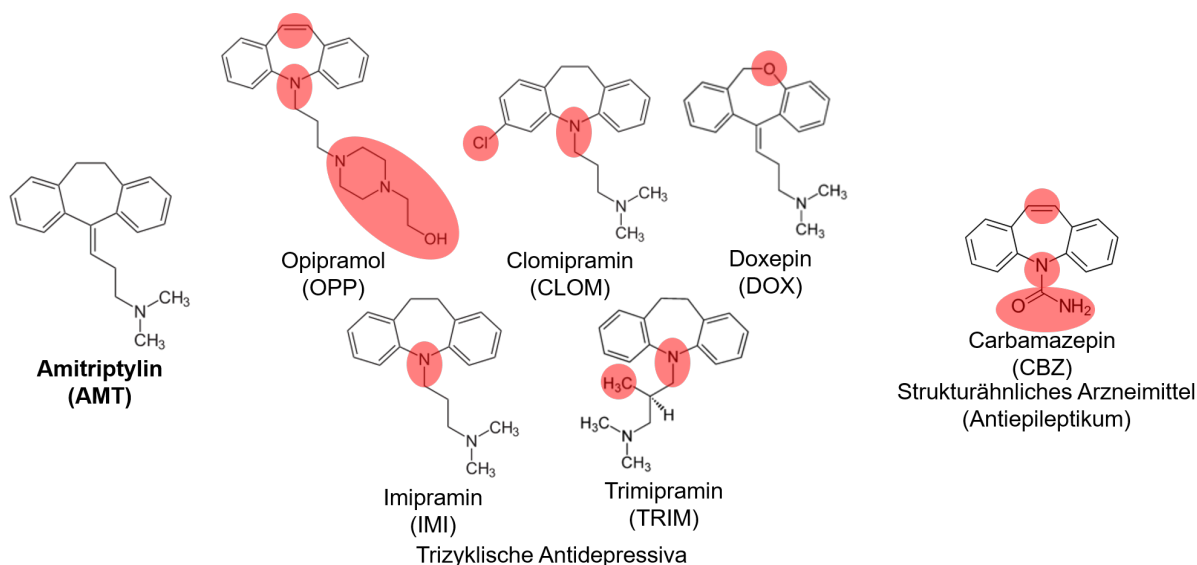


Abbildung 4.33: Strukturen der auf Kreuzreaktivität untersuchten Substanzen, verschiedene TZA und CBZ. Farblich hervorgehoben sind die Unterschiede in der Struktur zu AMT.

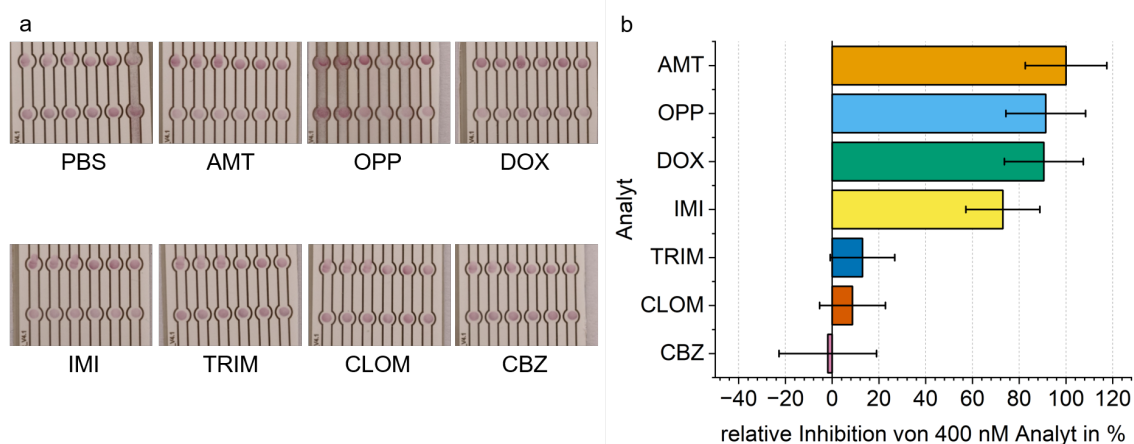


Abbildung 4.34: Relative Inhibition von verschiedenen Analyten. a) Inhibition von anti-AMT Ak 8F9-AuNP-Konjugat mit jeweils 400 nM TZA oder CBZ im Vergleich zu einer Probe ohne Inhibition (PBS); b) relative Inhibition von TZA und CBZ im Vergleich zu AMT.

Die Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen an der Seitenkette wie bei OPP oder der Austausch eines Kohlenstoffatoms im Trizyklus zu Sauerstoff oder Stickstoff wie bei OPP, DOX und IMI keinen großen Effekt darauf haben, wie gut der Antikörper anbindet. Größere Änderungen im Trizyklus wie ein großes Chloratom bei CLOM oder eine Methylgruppe in der Nähe des Trizyklus bei TRIM führen zu einer deutlich geringeren Inhibition des Antikörpers. Auch beim CBZ sind die strukturellen Änderungen direkt am Trizyklus. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper an den Trizyklus des AMT bindet. Krieg und Gauglitz (2015)^[106] hatten bei der Untersuchung der Kreuzreaktivitäten mit TZA des anti-AMT Ak 202 in RIFs ähnliche Beobachtungen gemacht. Dies ist ein Indiz dafür, dass

für die Produktion von anti-AMT Ak 8F9 und anti-AMT Ak 202 das Hapten AMT über das Amin der Seitenkette an das Protein Schlitzschnecken-Hämocyanin angebunden wurde, um eine Immunantwort auszulösen.

Der Antikörper ist aufgrund der beobachteten Kreuzreaktivitäten nicht zu 100 % selektiv. Bei struktureller Ähnlichkeit tritt Kreuzreaktivität mit anderen TZA auf. Diese Kreuzreaktivität lässt sich nutzen, da die strukturähnlichen TZA eine ähnliche Wirkung im Körper haben. Für eine wirkungsbezogene Analytik ist ein Test auf die Summenkonzentration von ähnlichen Stoffen von Vorteil.

4.4.3 Multi-Analyt-Kalibrierung

Die Kanalstrukturen auf den Teststreifen ermöglichen zum einen die Mehrfachbestimmung eines Analyten auf einem Streifen und damit Aussagen über die Reproduzierbarkeit. Zum anderen ist eine weitere Anwendung die Multi-Analyt-Bestimmung. Bei der Multi-Analyt-Bestimmung werden in den einzelnen Kanäle unterschiedliche Erkennungsstrukturen für verschiedene Analyten aufgebracht. Um zu zeigen, dass sich die strukturierten Streifen für eine Multi-Analyt-Bestimmung eignen, werden in drei der sechs Kanäle Erkennungsstrukturen für AMT (Nortriptylin-Rinderserumalbumin-Konjugat (NRT-BSA) auf der Testlinie und anti-AMT Ak-AuNP-Konjugat auf den Stegen des Konjugat-Pads) und in die anderen drei Kanäle Erkennungsstrukturen für Testosteron (Testosteron-BSA auf der Testlinie und anti-Testosteron-AuNP-Konjugat auf den Stegen des Konjugat-Pads) immobilisiert (Abbildung 4.35 a)).

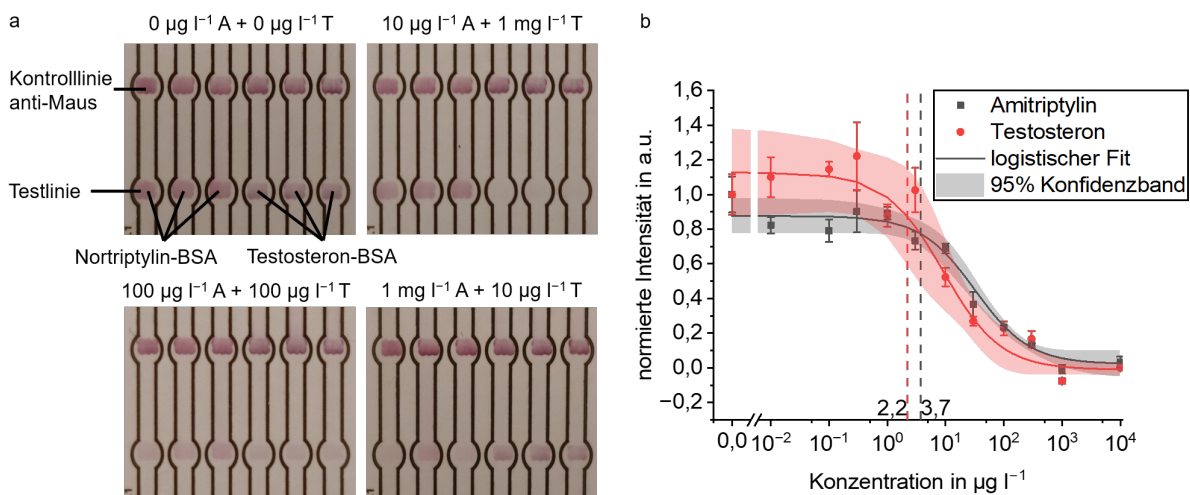


Abbildung 4.35: Multi-Analyt-Kalibrierung. a) Teststreifen V4.1 mit Erkennungsstrukturen für AMT und Testosteron mit verschiedenen Konzentrationen AMT und Testosteron in der Probe, b) Kalibrierung für AMT und Testosteron in PBS pH 7,4 mit logistischer Anpassung, 95 % Konfidenzband und MDC. Die Punkte geben den Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken aus den Signalen von drei Kanälen an, die als Quotient aus Test- und Kontrolllinie berechnet werden.

Die Intensität der Farbe der Spots zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit, je höher die Konzentration des Analyten desto geringer ist die Intensität im entsprechenden Kanal. Beide Analyten können gleichzeitig in einer Probe nachgewiesen werden. Die Intensität in den Testosteron-Kanälen ist für die Leerprobe etwas geringer als in den AMT-Kanälen, dementsprechend ist auch das Signal der Probe mit $100 \mu\text{g l}^{-1}$ AMT und $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in den Testosteron-Kanälen geringer. Eine Kalibrierung mit gleichförmig steigender AMT- und Testosteronkonzentration in der Probe zeigt ebenfalls ein sinkendes Signal mit steigender Konzentration (Abbildung 4.35 b)). MDC liegen bei $3,7 \mu\text{g l}^{-1}$ AMT und $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron und RDL bei $8,0 \mu\text{g l}^{-1}$ AMT und $6,9 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron.

Die Multi-Parameter-Tests zeigen, dass die Analyten AMT und Testosteron nebeneinander in einer Probe auf den Teststreifen analysiert werden können. Es treten keine Kreuzreaktivitäten auf. Der Teststreifen mit sechs Kanälen ist wahrscheinlich für die parallele Bestimmung von bis zu sechs Analyten geeignet, wenn passende Erkennungsstrukturen in den Kanälen aufgebracht werden.

Alternative Methoden, um mehrere Analyten auf LFAs nachzuweisen, sind von einem Sample Pad mehrere Teststreifen starten zu lassen^[52,53,107], mehrere Testlinien auf einen Streifen aufzubringen^[66] oder Microarray-Patterns^[108,109]. Der Vorteil von Multiplexing auf einem strukturierten Teststreifen liegt zum einen darin, dass der Teststreifen schmaler ist, als wenn von einem Sample Pad mehrere Teststreifen starten. Da etwa $100 \mu\text{l}$ Probelösung pro Teststreifen benötigt werden, wären bei sechs Streifen $600 \mu\text{l}$ Probelösung nötig. Auf den sechskanaligen Teststreifen werden hingegen nur $270 \mu\text{l}$ Probelösung benötigt. Zum anderen ist der Vorteil im Vergleich zu einem Teststreifen mit mehreren Testlinien, dass weniger Interferenz zwischen den Assays der einzelnen Kanäle auftritt, da die spezifischen Reaktionen in individuellen Kanälen stattfinden. Kreuzreaktivitäten zu anderen Analyten würden dennoch zu sehen sein, aber weniger als bei gemischten Antikörpern. Bei Teststreifen mit mehreren Testlinien auf einem Teststreifen kann der verschiedene große Abstand zum Sample Pad zu unterschiedlichen maximalen Signalintensitäten führen, da sich die Flussgeschwindigkeit und die Interaktionszeit zwischen Rezeptor und Analyt unterscheidet^[108]. Dies ist insbesondere für quantitative Aussagen zu beachten. Werden Microarray-Patterns für die Multi-Analyt-Detektion verwendet, hängt auch hier die maximale Intensität der Spots von der Position des Spots ab, da bei den hinteren Spots weniger Reagenzien ankommen können. Dies hängt stark vom Aufbau des Arrays und der Position der Spots und der durch die Spots veränderten Strömung der Probe ab. Außerdem hat bei den mehrkanaligen Teststreifen jeder Kanal zu jeder Testlinie eine Kontrolllinie, die zur Berechnung des Signals miteinbezogen wird. Bei Multiplexing über mehrere Testlinien gibt es hingegen nur eine Kontrolllinie für alle Testlinien und bei Microarray-Patterns wird das Summensignal der Kontrollspots erfasst. Der Vorteil der Einbeziehung der Kontrolllinie ist, dass der Quotient von Test- und Kontrollliniensignal robuster gegenüber Variationen in der Beleuchtung ist.

4.4.4 Magnetische Separation für Verbesserung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze zu verringern, wird eine magnetische Separation zur Aufkonzentration der Proben durchgeführt. Abbildung 4.36 zeigt die Kalibrierung mit magnetischer Separation. Die erhaltene MDC liegt bei 121 mg l^{-1} und die RDL bei 223 mg l^{-1} . Dies ist um Größenordnungen höher als ohne die magnetische Separation.

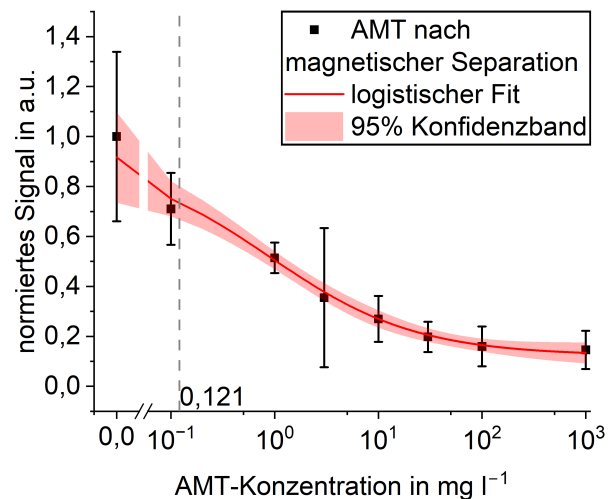


Abbildung 4.36: Kalibrierung nach magnetischer Separation. Kalibrierung für acht AMT-Konzentrationen mit logistischer Anpassung, 95 % Konfidenzband und MDC. Die Punkte geben den Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken aus den Signalen von sechs Kanälen an, die als Quotient aus Test- und Kontrolllinie berechnet werden.

Eine Ursache für die hohe Nachweisgrenze könnte die geringe Affinität des Antikörpers sein. Um die Proben mit magnetischer Separation aufzukonzentrieren, wird ein hochaffiner Antikörper benötigt, damit dieser den Analyten aus der Probenlösung effizient bindet. Nach Verringerung des Volumens muss der Komplex aus Analyt und Antikörper-MNP-Konjugat zunächst mittels Ultraschall resuspendiert werden, um die Partikel von der Gefäßwand zu lösen. Dadurch kann der Antikörper beschädigt werden. Anschließend wird die Suspension auf den LFA aufgegeben. Ist die Dissoziationsratenkonstante des Antikörpers zu hoch, so tritt auf der Testlinie eine Konkurrenz zwischen Antigen auf der Testlinie und dem Analyten auf, was zu einer geringeren Nachweisgrenze führt. Dies stellt allgemein ein Problem bei der Durchführung des Bindungshemmtests dar. Da ohne magnetische Separation niedrigere MDC erreicht wurden, liegt die Ursache wahrscheinlich an Verlusten durch die magnetische Separation wie eine unvollständige Trennung oder irreversible Agglomeration der Partikel, wodurch nur ein Bruchteil der eingesetzten Konjugate auf den Teststreifen gelangt.

Mit magnetischer Separation in Kombination mit Fluoreszenzdetektion wurde in einem anderen LFA bereits eine Nachweisgrenze (engl. *Limit of Detection*) (LOD) von $1,2 \text{ ng l}^{-1}$

für Aflatoxin erreicht^[110]. Dafür wurden bifunktionale Magneto-Fluoreszenz-Partikel für die Antikörpermarkierung verwendet, mit denen eine Aufkonzentration von 1 ml auf 100 μ l durchgeführt wurde. Die Auswertung der Tests erfolgte über das Fluoreszenzsignal. Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit LFAs die für Umweltproben verlangten niedrigen Nachweisgrenzen zu erreichen.

4.5 Aufstockverfahren für nichtlineare Kalibrierfunktion

4.5.1 Simulationen zum Aufstockverfahren

Üblicherweise werden in der Analytik Sieben-Punkt-Kalibrierungen aufgenommen, um im Vergleich dazu Probenkonzentrationen zu bestimmen. Diese Methode ist jedoch anfällig für Matrixeffekte, da die Matrix in der Kalibrierung zuverlässig nachgebildet werden muss, um Konzentrationen von Proben mit komplexer Matrix richtig zu bestimmen. Um bei Veränderungen der Matrix keine neue Kalibrierkurve aufnehmen zu müssen, stellt eine interne Kalibrierung eine gute Alternative dar. Eine interne Kalibrierung über das Aufstockverfahren ist für Immunoassays nicht direkt anwendbar, da bei Immunoassays typischerweise nichtlineare Kalibrierkurven erhalten werden. Das Aufstockverfahren kann jedoch nur für Ursprungsgeraden verwendet werden. Daher ist eine alternative Auswertemethode für das Aufstockverfahren in Immunoassays notwendig. Pang und Cowen (2017)^[111] stellten eine Auswertemethode über Doppelt-Log-Transformation der Konzentration und des Signals (log-log) vor. Die Probe wird mit bekannten Konzentrationen aufgestockt und die unbekannte Probenkonzentration geraten. Dazu werden die logarithmierten Signale gegen die logarithmierte Gesamtkonzentration (Summe aus bekannter Aufstockkonzentration und geratener Probenkonzentration) aufgetragen und es wird eine lineare Regression durchgeführt. Für verschiedene geratene Probenkonzentrationen wird jeweils die Linearität bestimmt, bis die beste Linearität am Minimum der Residuenabweichung gefunden ist. Dies ist die gesuchte Probenkonzentration.

Das log-log-Verfahren wird mit simulierten Kalibrierdaten auf seine Anwendbarkeit überprüft. Dazu werden verschiedene Kalibrierkurven für die Datensimulation verwendet: eine sigmoidale Kurve (Gl. (3.5)) und Kalibrierkurven, die aus dem Massenwirkungsgesetz für einen monovalenten (Gl. (3.7)) oder bivalenten (Gl. (3.8)) Rezeptor hergeleitet sind. Die Parameter x_0 und p für die sigmoidale Kalibrierfunktion werden aus dem Fit der AMT-Kalibrierung in Puffer und zehnfach verdünntem Serum (Abbildung 4.32) übernommen. Zusätzlich wird das Auswerteverfahren für $x_0 = 10^{-7}$ M und die p -Werte 0,15, 1,0 und 3,2 untersucht. Die p -Werte werden so gewählt, da 1,0 ein typischer Wert bei Kalibrierkurven ist, während $p = 0,15$ und $p = 3,2$ die Extremwerte von p darstellen^[112,113]. Für die Simulation werden im Signalbereich von 10 bis 90 % logarithmisch äquidistant 100 Konzentrationen als Probenkonzentrationen ausgewählt. Diese werden jeweils mit sechs Standards beginnend mit 0 und fünf weiteren, logarithmisch über den dynamischen Bereich verteilten Konzentrationen aufgestockt und die dazugehörigen Signale mit der Kalibrierfunktion berechnet. Anschließend werden diese Signale logarithmiert und auf der Y-Achse aufgetragen. Für die X-Werte wird zur bekannten Aufstockkonzentration eine geratene Probenkonzentration hinzuaddiert und diese als geschätzte Gesamtkonzentration logarithmiert

Tabelle 4.4: Ergebnisse Simulation des Aufstockverfahrens für verschiedene Kalibrierfunktionen KF: sigmoidal s, monovalent m und bivalent b mit ihren Parametern für die Simulation und Arbeitsbereich AB bestimmt als Konzentrationsbereich, in dem sich das Signal zwischen 10 und 90 % befindet. Angegeben ist der prozentuale Anteil der 100 getesteten Konzentrationen, die richtig bestimmt werden, und der funktionierende Bereich fB des Auswerteverfahrens.

Auftragung		p	AB in nM	log-log		logit-log	
KF	x_0 in nM			richtige c in %	fB in nM	richtige c in %	fB in nM
s	80	1,1	11 - 590	3	523 - 567	100	11 - 567
	60	0,6	1,5 - 2336	9	1209 - 2171	100	1,5 - 2171
	100	0,15	4,3E-05 - 1,7E+08	24	2,0E+05 - 1,7E+08	100	4,3E-05 - 1,7E+08
	100	1	11 - 861	3	789 - 861	100	11 - 861
	100	3,2	50 - 196	7	180 - 196	100	50 - 196
	K in nM ⁻¹	c_{0R} in nM					
m	0,01	100	21 - 990	17	515 - 953	42	25 - 953
	0,1	100	11 - 180	4	80 - 87	7	50 - 59
	0,1	10	2,1 - 99	17	51 - 95	42	2,5 - 8,8
	0,1	1	1,2 - 91	3	80 - 87	100	1,2 - 87
	0,1	0,1	1,1 - 90	3	79 - 86	100	1,1 - 86
b	0,1	100	36 - 280	7	80 - 91	6	36 - 41
	0,1	10	7,8 - 194	20	102 - 188	19	120 - 188
	0,1	1	4,9 - 186	5	155 - 179	36	56 - 179
	0,1	0,1	4,7 - 185	3	166 - 178	40	44 - 178

auf der X-Achse aufgetragen. Für diese Werte wird eine lineare Regression durchgeführt und die Residuenquadratsumme (SSres) als Indikator für die Linearität bestimmt. Nach Variation der geratenen Probenkonzentration (100 Konzentrationen im Arbeitsbereich) wird die gesuchte Probenkonzentration im Minimum von der SSres erhalten.

Tabelle 4.4 zeigt für die log-log-Auswertung, in welchem Bereich dieses Verfahren Konzentrationen bei simulierten Daten für verschiedene Kalibrierfunktionen richtig bestimmt. Als richtig gelten bestimmte Konzentrationen, die weniger als 10 % von der Probenkonzentration abweichen. Nur ein sehr kleiner Bereich der Kalibrierfunktion ist nutzbar, unabhängig davon mit welcher Kalibrierfunktion die Signale simuliert werden. Je kleiner der Parameter p der sigmoidalen Kalibrierfunktion, desto größer wird der Bereich, in dem Konzentrationen richtig bestimmt werden können. Der Parameter p beschreibt die Steigung der Kalibrierfunktion am Wendepunkt, je kleiner p , desto breiter ist die Kalibrierfunktion. Dementsprechend ist bei kleinem p der Arbeitsbereich der Kalibrierfunktion größer und damit auch der Bereich, in dem das Aufstockverfahren angewandt werden kann. Die richtig bestimmten Konzentrationen bei log-log-Auftragung liegen im Bereich großer

Konzentrationen, wo eine deutliche Hemmung des Signals auftritt.

Da das Verfahren über log-log-Auftragung nur sehr eingeschränkt zur Konzentrationsbestimmung geeignet ist, wird das Auswerteverfahren angepasst. Statt den Logarithmus der Signale auf der Y-Achse aufzutragen wird die Logit-Funktion (3.9) verwendet. Bei logit-log-Auftragung werden für die sigmoidalen Kalibrierfunktionen und bei passendem Verhältnis von Affinität und Rezeptorkonzentration alle Probenkonzentrationen richtig bestimmt. Mit der Kalibrierfunktion für bivalente Interaktion werden bei beiden Auswerteverfahren nur kleine Bereiche der untersuchten Konzentrationen richtig bestimmt.

Da die Signale bei realen Messungen fehlerbehaftet sind, werden die Signale für weitere Simulationen statistisch verrauscht. Diese Simulationen werden nur für die Kalibrierfunktionen durchgeführt, bei denen ohne Rauschen alle untersuchten Konzentrationen richtig bestimmt werden. Die Bereiche, in denen das logit-log-Verfahren die untersuchten Konzentrationen richtig bestimmt, sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Je stärker die Abweichungen vom richtigen Signalwert, desto schlechter können die Konzentrationen bestimmt werden. Bis zu einem Rauschen von 1 % können fast alle Konzentrationen richtig bestimmt werden und das Auswerteverfahren funktioniert sehr gut. Nur bei einer sehr breiten Kalibrierfunktion wie bei der sigmoidalen mit $p = 0,15$ treten bereits gehäuft Fehler auf. Ab einem Rauschen von 10 % lassen sich Konzentrationen nicht mehr zuverlässig bestimmen. Es werden zwar vereinzelt Konzentrationen richtig bestimmt, aber es gibt keinen größeren zusammenhängenden Konzentrationsbereich mehr, in dem das Verfahren funktioniert. Für $x_0 = 100 \text{ nM}$ und $p = 1,0$ wird das Rauschen zwischen 1 und 10 % genauer untersucht, da $p = 1,0$ einen typischen Wert für sigmoidale Kalibrierkurven darstellt. Bis zu 3 % Rauschen sind die Ergebnisse akzeptabel, da ein Großteil der getesteten Konzentrationen mit ausreichender Genauigkeit richtig bestimmt wird. Stärkeres Rauschen erschwert die Konzentrationsbestimmung.

Der Vergleich der Auswertemethoden über log-log-Auftragung und logit-log-Auftragung zeigt, dass die logit-log-Auftragung bei sigmoidalen Kalibrierfunktionen und bei monovalenten Kalibrierfunktionen einen deutlich größeren funktionierenden Bereich aufweisen. Bei bivalenten Kalibrierfunktionen sind beide Verfahren weniger gut geeignet. Dies stellt für die Anwendung in Immunoassays eine Schwachstelle dar, da Antikörper in der Regel bivalent sind. Bei monovalenten Kalibrierfunktionen liefert das logit-log-Auswerteverfahren zuverlässige Ergebnisse, wenn $K \cdot c_{0,R} \leq 1$. Bei den getesteten sigmoidalen Kalibrierkurven liefert das Verfahren im gesamten Bereich die richtigen Konzentrationen.

Werden die mit den Kalibrierfunktionen berechneten Signale verrauscht, so kann das Auswerteverfahren über die logit-Funktion bis zu Fehlern von 1 % sehr gut angewandt werden. Dies ist unabhängig von der Steigung der Kalibrierfunktion. Bei Abweichungen von den richtigen Werten von 10 % können Konzentrationen nicht mehr zuverlässig bestimmt werden. Für reale Messungen bedeutet dies, dass der Messfehler bei unter 10 % im besten Fall bei nur 1 % liegen muss. Ist die Methode ausreichend präzise, erlaubt diese

Auswertung des Aufstockverfahrens, eine interne Kalibrierung durchzuführen und damit eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung auch bei Auftreten von Matrixeffekten.

Tabelle 4.5: Ergebnisse Simulation des Aufstockverfahrens mit Rauschen. Auswertung über logit-log-Auftragung für verschiedene Kalibrierfunktionen KF: sigmoidal s, monovalent m mit ihren Parametern für die Simulation. Angegeben ist der prozentuale Anteil der 100 getesteten Konzentrationen, die richtig bestimmt werden, und der funktionierende Bereich fB des Auswerteverfahrens.

KF	x_0 in nM	p	Rauschen in %	richtige c in %	fB in nM
s	80	1,10	0,0	100	11 - 567
	60	0,60	0,0	100	1,5 - 2171
	100	0,15	0,0	100	4,3E-05 - 1,7E+08
	100	1,00	0,0	100	11 - 861
	100	3,20	0,0	100	50 - 196
	80	1,10	0,1	100	11 - 567
	60	0,60	0,1	100	1,5 - 2171
	100	0,15	0,1	89	4,3E-05 - 2,8E+06
	100	1,00	0,1	100	11 - 861
	100	3,20	0,1	100	50 - 196
	80	1,10	1,0	100	11 - 567
	60	0,60	1,0	96	1,5 - 1300
	100	0,15	1,0	74	1,2 - 4,9E+05
	100	1,00	1,0	98	11 - 555
	100	3,20	1,0	100	50 - 196
	100	1,00	2,0	96	12 - 426
	100	1,00	3,0	79	35 - 202
	100	1,00	4,0	66	104 - 177
	100	1,00	5,0	57	169 - 252
	80	1,10	10,0	22	-
60	0,60	10,0	27	27 - 33	
100	0,15	10,0	13	-	
100	1,00	10,0	27	59 - 64	
100	3,20	10,0	45	96 - 101	
<hr/>					
	K in nM ⁻¹	c_{0R} in nM			
m	0,1	1,0	0,0	100	1,2 - 87
	0,1	0,1	0,0	100	1,1 - 86
	0,1	1,0	0,1	100	1,2 - 87
	0,1	0,1	0,1	100	1,1 - 86
	0,1	1,0	1,0	100	1,2 - 87
	0,1	0,1	1,0	98	1,1 - 76
	0,1	1,0	10,0	32	6,2 - 8,1
	0,1	0,1	10,0	29	9,2 - 11

4.5.2 Aufstockverfahren bei Messungen

Das Aufstockverfahren sollte für die Konzentrationsbestimmungen auf LFAs angewandt werden. Bei den genutzten LFAs treten aufgrund der händischen Produktion Fehler von 10 % auf. Wie die Simulationen zeigten, lässt sich das Aufstockverfahren bei Fehlern in dieser Größenordnung nicht mehr verwenden. Um das Aufstockverfahren anzuwenden, werden daher RfS-Messungen aufgenommen. Es wird Testosteron in verschiedenen Matrices und AMT in Serum bestimmt. Abbildung 4.37 zeigt die aufgenommenen Messungen für eine Probe mit einer Konzentration von $3,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Puffer und eine Probe von $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Milch. Für die Messungen in Puffer in Abbildung 4.37 a) wird die Assoziationsphase für die Auswertung herangezogen. Es werden sechs Aufstockkonzentrationen zwischen $0,00 \mu\text{g l}^{-1}$ und $7,28 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron verwendet. Die Messungen in Serum und Speichel ähneln nach Substraktion einer Messung mit Serum bzw. Speichel ohne Antikörper den Messungen in Puffer und können wie Messungen in Puffer ausgewertet werden.

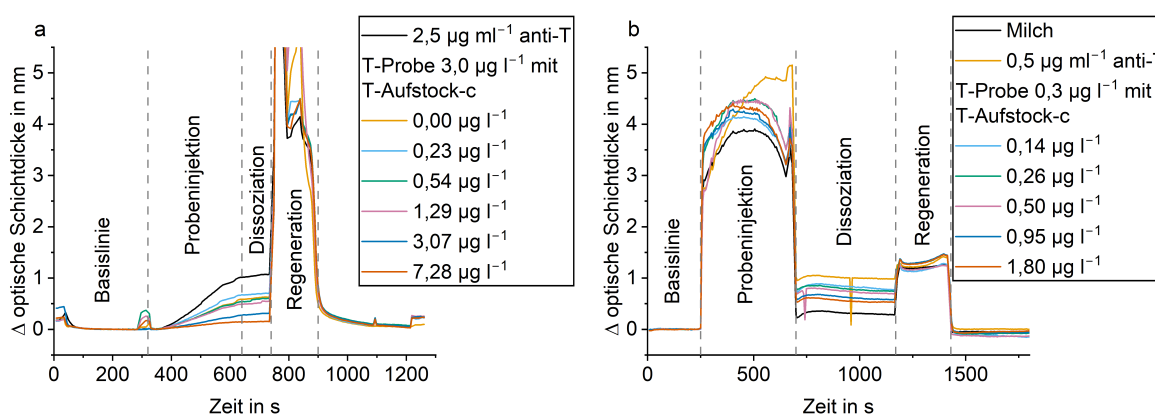


Abbildung 4.37: RfS-Messungen für Aufstockverfahren. a) Messungen in PBS mit $3,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in der Probe und $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron und mit verschiedenen Aufstockkonzentrationen b) Messungen in Milch mit $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in der Probe und $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron. Eine Messung besteht aus Basislinie, Probeninjektion, Dissoziation, Regeneration und Basislinie.

Bei den Messungen in Milch in Abbildung 4.37 b) wird eine starke Zunahme der optischen Schichtdicke während der Probeninjektion beobachtet. Diese ist durch die Tyndall-Streuung und Änderung des Brechungsindex der Matrix Milch verursacht. Diese Effekte der Milch überlagern das Bindungssignal und eine Auswertung während der Probeninjektion ist nicht möglich. Stattdessen wird ein definierter Bereich der Dissoziationsphase für die Auswertung herangezogen wie bei Rau und Gauglitz (2012)^[114]. Wird nur Milch vermessen, sollte das Signal während der Dissoziation auf die Höhe der Basislinie zu Beginn zurückgehen. Dies ist nicht der Fall, stattdessen wird eine Zunahme der optischen Schichtdicke um $0,3 \text{ nm}$ beobachtet. Diese ist auf unspezifische Wechselwirkungen der Matrixbestandteile der Milch mit der Sensoroberfläche zurückzuführen.

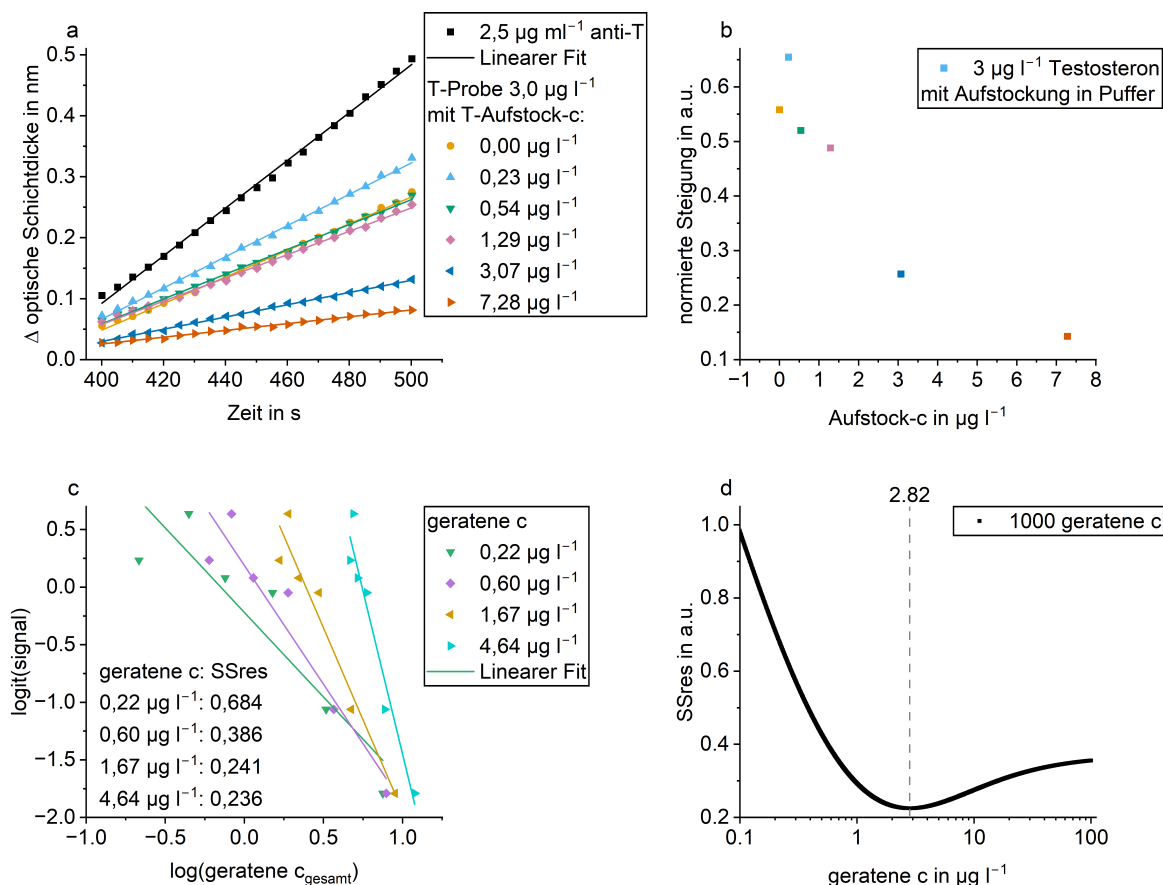


Abbildung 4.38: Auswerteverfahren Standardaddition für Testosteron in PBS gemessen in RIFS. a) Lineare Regression für ausgewählten Bereich der Assoziationsphase der Messungen b) Steigungen normiert auf die Steigung von $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron in PBS c) Auswertung über das Aufstockverfahren: Auftragung von $\text{logit}(\text{signal})$ gegen $\text{log}(\text{geschätzte Gesamtkonzentration})$ für verschiedene geratene Probenkonzentrationen, lineare Regression und Bestimmung der SSres d) SSres aufgetragen gegen die geratene Probenkonzentration und Bestimmung der Probenkonzentration im Minimum.

Das Auswerteverfahren für das Aufstockverfahren soll anhand der Messungen in Puffer ausführlich erläutert werden. Zunächst wird für einen ausgewählten Bereich der Messungen, in der Assoziationsphase von 400 s bis 500 s, die Steigung bestimmt (Abbildung 4.38 a). Die Steigung der aufgestockten Probe wird auf die der Messung mit $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron normiert. Abbildung 4.38 b) zeigt die normierten Steigungen der Probe mit verschiedenen Aufstockkonzentrationen. Wie erwartet sinkt die Steigung mit steigender Aufstockkonzentration. Für das Auswerteverfahren wird aus den normierten Steigungen als Signal die logit -Funktion berechnet und als Y-Werte aufgetragen (Abbildung 4.38 c). Für die X-Werte wird zu den bekannten Aufstockkonzentrationen eine geschätzte Probenkonzentration addiert und von dieser geschätzten Gesamtprobenkonzentration der Logarithmus gebildet. Für verschiedene geratene Probenkonzentrationen wird jeweils eine lineare Regression bei dieser Auftragung durchgeführt und die SSres berechnet.

Bei Auftragung von SSres gegen die geratenen Probenkonzentrationen (hier für 1000 zwischen $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ und $100 \mu\text{g l}^{-1}$) kann die gesuchte Probenkonzentration im Minimum abgelesen werden. Es wird eine Probenkonzentration von $2,82 \mu\text{g l}^{-1}$ bestimmt, diese muss noch korrigiert werden, da dies die Konzentration der gemessenen Probe ist, in der die Testosteron-Probe durch Zugabe von Aufstocklösung und anti-Testosteron leicht verdünnt ist. Nach Korrektur ergibt sich eine Probenkonzentration von $3,53 \mu\text{g l}^{-1}$, was einer Wiederfindung von 118 % entspricht.

Das Auswerteverfahren wird für die Milchmessungen genauso durchgeführt, nur die Auswahl des Signals unterscheidet sich. Bei den Milchmessungen wird der Mittelwert der optischen Schichtdicke am Ende der Dissoziation gebildet (Abbildung 4.39 a). Es werden fünf Aufstockkonzentrationen zwischen $0,14 \mu\text{g l}^{-1}$ und $1,80 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron verwendet. Wird als Probe nur Milch vermessen, so findet bereits eine Zunahme der optischen Schichtdicke um $0,3 \text{ nm}$ statt. Diese wird von den anderen Messungen mit anti-Testosteron abgezogen, bevor sie auf die Messung ohne Testosteron mit $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Testosteron normiert werden. Die normierten Signale werden dem gleichen Auswerteverfahren wie die Puffermessungen unterzogen. Die geratenen Konzentrationen liegen zwischen $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ und $10 \mu\text{g l}^{-1}$. Es wird eine Probenkonzentration von $0,193 \mu\text{g l}^{-1}$ bestimmt. Nach Korrektur ergibt sich eine Probenkonzentration von $0,212 \mu\text{g l}^{-1}$, was einer Wiederfindung von 71 % entspricht.

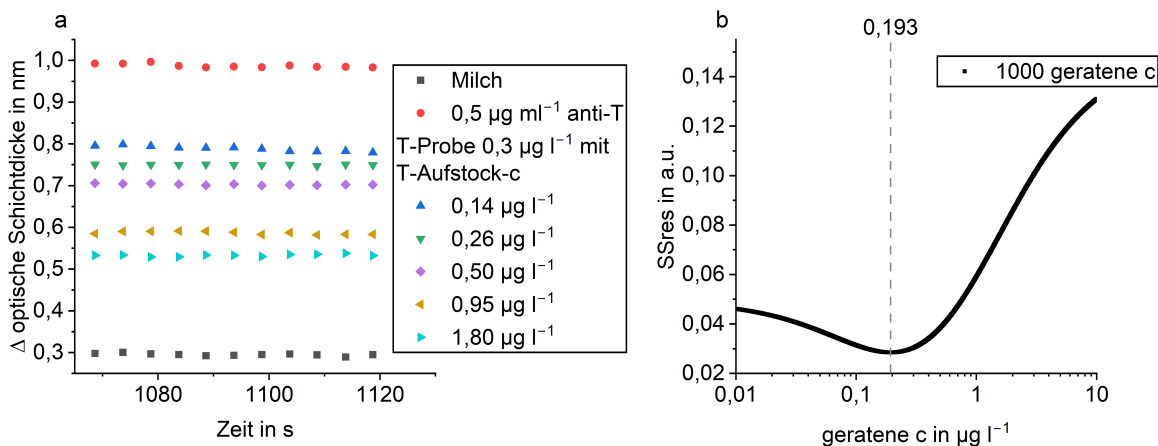


Abbildung 4.39: Aufstockverfahren für Testosteron in Milch. a) Ausgewählter Bereich am Ende der Dissoziation zur Berechnung des Signals; b) SSres aufgetragen gegen die geratene Probenkonzentration und Bestimmung der Probenkonzentration im Minimum.

Für die Auswertung von Testosteron in weiteren Matrices entspricht das Vorgehen der Auswertung für Testosteron in Puffer. Die untersuchten Proben sind $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Speichel (Abbildung 4.40 a)), $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Serum (Abbildung 4.40 b)) und $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Serum (Abbildung 4.40 c)). Für Speichel- und Serummessungen wird eine Leermessung mit der entsprechenden Matrix von den anderen Messungen abgezogen, um die Änderung des Brechungsindex zu korrigieren. Um zu zeigen, dass sich die

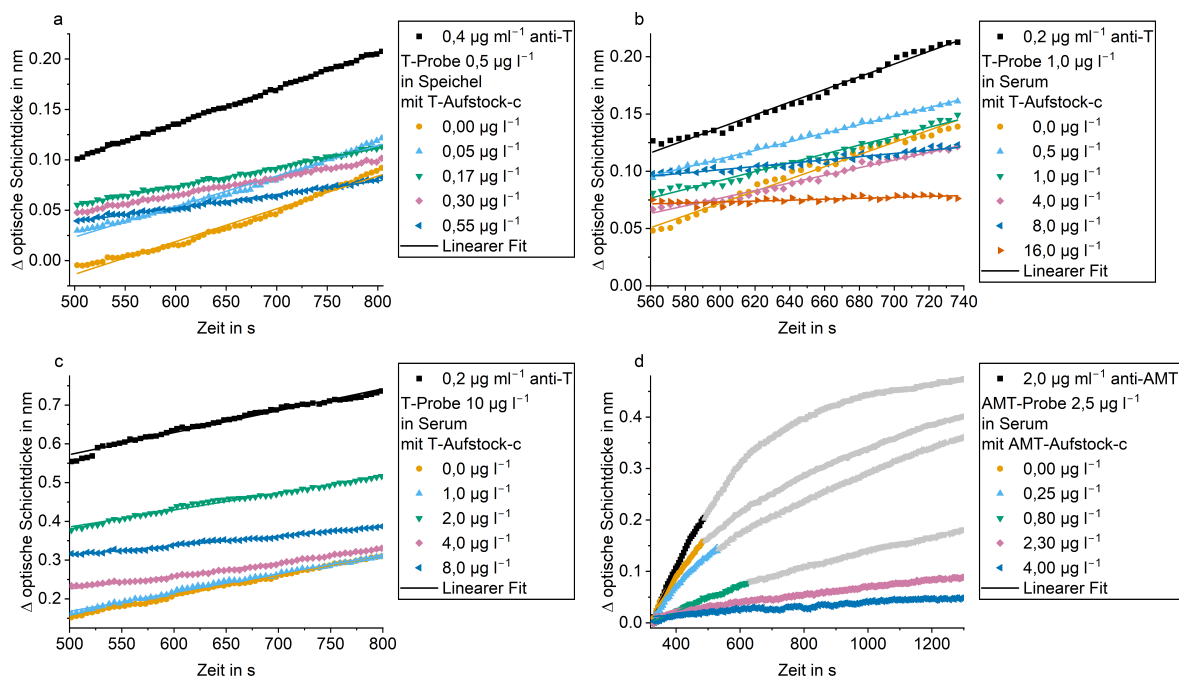


Abbildung 4.40: Aufstockverfahren Testosteron und Amitriptylin in Serum und Speichel. Lineare Regression für ausgewählten Bereich der Assoziationsphase der Messungen für a) Aufstockverfahren für $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Speichel b) Aufstockverfahren für $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Serum, c) Aufstockverfahren für $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Testosteron in Serum, d) Aufstockverfahren für $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ Amitriptylin in Serum.

Methode auch auf andere Analyten übertragen lässt, wird AMT in Serum quantifiziert (Abbildung 4.40 d)). Die Auswertemethode entspricht dem Vorgehen der Testosteronmessungen. Der lineare Bereich der Assoziationsphase wird für die Bestimmung der Steigung mittels linearer Regression verwendet.

Für die Bestimmung der Konzentration wird sowohl das log-log-Verfahren als auch das logit-log-Verfahren angewandt, um die beiden Methoden zu vergleichen. Tabelle 4.6 stellt die erhaltenen Wiederfindungen gegenüber. Mit dem log-log-Ansatz lassen sich die Konzentrationen der Proben nicht richtig bestimmen. Über den logit-log-Ansatz liegen die

Tabelle 4.6: Ergebnisse des Aufstockverfahrens. Wiederfindungsraten (WFR) für Testosteronproben in unterschiedlichen Matrices und AMT in Serum.

Analyt	Matrix	Probenkonzentration in $\mu\text{g l}^{-1}$	Log-log WFR in %	Logit-log WFR in %
Testosteron	Puffer	3,0	233	118
Testosteron	Milch	0,3	202	71
Testosteron	Speichel	0,05	249	70
Testosteron	Serum	10	18740	110
Testosteron	Serum	1,0	-	98
Amitriptylin	Serum	2,5	289	111

Wiederfindungen zwischen 70 und 118 %. Die Genauigkeit der Wiederfindungsraten wird durch den logit-log-Ansatz wesentlich verbessert, mindestens um den Faktor zwei oder sogar um Größenordnungen.

Die Auswertung über logit-log- und log-log-Auftragung zeigt, dass der log-log-Ansatz zur Konzentrationsbestimmung bei diesen Immunoassays nicht geeignet ist. Über den logit-log-Ansatz werden mit 70 bis 118 % akzeptable Wiederfindungsraten erreicht, da Wiederfindungsraten zwischen 70 und 130 % liegen^[115] sollten.

Die Beispielanwendungen des Aufstockverfahrens zeigen, dass das Aufstockverfahren über Bestimmung der besten Linearität bei variierten geschätzten Probenkonzentrationen über logit-log-Auftragung zur Konzentrationsbestimmung in komplexer Matrix geeignet ist. Das Auswerteverfahren ermöglicht, das Aufstockverfahren auf Immunoassays anzuwenden. Um das Aufstockverfahren auf weitere Analyten und Biosensoren zu übertragen, sollte der dynamische Bereich der konventionellen Kalibrierkurve bekannt sein, um geeignete Aufstockkonzentrationen zu wählen. Für die Verdünnung der Probe ist es erforderlich, den Konzentrationsbereich des Analyten in der entsprechenden Probe abschätzen zu können. Die logit-log-Methode lässt sich bei anderen Immunoassays mit einer sigmoidalen Kalibrierkurve verwenden.

Die Einschränkungen des Algorithmus liegen in der erforderlichen Robustheit und Genauigkeit der Messmethode. Die Simulationen zeigten, dass die Standardabweichungen von Messungen unter 3 % liegen sollten. Zu großes statistisches Rauschen (10 %) verhindert eine erfolgreiche Konzentrationsbestimmung. LFAs könnten von dem Aufstockverfahren profitieren, da dieses eine quantitative Analytik ermöglicht. Hierfür ist es jedoch erforderlich, dass die Herstellung und Signalauslesung optimiert wird, sodass geringere Fehler auftreten. Vor allem die optische Auslesung von kolorimetrischen LFAs ist fehleranfällig. Bei der Aufnahme eines Fotos mit Kamera oder Smartphone spiegeln sich Veränderungen in der Beleuchtung in den ermittelten Signalen wider. Die Auslesung über einen Reader erlaubt eine höhere Reproduzierbarkeit, erfordert aber das passende Equipment.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein quantitativer Lateral-Flow-Assay (LFA) für Amitriptylin (AMT) in Serum entwickelt. Für die Auswahl des Erkennungselements des LFAs wurde zunächst eine ausführliche Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) für drei kommerziell erhältliche anti-Amitriptylin Antikörper (anti-AMT Ak) durchgeführt. Der ausgewählte anti-AMT Ak wurde mit Goldnanopartikeln (AuNP) markiert, um einen Bindungshemmtest auf einem LFA durchzuführen. Um eine quantitative Auslesung des LFAs zu ermöglichen, wurde für das Aufstockverfahren eine Auswertemethode für nichtlineare Kalibrierfunktionen entwickelt. Anhand simulierter Daten wurde gezeigt, dass der erarbeitete Algorithmus für das Aufstockverfahren geeignet ist. Die Anwendbarkeit des Algorithmus in der Praxis wurde mit Messungen in einem gut charakterisierten und etablierten Immunoassay demonstriert.

Um Methoden der BIA zu vergleichen, wurden Bindungskurven mit statistischem Rauschen simuliert und mit verschiedenen Methoden ausgewertet. Die Assoziationsratenkonstante wurde aus der scheinbaren Ratenkonstante bestimmt. Dafür wurde die scheinbare Ratenkonstante über monoexponentielle Kurvenanpassung, Linearisierung über die Ableitung und Linearisierung mittels numerischer Integration bestimmt. Diese Auswerteverfahren wurden auf verschiedene Bereiche der Assoziationsphase angewandt, um den Einfluss der Auswahl des auszuwertenden Bereichs auf die Genauigkeit der berechneten Konstanten zu beurteilen. Prinzipiell eigneten sich alle Methoden für die BIA, da sie die simulierten Werte mit Abweichungen unter 10 % richtig berechneten. Es zeigte sich aber, dass die Auswertung über Integration robuster gegenüber Rauschen ist, wobei die Werte zu Beginn der Integration maskiert werden sollten. Die Ableitung verstärkt das Rauschen und ist damit weniger gut für Bindungskurven, die statistisches Rauschen aufweisen, geeignet. Der auszuwertende Bereich sollte so groß wie möglich gewählt werden, um möglichst viele Datenpunkte mit einzubeziehen. Bei Halbierung des Auswertebereichs im Zeitbereich verschlechterte sich die Genauigkeit bis zu einem Faktor 3 bei Auswertung über rückwärts Integration. Bei Einschränkung der ausgewerteten Schichtdicke verschlechterte sich die Genauigkeit bis zu einem Faktor 4 bei Auswertung über vorwärts Integration. Trotz Verringerung des Auswertebereichs lagen die Abweichungen vom richtigen Wert bei maximal 10 %, sodass die Auswertemethoden dennoch als anwendbar gelten können.

Bei der Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante wurde bestätigt, dass der y-Achsenabschnitt bei k_s -Linearisierung fehlerbehaftet ist^[33], wohingegen die Auswertung

der Dissoziationsphase sowohl über Linearisierung als auch über Anpassung einer Exponentialfunktion die Dissoziationsratenkonstante zuverlässig bestimmt. Dabei war es unerheblich, ob alle Konzentrationen in die Auswertung einbezogen wurden oder nur die größte Konzentration, bei der die Dissoziation am besten zu sehen war. Aus Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten konnte die Affinitätskonstante berechnet werden. Die Bestimmung über einen Scatchard-Plot oder mit k_s -Linearisierung bestimmter Dissoziationsratenkonstante lieferte im betrachteten Fall fehlerhafte Affinitätskonstanten. Für die Auswertung der Gleichgewichtsbeladung über den Scatchard-Plot war die Assoziationsphase bei der vorliegenden Kinetik nicht ausreichend lang, sodass die über die Exponentialfunktion bestimmte Gleichgewichtsbeladung mit einem zu großen Fehler behaftet war. Um einen Scatchard-Plot für die Auswertung verwenden zu können, sollte die Assoziationsphase verlängert werden, sodass nach Möglichkeit nahe am Gleichgewicht gemessen wird.

Die gleichen Auswertemethoden wurden auf Messungen von drei anti-AMT Ak angewandt. Für den Vergleich monoklonaler anti-AMT Ak wurden jeweils Bindungskurven mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) aufgenommen und der Bereich der Assoziationsphase, für den eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen werden konnte, ausgewertet. Es wird empfohlen, die Bindungskurven einem Check^[104] zu unterziehen, ob eine Kinetik pseudo-erster Ordnung vorliegt. Der entsprechende Bereich der Assoziationsphase wurde über monoexponentielle Kurvenanpassung, Linearisierung über die Ableitung und Linearisierung über die Integration ausgewertet, um die Assoziationsratenkonstante aus der scheinbaren Ratenkonstante zu bestimmen. Für den anti-AMT Ak 202 mit $2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ wurde im Vergleich zu anti-AMT Ak 8F9 mit $2,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und TU11 mit $1,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ die höchste Assoziationsratenkonstante über die Exponentialfunktion bestimmt. Für die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante wurde die Dissoziationsphase ausgewertet. Dabei traten große Unterschiede bei Auswertung über die Anpassung einer Exponentialfunktion gegenüber Linearisierung auf. Dies lässt sich damit erklären, dass bei der Anbindung des Antikörpers an die Oberfläche Rückbindung auftrat und damit keine Kinetik pseudo-erster Ordnung vorlag. Es wurde gezeigt, dass nur die Exponentialfunktion den Effekt der Rückbindung berücksichtigt, daher beschrieb sie die realen Messdaten besser. Die Auswertung über die Exponentialfunktion ergibt die Dissoziationsratenkonstanten: $0,0018 \text{ s}^{-1}$ für anti-AMT Ak 8F9 $>$ $0,0014 \text{ s}^{-1}$ für anti-AMT Ak 202 $>$ $0,0013 \text{ s}^{-1}$ für anti-AMT Ak TU11. Für einen Bindungshemmtest wäre eine kleine Dissoziationsratenkonstante von Vorteil. Bei anderen Antikörpern wurden geringere Dissoziationsratenkonstanten von $0,0002 \text{ s}^{-1}$ beobachtet^[34]. Dies zeigt, dass alle drei getesteten anti-AMT Ak vergleichsweise schnell dissoziieren. Die bestimmten Affinitätskonstanten lagen bei $2,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ für anti-AMT Ak 202 $>$ $1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ für anti-AMT Ak 8F9 $>$ $1,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ für anti-AMT Ak TU11. Da bei anderen Antikörpern Affinitätskonstanten im Bereich von 10^9 M^{-1} ^[31] berichtet wurden, ist die Affinität der hier verglichenen Antikörper gering. Die höchste Affinität mit höchster Assoziationsratenkonstante wies anti-AMT Ak

202 auf. Daher wurde dieser für die Entwicklung eines LFA ausgewählt.

Der anti-AMT Ak 202 wurde mit verschiedenen synthetischen Strategien an AuNP als Markierung für den LFA angebunden. Der Antikörper konnte über Direktbeschichtung des unveränderten Antikörpers in PBS und TRIS, Direktbeschichtung nach UV-Aktivierung oder TCEP-Reduktion, Anbindung über den Linker PEG und über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung erfolgreich angebunden werden. Die hergestellten anti-AMT Ak-AuNP-Konjugate wurden mit UV/Vis-Spektroskopie, Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und auf den Teststreifen durch Aufnahme von Kalibrierkurven charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass die Direktbeschichtung nach UV-Aktivierung des Antikörpers am besten geeignet war. Die Kalibrierung auf den strukturierten Teststreifen mit Serumproben zeigte, dass die minimal detektierbare Konzentration (engl. *Minimum Detectable Concentration*) (MDC) mit $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ für die Blutspiegelmessung von Patientenproben nach zehnfacher Verdünnung des Serums mit AMT-Konzentrationen von $100 - 200 \text{ ng ml}^{-1}$ [13] geeignet wäre. In RIfS wurde bereits eine Nachweisgrenze $\text{LOD} = 540 \text{ ng l}^{-1}$ erreicht [106], aber eine sehr niedrige Nachweisgrenze ist für Patientenproben nicht notwendig, da die Medikamente in höheren Konzentrationen im Plasma auftreten. Mit strukturähnlichen Trizyklischen Antidepressiva (TZA) traten Kreuzreaktivitäten für anti-AMT Ak 8F9 bei Untersuchungen auf den Teststreifen auf. Dies bestätigt die beobachteten Kreuzreaktivitäten in RIfS [106]. Damit können die Teststreifen zur Bestimmung der Summenkonzentration ähnlich wirkender Antidepressiva im Blut genutzt werden. Die strukturierten Teststreifen eigneten sich sowohl für die Mehrfachbestimmung eines Analyten als auch die Multi-Analyt-Bestimmung verschiedener Analyten auf einem Teststreifen.

Eine Quantifizierung in Immunoassays wird durch Matrixeffekte erschwert, da sich beispielsweise bei personalisierter Medizin die Matrix von Patient zu Patient unterscheidet. Die Matrix in den Kalibriermessungen abzubilden ist aufwändig und in manchen Fällen unmöglich, da beispielsweise die Ernährung zu unspezifischen Effekten führen kann [116]. Eine interne Kalibrierung in der Probenmatrix über das Aufstockverfahren umgeht diese Problematik. Allerdings ist das klassische Aufstockverfahren nur anwendbar, wenn die Kalibrierkurve mit einer Ursprungsgeraden beschrieben werden kann. Bei Immunoassays ist dies nicht der Fall, es treten nichtlineare Kalibrierfunktionen auf. Um das Aufstockverfahren für Immunoassays nutzbar zu machen, wurde ein Auswerteverfahren entwickelt, mit dem nichtlineare Kalibrierfunktionen ausgewertet werden können. Anhand von Simulationen, in denen Signale statistisch verrauscht wurden, wurde festgestellt, dass das Verfahren eine hohe Genauigkeit der Messsignale erfordert. Auf den strukturierten Teststreifen traten aufgrund der händischen Produktion Standardabweichungen von 10% auf, welche für das entwickelte Auswerteverfahren zu groß waren. Um an realen Messungen zu zeigen, dass das Auswerteverfahren bei genaueren Messmethoden anwendbar ist, wurde in einem etablierten Modellassay Testosteron in verschiedenen Matrices über das Aufstockverfahren in RIfS bestimmt. Auch die Bestimmung von AMT in Serum war mit RIfS-Messungen

über das Aufstockverfahren möglich. Die Ergebnisse zeigen, dass das Aufstockverfahren bei genauen Messungen auch für nichtlineare Kalibrierfunktionen angewandt und eine Quantifizierung auch in komplexer Matrix durchgeführt werden können.

Damit LFAs breite Anwendung finden, ist eine zuverlässige Quantifizierung wichtig. Dazu muss die Reproduzierbarkeit der LFAs verbessert werden. Der Einsatz von LFAs im Point-of-Care Testing (POCT) ist in vielen Bereichen möglich und sinnvoll. Der große Vorteil der LFAs liegt in der Kostenersparnis gegenüber teuren Geräten, die nur im Zentrallabor zur Verfügung stehen. Über Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) mit LFAs könnten Patienten schneller und zielgerichteter therapiert und ihre Medikamentendosis individuell angepasst werden. Es würden weniger starke Nebenwirkungen auftreten und der Therapieerfolg schneller eintreten. In dieser Arbeit wurden die Grundsteine gelegt für einen quantitativen LFA für AMT, welche sich auf andere Analyten für weitere Anwendungen übertragen lassen. Die Übertragung des Aufstockverfahrens auf nichtlineare Kalibrierfunktionen kann neue Anwendungen für Immunoassays in der quantitativen Analytik erschließen, da LFAs häufig nur ein qualitatives oder semi-quantitatives Ergebnis liefern. Bei entsprechender Herstellung kann das Aufstockverfahren hier zu einer quantitativen POCT-Analytik beitragen.

Die Strukturierung der Teststreifen in mehrere Kanäle ermöglicht das Aufstockverfahren auf LFAs, da die Aufstockkonzentrationen auf die einzelnen Stege des strukturierten Konjugat-Pads aufgegeben werden können, ohne dass eine Vermischung zwischen verschiedenen Kanälen auftritt. Dafür sollte das Konjugat und die Aufstocklösung über einen Spotter automatisiert aufgegeben werden, um Fehler bei einer händischen Auftragung durch Pipettieren zu vermeiden. Weiterer Optimierungsbedarf liegt im Aufkleben der einzelnen Bestandteile auf die Backing Card und dem händischen Zuschneiden der Streifen. Durch die händische Produktion kann es z. B. Vorkommen, dass die Überlappung der einzelnen Teile nicht immer gleich ist oder die Breite der Pads variiert. Hier könnte eine Schablone zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit beitragen. Eine Untersuchung der Fließgeschwindigkeit auf den Teststreifen sollte außerdem durchgeführt werden, um abschätzen zu können, ob diese über den Teststreifen hinweg in den Kanälen gleich ist. Nur bei gleichen Bedingungen in den verschiedenen Kanälen kann das Aufstockverfahren angewandt werden. Auch bei der Auslesung der Signale gibt es Spielraum für Optimierung. Es wurde festgestellt, dass die ausgelesene Signalintensität von der Kameraposition und der Beleuchtung abhängt. Daher sollte entweder auf ein Auslesegerät zurückgegriffen werden oder die Auslesesoftware verbessert werden, beispielsweise über Referenzfarben, die auf den Teststreifen gedruckt werden, sodass die Software Korrekturen vornehmen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Hiemke und O. Benkert, **2019**, Pharmakokinetik und Arzneimittelinteraktionen, in *Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*, S. 991–1005, Springer, Berlin, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-662-57334-1_16.
- [2] P. A. Routledge und A. D. Hutchings, **2013**, Chapter 9.22 - Therapeutic Drug Monitoring (TDM), in D. G. Wild und R. John, Hrsg., *The Immunoassay Handbook*, S. 945–962, Elsevier, Amsterdam, doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00076-2.
- [3] P. B. Lippa, R. Junker und C. Langer, **2017**, Definitionen und Anwendungsgebiete, in P. B. Lippa und R. Junker, Hrsg., *POCT - Patientennahe Labordiagnostik*, Springer, Berlin, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-662-54196-8_1.
- [4] J. A. Goble und P. T. Rocafort, **2017**, Point-of-Care Testing, *J. Pharm. Pract.* 30(2), 229–237, doi:10.1177/0897190015587696.
- [5] D. Piacentino, E. Bianchi, D. de Donatis, V. Florio und A. Conca, **2022**, Therapeutic drug monitoring of antidepressants: An underused but potentially valuable tool in primary care, *Front. Psychiatry* 13, 867840, doi:10.3389/fpsy.2022.867840.
- [6] E. Eliasson, J. D. Lindh, R. E. Malmström, O. Beck und M.-L. Dahl, **2013**, Therapeutic drug monitoring for tomorrow, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 Suppl 1, 25–32, doi:10.1007/s00228-013-1504-x.
- [7] WHO, **2022**, World Health Statistics 2022: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, URL <https://www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics>.
- [8] Robert Koch-Institut, **2019**, Depressive Symptomatik im europäischen Vergleich: Ergebnisse des European Health Interview Survey (EHIS) 2, *J. Health. Monit.* 4, doi:10.25646/6221.
- [9] C. Hiemke, N. Bergemann, H. W. Clement, A. Conca, J. Deckert, K. Domschke, G. Eckermann, K. Egberts, M. Gerlach, C. Greiner et al., **2018**, Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: Update 2017, *Pharmacopsychiatry* 51, 9–62, doi:10.1055/s-0043-116492.

-
- [10] F. Regen und O. Benkert, **2019**, Antidepressiva, in *Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*, S. 1–208, Springer, Berlin, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-662-57334-1_1.
- [11] A. Freytag, M. Kösters, M. Schmauß, T. Becker und J. Gensichen, **2014**, Pharmakotherapie bei Depression, in J. Klauber, C. Günster, B. Gerste, B.-P. Robra und N. Schmacke, Hrsg., *Versorgungs-Report 2013/2014*, S. 99–123, Schattauer, Stuttgart.
- [12] S. M. R. Wille, S. G. Cooreman, H. M. Neels und W. E. E. Lambert, **2008**, Relevant issues in the monitoring and the toxicology of antidepressants, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 45(1), 25–89, doi:10.1080/10408360701713112.
- [13] G. L. Corona, M. L. Cucchi, P. Frattini, G. Santagostino, S. Schinelli, F. Zerbi und F. Savoldi, **1990**, Aspects of amitriptyline and nortriptyline plasma levels monitoring in depression, *Psychopharmacology* 100(3), 334–338, doi:10.1007/BF02244602.
- [14] F. A. Beierle und R. W. Hubbard, **1983**, Liquid chromatographic separation of antidepressant drugs: I. Tricyclics, *Ther. Drug Monit.* 5(3), 279–292.
- [15] C. Ziegler und W. Göpel, **1998**, Biosensor development, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(5), 585–591, doi:10.1016/S1367-5931(98)80087-2.
- [16] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano und P. Estrela, **2016**, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60(1), 1–8, doi:10.1042/EBC20150001.
- [17] J. N. Roe, **1992**, Biosensor development, *Pharm. Res.* 9(7), 835–844, doi:10.1023/A:1015828311073.
- [18] A. S. John und C. P. Price, **2014**, Existing and emerging technologies for point-of-care testing, *Clin. Biochem. Rev.* 35(3), 155–167.
- [19] DIALUNOX, **19.09.2022**, Rapid Test Reader | ESEQuant Flex, URL <https://www.lateralflowreader.com/esequant-flex/>.
- [20] Hund Wetzlar, **16.11.2022**, LFT 100 - Lateral Flow Tester, URL <https://www.hund.de/de/aktuelles/826-lft-100-lateral-flow-tester>.
- [21] VedaLab, **16.11.2022**, Easy Reader+, URL <https://www.vedalab.com/product/poc-instrument/>.
- [22] S. H. Ang, M. Rambeli, T. M. Thevarajah, Y. B. Alias und S. M. Khor, **2016**, Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine, *Biosens. Bioelectron.* 78, 187–193, doi:10.1016/j.bios.2015.11.045.
-

- [23] A. H. A. Hassan, J. F. Bergua, E. Morales-Narváez und A. Mekoçi, **2019**, Validity of a single antibody-based lateral flow immunoassay depending on graphene oxide for highly sensitive determination of *E. coli* O157:H7 in minced beef and river water, *Food Chem.* 297, 124965, doi:10.1016/j.foodchem.2019.124965.
- [24] S. Lee, V. Oncescu, M. Mancuso, S. Mehta und D. Erickson, **2014**, A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels, *Lab Chip* 14(8), 1437–1442, doi:10.1039/C3LC51375K.
- [25] K. H. Foysal, S. E. Seo, M. J. Kim, O. S. Kwon und J. W. Chong, **2019**, Analyte quantity detection from lateral flow assay using a smartphone, *Sensors* 19(21), doi:10.3390/s19214812.
- [26] E. Liddell, **2013**, Chapter 3.1 Antibodies, in D. G. Wild und R. John, Hrsg., *The Immunoassay Handbook*, S. 245–265, Elsevier, Amsterdam.
- [27] S. Ansorge und M. Täger, **2022**, Immunologie, in P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, H.-G. Koch, G. Löffler und P. E. Petrides, Hrsg., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Lehrbuch, S. 1179–1222, Springer, Berlin, doi:10.1007/978-3-662-60266-9_70.
- [28] M. Reth, **2013**, Matching cellular dimensions with molecular sizes, *Nat. Immunol.* 14(8), 765–767, doi:10.1038/ni.2621.
- [29] K. M. Murphy und C. Weaver, **2018**, *Janeway Immunologie*, Lehrbuch, Springer Spektrum, Berlin, 9 Aufl., doi:10.1007/978-3-662-56004-4.
- [30] G. Proll und M. Ehni, **2014**, Immunoassays, in Günter Gauglitz, David S. Moore, Hrsg., *Handbook of Spectroscopy*, S. 1313–1334, John Wiley & Sons, Ltd, doi:10.1002/9783527654703.ch36.
- [31] I. Chaiken, S. Rosé und R. Karlsson, **1992**, Analysis of macromolecular interactions using immobilized ligands, *Anal. Biochem.* 201(2), 197–210, doi:10.1016/0003-2697(92)90329-6.
- [32] D. G. Myszka, **1999**, Improving biosensor analysis, *J. Mol. Recognit.* 12(5), 279–284, doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<279::AID-JMR473>3.0.CO;2-3.
- [33] D. J. O’Shannessy, M. Brigham-Burke, K. K. Soneson, P. Hensley und I. Brooks, **1993**, Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: Use of nonlinear least squares analysis methods, *Anal. Biochem.* 212(2), 457–468, doi:10.1006/abio.1993.1355.

-
- [34] R. Karlsson, A. Michaelsson und L. Mattsson, **1991**, Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system, *J. Immunol. Methods* 145(1-2), 229–240, doi:10.1016/0022-1759(91)90331-9.
- [35] C. M. Pandey und B. D. Malhotra, **2019**, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, De Gruyter, Berlin, Boston, 2 Aufl..
- [36] V. Gold, Hrsg., **1997**, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2 Aufl., doi:10.1351/goldbook.
- [37] H.-M. Schmitt, A. Brecht, J. Piehler und G. Gauglitz, **1997**, An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosens. Bioelectron.* 12(8), 809–816, doi:10.1016/S0956-5663(97)00046-8.
- [38] B. Liedberg, C. Nylander und I. Lundström, **1995**, Biosensing with surface plasmon resonance—how it all started, *Biosens. Bioelectron.* 10(8), i–ix, doi:10.1016/0956-5663(95)96965-2.
- [39] A. Brandenburg, R. Polzius, F. Bier, U. Bilitewski und E. Wagner, **1996**, Direct observation of affinity reactions by reflected-mode operation of integrated optical grating coupler, *Sens. Actuators B Chem.* 30(1), 55–59, doi:10.1016/0925-4005(95)01747-J.
- [40] C. J. Fee, **2013**, Label-free, real-time interaction and adsorption analysis 2: Quartz crystal microbalance, *Methods Mol. Biol.* 996, 313–322, doi:10.1007/978-1-62703-354-1_18.
- [41] M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz und G. Proll, **2013**, A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera, *Anal. Bioanal. Chem.* 405(20), 6461–6469, doi:10.1007/s00216-013-7040-9.
- [42] J. Concepcion, K. Witte, C. Wartchow, S. Choo, D. Yao, H. Persson, J. Wei, P. Li, B. Heidecker, W. Ma et al., **2009**, Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12(8), 791–800, doi:10.2174/138620709789104915.
- [43] W. Stöcker und W. Schlumberger, **2019**, Biosensoren, in A. M. Gressner und T. Arndt, Hrsg., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin, Berlin, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-662-48986-4_570.
- [44] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus und W. Nahm, **1993**, Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers, *Sens. Actuators B Chem.* 11(1-3), 21–27, doi:10.1016/0925-4005(93)85234-2.
-

- [45] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf und A. van Amerongen, **2009**, Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Anal. Bioanal. Chem.* 393(2), 569–582, doi:10.1007/s00216-008-2287-2.
- [46] K. M. Koczula und A. Gallotta, **2016**, Lateral flow assays, *Essays Biochem.* 60(1), 111–120, doi:10.1042/EBC20150012.
- [47] M. Pohanka, **2021**, Point-of-care diagnoses and assays based on lateral flow test, *Int. J. Anal. Chem.* 2021, 1–9, doi:10.1155/2021/6685619.
- [48] Ratiopharm, **16.06.2023**, autotest VIH® - ratiopharm GmbH, URL <https://www.ratiopharm.de/ratgeber/hiv-und-aids/autotest-vih.html>.
- [49] Roche, **16.06.2023**, SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test zur Selbstanwendung | roche.de, URL <https://www.roche.de/patienten-betroffene/informationen-zu-krankheiten/covid-19/sars-cov-2-rapid-antigen-test-patienten-n>.
- [50] Abbott, **16.06.2023**, BinaxNOW Malaria | Abbott Point of Care, URL <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/binaxnow-malaria.html>.
- [51] clearblue, **03.06.2023**, Schwangerschaftstests: Digitale Tests, Sticks und Kits - Clearblue, URL <https://de.clearblue.com/schwangerschaftstests>.
- [52] ALFA, **19.08.2020**, Alfa's Instant-View Multi-Drug Urine Test, URL <https://www.alfascientific.com/products/multi-drug-urine-tests/>.
- [53] PRIMA, **04.11.2022**, Rapid drug detection test, URL <https://www.medicalexpo.com/prod/prima-lab/product-99429-706870.html>.
- [54] WHO, **2020**, The selection and use of essential in vitro diagnostics: Report of the third meeting of the WHO Strategic Advisory Group of Experts on In Vitro Diagnostics, 2020: WHO Technical Report Series, No. 1031, 2021, URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019102>.
- [55] R. W. Peeling, D. Mabey, A. Herring und E. W. Hook, **2006**, Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections?, *Nat. Rev. Microbiol.* 4(12), 909–921, doi:10.1038/nrmicro1555.
- [56] WHO, **16.06.2023**, Sexual and Reproductive Health and Research (SRH): Point-Of-Care Diagnostic Tests (POCTs) for Sexually Transmitted Infections (STIs), URL [https://www.who.int/teams/sexual-and-reproductive-health-and-research-\(srh\)/areas-of-work/sexual-health/sexually-transmitted-infections/point-of-care-tests](https://www.who.int/teams/sexual-and-reproductive-health-and-research-(srh)/areas-of-work/sexual-health/sexually-transmitted-infections/point-of-care-tests).

-
- [57] B. O'Farrell, **2009**, Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems, in R. Wong und H. Tse, Hrsg., *Lateral Flow Immunoassay*, S. 1–33, Humana Totowa, NJ, doi:10.1007/978-1-59745-240-3_1.
- [58] P. Nuntawong, W. Putalun, H. Tanaka, S. Morimoto und S. Sakamoto, **2022**, Lateral flow immunoassay for small-molecules detection in phytoproducts: a review, *J. Nat. Med.* 76(3), 521–545, doi:10.1007/s11418-022-01605-6.
- [59] X. Huang, Z. P. Aguilar, H. Xu, W. Lai und Y. Xiong, **2016**, Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review, *Biosens. Bioelectron.* 75, 166–180, doi:10.1016/j.bios.2015.08.032.
- [60] C. Parolo, A. Sena-Torralba, J. F. Bergua, E. Calucho, C. Fuentes-Chust, L. Hu, L. Rivas, R. Álvarez-Diduk, E. P. Nguyen, S. Cinti et al., **2020**, Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays, *Nat. Protoc.* 15(12), 3788–3816, doi:10.1038/s41596-020-0357-x.
- [61] D. Quesada-González und A. Merkoçi, **2015**, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 73, 47–63, doi:10.1016/j.bios.2015.05.050.
- [62] A. Jaisankar, S. Krishnan und L. Rangasamy, **2022**, Recent developments of aptamer-based lateral flow assays for point-of-care (POC) diagnostics, *Anal. Biochem.* 655, 114874, doi:10.1016/j.ab.2022.114874.
- [63] Y. Deng, H. Jiang, X. Li und X. Lv, **2021**, Recent advances in sensitivity enhancement for lateral flow assay, *Microchim. Acta* 188(11), 379, doi:10.1007/s00604-021-05037-z.
- [64] T. S. Le, S. He, M. Takahashi, Y. Enomoto, Y. Matsumura und S. Maenosono, **2021**, Enhancing the sensitivity of lateral flow immunoassay by magnetic enrichment using multifunctional nanocomposite probes, *Langmuir* 37(21), 6566–6577, doi:10.1021/acs.langmuir.1c00905.
- [65] F. Di Nardo, M. Chiarello, S. Cavalera, C. Baggiani und L. Anfossi, **2021**, Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives, *Sensors* 21(15), 5185, doi:10.3390/s21155185.
- [66] L. Huang, S. Tian, W. Zhao, K. Liu, X. Ma und J. Guo, **2020**, Multiplexed detection of biomarkers in lateral-flow immunoassays, *Analyst* 145(8), 2828–2840, doi:10.1039/C9AN02485A.
- [67] L. Anfossi, F. Di Nardo, S. Cavalera, C. Giovannoli und C. Baggiani, **2018**, Multiplex lateral flow immunoassay: an overview of strategies towards high-throughput point-of-need testing, *Biosensors* 9(1), doi:10.3390/bios9010002.
-

- [68] Y. Wu, Y. Zhou, Y. Leng, W. Lai, X. Huang und Y. Xiong, **2020**, Emerging design strategies for constructing multiplex lateral flow test strip sensors, *Biosens. Bioelectron.* 157, 112168, doi:10.1016/j.bios.2020.112168.
- [69] E. Eltzov, S. Guttel, A. Low Yuen Kei, P. D. Sinawang, R. E. Ionescu und R. S. Marks, **2015**, Lateral flow immunoassays - from paper strip to smartphone technology, *Electroanalysis* 27(9), 2116–2130, doi:10.1002/elan.201500237.
- [70] M. A. Morales und J. M. Halpern, **2018**, Guide to selecting a bio-recognition element for biosensors, *Bioconjugate Chem.* 29(10), 3231–3239, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.
- [71] J.-M. Montenegro, V. Grazu, A. Sukhanova, S. Agarwal, J. M. de La Fuente, I. Nabiev, A. Greiner und W. J. Parak, **2013**, Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(5), 677–688, doi:10.1016/j.addr.2012.12.003.
- [72] A. K. Trilling, J. Beekwilder und H. Zuilhof, **2013**, Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview, *Analyst* 138(6), 1619–1627, doi:10.1039/C2AN36787D.
- [73] L. Zhang, Y. Mazouzi, M. Salmain, B. Liedberg und S. Boujday, **2020**, Antibody-gold nanoparticle bioconjugates for biosensors: synthesis, characterization and selected applications, *Biosens. Bioelectron.* 165, 112370, doi:10.1016/j.bios.2020.112370.
- [74] S. Thobhani, S. Attree, R. Boyd, N. Kumarswami, J. Noble, M. Szymanski und R. A. Porter, **2010**, Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins, *J. Immunol. Methods* 356(1-2), 60–69, doi:10.1016/j.jim.2010.02.007.
- [75] F. Di Nardo, S. Cavalera, C. Baggiani, C. Giovannoli und L. Anfossi, **2019**, Direct vs mediated coupling of antibodies to gold nanoparticles: The case of salivary cortisol detection by lateral flow immunoassay, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11(36), 32758–32768, doi:10.1021/acsami.9b11559.
- [76] S. A. Bhakta, E. Evans, T. E. Benavidez und C. D. Garcia, **2015**, Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: a review, *Anal. Chim. Acta* 872, 7–25, doi:10.1016/j.aca.2014.10.031.
- [77] S. Okyem, O. Awotunde, T. Ogunlusi, M. B. Riley und J. D. Driskell, **2021**, Probing the mechanism of antibody-triggered aggregation of gold nanoparticles, *Langmuir* 37(9), 2993–3000, doi:10.1021/acs.langmuir.1c00100.
- [78] G. Ruiz, K. Tripathi, S. Okyem und J. D. Driskell, **2019**, pH impacts the orientation of antibody adsorbed onto gold nanoparticles, *Bioconjugate Chem.* 30(4), 1182–1191, doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00123.

-
- [79] B. Della Ventura, M. Banchelli, R. Funari, A. Illiano, M. de Angelis, P. Taroni, A. Amoresano, P. Matteini und R. Velotta, **2019**, Biosensor surface functionalization by a simple photochemical immobilization of antibodies: Experimental characterization by mass spectrometry and surface enhanced Raman spectroscopy, *Analyst* 144(23), 6871–6880, doi:10.1039/C9AN00443B.
- [80] M. T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux und S. B. Petersen, **2006**, Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces, *Protein Sci.* 15(2), 343–351, doi:10.1110/ps.051885306.
- [81] R. Funari, B. Della Ventura, C. Altucci, A. Offenhäusser, D. Mayer und R. Velotta, **2016**, Single molecule characterization of UV-activated antibodies on gold by atomic force microscopy, *Langmuir* 32(32), 8084–8091, doi:10.1021/acs.langmuir.6b02218.
- [82] A. Makaraviciute, C. D. Jackson, P. A. Millner und A. Ramanaviciene, **2016**, Considerations in producing preferentially reduced half-antibody fragments, *J. Immunol. Methods* 429, 50–56, doi:10.1016/j.jim.2016.01.001.
- [83] H. Sharma und R. Mutharasan, **2013**, Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity, *Anal. Chem.* 85(4), 2472–2477, doi:10.1021/ac3035426.
- [84] A. C. Marques, P. J. Costa, S. Velho und M. H. Amaral, **2020**, Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies, *J. Control. Release* 320, 180–200, doi:10.1016/j.jconrel.2020.01.035.
- [85] T. Liu und B. Thierry, **2012**, A solution to the PEG dilemma: Efficient bioconjugation of large gold nanoparticles for biodiagnostic applications using mixed layers, *Langmuir* 28(44), 15634–15642, doi:10.1021/la301390u.
- [86] N. M. Green, **1975**, Avidin, in C. B. Anfinsen, J. T. Edsall und F. M. Richards, Hrsg., *Advances in Protein Chemistry*, Bd. 29, S. 85–133, Academic Press, doi:10.1016/S0065-3233(08)60411-8.
- [87] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte und A. Ramanavicius, **2010**, Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor, *Anal. Chem.* 82(15), 6401–6408, doi:10.1021/ac100468k.
- [88] R. F. Hallett, **1994**, Particle size analysis by dynamic light scattering, *Food Res. Int.* 27(2), 195–198, doi:10.1016/0963-9969(94)90162-7.
- [89] R. Pecora, **2000**, Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids, *J. Nanopart. Res.* 2(2), 123–131, doi:10.1023/A:1010067107182.
-

- [90] S. Bhattacharjee, **2016**, DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *J. Control. Release* 235, 337–351, doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [91] J. Stetefeld, S. A. McKenna und T. R. Patel, **2016**, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8(4), 409–427, doi:10.1007/s12551-016-0218-6.
- [92] U. Andreasson, A. Perret-Liaudet, L. J. C. van Waalwijk Doorn, K. Blennow, D. Chiasserini, S. Engelborghs, T. Fladby, S. Genc, N. Kruse, H. B. Kuiperij et al., **2015**, A practical guide to immunoassay method validation, *Front. Neurol.* 6, 179, doi:10.3389/fneur.2015.00179.
- [93] W. G. Wood, **1991**, “Matrix Effects” in immunoassays, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 51(sup205), 105–112, doi:10.3109/00365519109104608.
- [94] M. Bader, **1980**, A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis, *J. Chem. Educ.* 57(10), 703, doi:10.1021/ed057p703.
- [95] European Medicines Agency, **2023-06-28**, ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis: EMA/CHMP/ICH/172948/2019, URL <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>.
- [96] S. L. R. Ellison und M. Thompson, **2008**, Standard additions: Myth and reality, *Analyst* 133(8), 992–997, doi:10.1039/B717660K.
- [97] M. Conrad, G. Proll, E. Builes-Münden, A. Dietzel, S. Wagner und G. Gauglitz, **2023**, Tools to compare antibody gold nanoparticle conjugates for a small molecule immunoassay, *Microchim. Acta* 190(2), 62, doi:10.1007/s00604-023-05637-x.
- [98] S.-H. Paek, C.-W. Lee, S.-H. Yook, O.-H. Kwon und Y.-N. Park, **1999**, Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for salmonella typhimurium, *Anal. Lett.* 32(2), 335–360, doi:10.1080/00032719908542824.
- [99] M. A. O’Connell, B. A. Belanger und P. D. Haaland, **1993**, Calibration and assay development using the four-parameter logistic model, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 20(2), 97–114, doi:10.1016/0169-7439(93)80008-6.
- [100] J. Piehler, **1997**, *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, Shaker Verlag, Aachen.
- [101] T. A. Morton und D. G. Myszka, **1998**, Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, doi:10.1016/S0076-6879(98)95044-3.

-
- [102] R. Karlsson und A. Fält, **1997**, Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors, *J. Immunol. Methods* 200(1-2), 121–133, doi:10.1016/S0022-1759(96)00195-0.
- [103] C. Albrecht, **2011**, *Vergleichende Entwicklung verschiedener Assays für die medizinische Diagnostik und Charakterisierung der funktionellen Oberflächen*, Rhombos, Berlin.
- [104] P. Schuck und A. P. Minton, **1996**, Kinetic analysis of biosensor data: Elementary tests for self-consistency, *Trends Biochem. Sci.* 21(12), 458–460, doi:10.1016/s0968-0004(96)20025-8.
- [105] V. R. Sarma, E. W. Silvertown, D. R. Davies und W. D. Terry, **1971**, The three-dimensional structure at 6 Å resolution of a human γ G1 immunoglobulin molecule, *J. Biol. Chem.* 246(11), 3753–3759, doi:10.1016/s0021-9258(18)62192-1.
- [106] A. K. Krieg und G. Gauglitz, **2015**, Ultrasensitive label-free immunoassay for optical determination of amitriptyline and related tricyclic antidepressants in human serum, *Anal. Chem.* 87(17), 8845–8850, doi:10.1021/acs.analchem.5b01895.
- [107] Y. Zhao, H. Wang, P. Zhang, C. Sun, X. Wang, X. Wang, R. Yang, C. Wang und L. Zhou, **2016**, Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay, *Sci. Rep* 6, 21342, doi:10.1038/srep21342.
- [108] A. van Amerongen, J. Veen, H. A. Arends und M. Koets, **2018**, Chapter 7 - Lateral Flow Immunoassays, in S. K. Vashist und J. H. T. Luong, Hrsg., *Handbook of immunoassay technologies*, S. 157–182, Academic Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00007-4.
- [109] N. A. Taranova, N. A. Byzova, V. V. Zaiko, T. A. Starovoitova, Y. Y. Vengerov, A. V. Zherdev und B. B. Dzantiev, **2013**, Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse, *Microchim. Acta* 180(11-12), 1165–1172, doi:10.1007/s00604-013-1043-2.
- [110] J. Wang, C. Jiang, J. Yuan, L. Tong, Y. Wang, D. Zhuo, L. Huang, W. Ni, J. Zhang, M. Huang et al., **2022**, Hue recognition competitive fluorescent lateral flow immunoassay for aflatoxin M1 detection with improved visual and quantitative performance, *Anal. Chem.* 94(30), 10865–10873, doi:10.1021/acs.analchem.2c02020.
- [111] S. Pang und S. Cowen, **2017**, A generic standard additions based method to determine endogenous analyte concentrations by immunoassays to overcome complex biological matrix interference, *Sci. Rep* 7(1), 17542, doi:10.1038/s41598-017-17823-y.
-

- [112] H. Abeliovich, **2005**, An empirical extremum principle for the hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity, *Biophys. J.* 89(1), 76–79, doi:10.1529/biophysj.105.060194.
- [113] H. Prinz, **2010**, Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms, *J. Chem. Biol.* 3(1), 37–44, doi:10.1007/s12154-009-0029-3.
- [114] S. Rau und G. Gauglitz, **2012**, Reflectometric interference spectroscopy (RIfS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration, *Anal. Bioanal. Chem.* 402(1), 529–536, doi:10.1007/s00216-011-5470-9.
- [115] K. L. Cox, V. Devanarayan, A. Kriaucinas, J. Manetta, C. Montrose und S. Sittampalam, **2004**, Immunoassay Methods, in S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin et al., Hrsg., *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- [116] P. R. Oldfield, **2014**, Understanding the matrix effect in immunoassays, *Bioanalysis* 6(11), 1425–1427, doi:10.4155/bio.14.77.

Abkürzungsverzeichnis

AMT	Amitriptylin
anti-AMT Ak	anti-Amitriptylin Antikörper
AuNP	Goldnanopartikel
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
CBZ	Carbamazepin
CLOM	Clomipramin
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DOX	Doxepin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i>)
GA	Glutarsäureanhydrid
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GOPTS	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan
Ig	Immunglobulin
IMI	Imipramin
LFA	Lateral-Flow-Assay
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>Limit of Detection</i>)

MDC	minimal detektierbare Konzentration (engl. <i>Minimum Detectable Concentration</i>)
MEA	2-Mercaptoethylamin
MNP	magnetische Nanopartikel
MUA	Mercaptoundecansäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NRT	Nortriptylin
NRT-BSA	Nortriptylin-Rinderserumalbumin-Konjugat
OPP	Opipramol
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PdI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PEG-DA	Diamino-Polyethylenglykol
PEG-MA	α -Methoxy- ω -amino-Polyethylenglykol
POCT	Point-of-Care Testing
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage (engl. <i>Quartz Crystal Microbalance</i>)
RDL	zuverlässige Erkennungsgrenze (engl. <i>Reliable Detection Limit</i>)
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RT	Raumtemperatur
SAuNP	Streptavidin-Goldnanopartikel
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SSres	Residuenquadratsumme
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin

TDM Therapeutisches Drug Monitoring

TRIM Trimipramin

TZA Trizyklische Antidepressiva

Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur eines Antikörpers der IgG-Klasse	5
2.2	Prinzip verschiedener Immunoassay-Testformate	8
2.3	Antikörper-Antigen-Wechselwirkung an einer Grenzfläche	10
2.4	Schematische Darstellung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie .	14
2.5	Schematische Darstellung eines Lateral-Flow-Assays	15
2.6	Schematische Darstellung von Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugaten . .	18
2.7	Prinzip Aufstockverfahren	21
3.1	Schematische Darstellung der verwendeten RIfS-Anlage	29
3.2	Strukturierte Teststreifen	34
3.3	Maße der Teststreifen	35
3.4	Einstellungen im Advanced Grid für Kontaktpotter	35
4.1	Simulierte Bindungskurven	44
4.2	Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante durch Linearisierung	45
4.3	k_s -Linearisierung für simulierte Bindungskurven	46
4.4	Relative Abweichung bei Bestimmung der Assoziationsratenkonstante . . .	47
4.5	Relative Abweichung bei Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante . . .	48
4.6	Scatchard-Plot zur Bestimmung der Affinitätskonstante	49
4.7	Relative Abweichung bei Bestimmung der Affinitätskonstante	50
4.8	RIfS-Messungen mit und ohne Luftblasentrennung	52
4.9	RIfS-Messungen bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten	52
4.10	RIfS-Messungen der anti-Amitriptylin Antikörper 202, TU11 und 8F9 . . .	53
4.11	Überprüfung auf Kinetik pseudo-erster Ordnung	54
4.12	Schema Biomolekulare Interaktionsanalyse	55
4.13	Auswertung der Assoziationsphase über die Ableitung	57
4.14	Auswertung der Assoziationsphase über exponentielle Kurvenanpassung . .	58
4.15	Auswertung der Assoziationsphase über Integration	59
4.16	k_s -Linearisierung für Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9	60
4.17	Assoziationsratenkonstanten für Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9	61
4.18	Bestimmung von k_d über nichtlineare Kurvenanpassung	62

4.19	Bestimmung von k_d mittels Linearisierung	63
4.20	Bestimmung von k_d aus der Dissoziationsphase von 500 nM Antikörper . .	64
4.21	Dissoziationsratenkonstanten für Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9	65
4.22	Scatchard-Plot für Ak 202 und Ak TU11	66
4.23	Affinitätskonstanten für Ak 202, Ak TU11 und Ak 8F9	67
4.24	UV/Vis-Spektren der synthetisierten Konjugate	72
4.25	Ausbeute und Wellenlängenverschiebung der Konjugate	73
4.26	Hydrodynamischer Durchmesser der Konjugate	74
4.27	Foto der Teststreifen einer Kalibrierung	76
4.28	Kalibrierung mit UV-Konjugat	77
4.29	MDC und RDL der Kalibrierungen mit verschiedenen Konjugaten	77
4.30	Testlinienintensität bei verschiedenen Spottingbedingungen	78
4.31	Teststreifen-Video Farbdaten	80
4.32	Kalibrierung auf Teststreifen in Puffer und Serum	81
4.33	Strukturen der auf Kreuzreaktivität untersuchten Substanzen	82
4.34	Relative Inhibition von verschiedenen Analyten	82
4.35	Multi-Analyt-Kalibrierung	83
4.36	Kalibrierung nach magnetischer Separation	85
4.37	RIfS-Messungen für Aufstockverfahren	91
4.38	Auswerteverfahren Standardaddition für Testosteron in PBS gemessen in RIfS	92
4.39	Aufstockverfahren für Testosteron in Milch	93
4.40	Aufstockverfahren Testosteron und Amitriptylin in Serum und Speichel . .	94

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht Testformate	9
3.1	Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
3.2	Verwendete Chemikalien	24
3.3	Verwendete Puffer	25
3.4	Verwendete Proteine und Antikörper	26
3.5	Angaben zu der verwendeten Software	27
3.6	Angaben zu den verwendeten Geräten	28
3.7	RIfS-Programm für die biomolekulare Interaktionsanalyse	32
3.8	RIfS-Programm für Aufstockmessungen	41
3.9	Probenzusammensetzung für Aufstockmessungen	42
4.1	Bewertung der Auswertungsmethoden zur Bestimmung von k_a	48
4.2	Vergleich der Konstanten	68
4.3	Konjugat-Charakterisierung	75
4.4	Ergebnisse Simulation des Aufstockverfahrens	88
4.5	Ergebnisse Simulation des Aufstockverfahrens mit Rauschen	90
4.6	Ergebnisse des Aufstockverfahrens	94
A.1	Fit-Parameter zu Abbildung 4.2	124
A.2	Fit-Parameter zu Abbildung 4.3	124
A.3	Fit-Parameter zu Abbildung 4.16	124
A.4	Fit-Parameter zu Abbildung 4.19	124
A.5	Fit-Parameter zu Abbildung 4.20 a)	125
A.6	Fit-Parameter zu Abbildung 4.20 b)	125
A.7	Fit-Parameter zu Abbildung 4.22	125
A.8	Fit-Parameter der logistischen Funktion zu den Kalibrierungen auf Lateral- Flow-Assays (LFAs)	125

A. Anhang

A.1 Matlab-Skript

```
function [simsignal] = sigmoidal(A1,A2,x0,p,clarge)
%sigmoidal calibration curve
% This function will give the signal for a sigmoidal calibration curve for
% a binding inhibition test
simsignal=A2+(A1-A2)./(1+(clarge./x0).^p);
end

function [simsignal] = monovalent(c_0R,c,K)
%bivalent calibration curve
% This function will give the normalized number of receptors with free
% binding sites for a receptor with one binding site

simsignal=((c_0R-c-1./K)./2+sqrt((c_0R+c+1./K).^2/4-c.*c_0R))./c_0R;
end

function [simsignal] = bivalent(c_0R,c,K)
%bivalent calibration curve
% This function will give the normalized number of receptors with free
% binding sites for a receptor with two binding sites (for example
% IgG)
simsignal=(c_0R./2-((c_0R+c+1./K)./2-sqrt((c_0R+c+1./K).^2/4-c.*c_0R)).^2)/(2.*c_0R))./c_0R.*2;
end

function [c_EC] = EC(c_0R,c,K,EC)
%bivalent concentration for EC calculation
% This function will give the concentration of a given EC for a bivalent
% receptor
c_EC=((sqrt(-c_0R.^2.*K.^2.*EC^3+c_0R^2.*K.^2.*EC.^2-2.*c_0R.*K.*EC.^2+2.*c_0R.*K.*EC-EC+1))./K-EC./K+1./K)./EC;
end
```

```

1 %Test mit log-logit
2
3 clc;
4 clear;
5 %create dialog box to ask for the calibration function to be used to
6 %calculate the simulated signals
7 prompt=('Choose the calibration function used for this test: 1 monovalent, 2
bivalent, 3 sigmoidal');
8 % text in dialog box
9 dlgtitle='calibration function'; %title of dialog box
10 dims=[1 40]; %size of dialog box
11 definput={'1'};%default input value, if no option is chosen it will take the
monovalent calibration function
12 opts.Interpreter='tex';
13 answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
14 simcal=str2num(answer{1});
15 %%
16 %monovalent calibration function
17 if simcal == 1
18     prompt=('choose the antibody concentration in nM');% text in dialog box
19     dlgtitle='antibody concentration'; %title of dialog box
20     dims=[1 40]; %size of dialog box
21     definput={'1'};%default input value
22     opts.Interpreter='tex';
23     answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
24     c_0R=str2num(answer{1})*10^-9;
25
26     prompt=('choose the affinity constant in 10^{8} 1/M');% text in dialog box
27     dlgtitle='antibody concentration'; %title of dialog box
28     dims=[1 40]; %size of dialog box
29     definput={'1'};%default input value
30     opts.Interpreter='tex';
31     answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
32     K = str2num(answer{1})*10^8;
33     %Pihler Formel
34     clarge=logspace(-10,-5).';%concentrations for calibration curve
35     simsignal=monovalent(c_0R,clarge,K);%calibration curve
36     %concentration at specific inhibition
37     EC50=-(0.5-1)*(c_0R*K*0.5+1)/(K*0.5);
38     EC10=-(0.9-1)*(c_0R*K*0.9+1)/(K*0.9);
39     EC20=-(0.8-1)*(c_0R*K*0.8+1)/(K*0.8);
40     EC90=-(0.1-1)*(c_0R*K*0.1+1)/(K*0.1);
41 end
42 %%
43 %bivalent calibration function
44 if simcal == 2
45     prompt=('choose the antibody concentration in nM');% text in dialog box
46     dlgtitle='antibody concentration'; %title of dialog box
47     dims=[1 40]; %size of dialog box
48     definput={'1'};%default input value
49     opts.Interpreter='tex';
50     answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
51     c_0R=str2num(answer{1})*10^-9;
52
53     prompt=('choose the affinity constant in 10^{8} 1/M');% text in dialog box
54     dlgtitle='affinity constant'; %title of dialog box
55     dims=[1 40]; %size of dialog box
56     definput={'1'};%default input value

```

```
57     opts.Interpreter='tex';
58     answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
59     K = str2num(answer{1})*10^8;
60     %Pihler Formel
61     clarge=logspace(-9,-5).';%definition of concentrations to calculate the
calibration curve
62     simsignal=bivalent(c_0R,clarge,K); %calibration curve
63     %concentration at specific inhibition
64     EC10=EC_bivalent(c_0R,clarge,K,0.9);
65     EC50=EC_bivalent(c_0R,clarge,K,0.5);
66     EC90=EC_bivalent(c_0R,clarge,K,0.1);
67 end
68 %%
69 %sigmoidal calibration function
70 if simcal == 3
71     %Parameter for calibration curve
72     A1=1.00;
73     A2=0.00;
74     x0=10^-7;
75     p=1;
76
77     clarge=logspace(-10,-5).';%concentration range
78     simsignal=sigmoidal(A1,A2,x0,p,clarge);%calculation of calibration curve
79     %Calculation of concentration at specific inhibition values
80     EC50=x0*((A2-A1)/(A2-0.5))-1)^(1/p);
81     EC10=x0*((A2-A1)/(A2-0.9))-1)^(1/p);
82     EC90=x0*((A2-A1)/(A2-0.1))-1)^(1/p);
83 end
84
85 prompt={'How should the added concentration be spaced: 1 logarithmic, 2
linear'};
86 % text in dialog box
87 dlgtitle='standard addition'; %title of dialog box
88 dims=[1 40]; %size of dialog box
89 definput='1';%default input value
90 opts.Interpreter='tex';
91 answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
92 addition=str2num(answer{1});
93 steps=100;
94 d=10^((log10(EC90)-log10(EC10))/100);
95 crange=zeros([1 100]);
96 crange(1)=EC10;
97 for l=1:99
98     crange(l+1)=crange(l)*d;
99 end
100
101 if addition == 1
102     %simulation of concentrations will be performed between EC10 and EC90
103
104     factor=10^((log10(EC90)-log10(EC10))/4);
105     c=zeros(6,1);
106     c(1,1)=0; %first standard concentration is 0
107     c(2,1)=EC10; %second standard concentration is EC10
108     for k=3:6
109         c(k,1)=factor*c(k-1,1);
110     end
111 end
112 if addition==2
```



```
113     add=(EC90-EC10)/4;
114     c=zeros(6,1);
115     c(1,1)=0; %first standard concentration is 0
116     c(2,1)=EC10;
117     for k=3:6
118         c(k,1)=c(k-1,1)+add;
119     end
120 end
121 %choose noise
122 prompt=('choose the amplitude of noise to be added to the signal in %'); % text
123 in dialog box
124 dlgtitle='noise'; %title of dialog box
125 dims=[1 40]; %size of dialog box
126 definput={'1'};%default input value
127 opts.Interpreter='tex';
128 answer=inputdlg(prompt, dlgtitle, dims, definput, opts);
129 noise=str2num(answer{1})*0.01;
130 %geratene Konzentrationen
131 xgeraten=crange;
132 cTest=xgeraten+c;
133 %für (Aufstockkonzentrationen + Proben Konzentration) Signal berechnen
134
135 Tssr = table;
136 T2 = table;
137 for j=1:steps
138     %ProbeKonzentration aufgestockt cProbe
139     cProbe=crange(j)+c;
140
141     if simcal==1
142         signal=monovalent(c_0R,cProbe,K);
143     end
144
145     if simcal==2
146         signal=bivalent(c_0R,cProbe,K);
147     end
148
149     if simcal==3
150         signal = sigmoidal(A1,A2,x0,p,cProbe);
151     end
152
153     signalProbe=signal+(signal.*noise.*rand(6,1)-0.5*noise.*signal);
154     % log signal vs log(Aufstockkonz + geratene Konz)
155     %     figure
156     %     loglog(cProbe,signalProbe,'o')
157     %     xlabel('concentration in M')
158     %     ylabel('signal')
159
160     ylogit=log(signalProbe./(1-signalProbe));
161
162
163     for i=1:steps
164         yreg=ylogit;
165         xreg=log10(cTest(:,i));
166
167         %linear regression
168         Xreg = [ones(length(xreg),1) xreg];
169         b = Xreg\yreg;
```

```
170     yfit = Xreg*b;
171     yresid=yreg-yfit;
172     SSres=sum(yresid.^2);%residual sum of squares (Die Residual-u
Quadratsumme, Summe der Abweichungsquadrate)
173
174     %           figure
175     %           plot(xreg,yreg,'o')
176     %           hold on
177     %           xlabel('log(concentration)')
178     %           ylabel('logit(signal)')
179     %           reffline(b(2),b(1))
180
181     output={crange(j),xgeraten(i),SSres};
182
183     Tssr = [Tssr;output];
184     end
185
186     a=j*steps-steps+1;
187     b=j*steps;
188     Tssr_mat=table2array(Tssr(a:b,1:end));
189
190 %     figure
191 %     x=Tssr_mat(:,2);
192 %     y=Tssr_mat(:,3);
193 %     semilogx(x,y);
194 %     xlabel('concentration in M')
195 %     ylabel('residual')
196 %     xline(Tssr_mat(1,1))
197
198 %Auswahl relevanter Spalten
199 R2min=min(Tssr_mat(:,3));
200 [R2min, pos] = min(Tssr_mat(:,3));
201 cerm = Tssr_mat(pos,2);
202
203     output2={crange(j),cerm};
204     T2 = [T2;output2];
205     end
206     cfound=table2array(T2(:,2));
207 %relative Abweichung der bestimmten Konzentration von Analytikonzentration in %
208 Deltapercent=(cfound-crange.')./crange.'.*100;
209 %Konzentrationen bestimmen, wo Verfahren mit <= 10% Abweichung
210 %Konzentration richtig bestimmt
211 [ind,~] = find(Deltapercent(:,1) > -10 & Deltapercent(:,1) < 10);
212 llpos=find(abs(Deltapercent)<=10,1);
213 llconc=crange(llpos);
214 ulpos=find(abs(Deltapercent)>10,1);
215 ulconc=crange(ulpos);
216
217 %Figure, in der von den getesten Konzentrationen in rot dargestellt wird,
218 %wenn die Konzentration falsch bestimmt wurde, und in grün, wo die
219 %Konzentration weniger als 10 % von der Probenkonzentration abweicht.
220 if simcal ==1
221     Signalrange=monovalent(c_0R, crange,K);
222 end
223 if simcal==2
224     Signalrange=bivalent(c_0R, crange,K);
225 end
226 if simcal==3
```

```
227     Signalrange=sigmoidal(A1,A2,x0,p,crange);
228 end
229 cmid=EC90/2;
230 figure
231 scatter(crange, Signalrange, 50, 'r', 'filled')
232 hold on
233 scatter(crange(ind), Signalrange(ind), 50, 'g', 'filled')
234 set(gca, 'xscale', 'log')
235 if simcal<3
236     lgc=sprintf('K=10^{%d}',log10(K));
237 end
238 if simcal==3
239     lgc=sprintf('sigmoidal, x0=%d', x0);
240
241 end
242 if simcal<3
243     lga=sprintf('c_{0,R}=10^{%d}',log10(c_0R));
244 end
245 if simcal==3
246     lga=sprintf('p=%d', p);
247 end
248 lgb=sprintf('noise=%d',noise);
249 if addition==1
250     lgd=sprintf('addition factor=%d',factor);
251 end
252 if addition==2
253     lgd=sprintf('linear addition factor=%d',add);
254 end
255 legend('wrong', 'correct')
256 txt={lgc,lga,lgb,lgd};
257 text(cmid,0.7,txt)
258 xlabel('concentration in M')
259 ylabel('relative signal')
```

A.2 Fit-Parameter

Tabelle A.1: Fit-Parameter Abbildung 4.2

	Schnittpunkt mit der Y-Achse in 10^5m s^{-1}	Steigung in 10^{-3}s^{-1}	Kor. R-Quadrat
a) Abl	$3,8 \pm 1,8$	$-1,8 \pm 2,0$	-0,00122
b) Int v	$3,49 \pm 0,08$	$-1,49 \pm 0,13$	0,62535
b) Int r	$3,35 \pm 0,17$	$-1,37 \pm 0,17$	0,51931

Tabelle A.2: Fit-Parameter zu Abbildung 4.3, k_s -Linearisierung

	Schnittpunkt mit der Y-Achse in 10^{-3}s^{-1}	Steigung in $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Kor. R-Quadrat
Exp	$1,08 \pm 0,04$	$9,66 \pm 0,14$	0,99879
Abl	$0,96 \pm 0,19$	$10,2 \pm 0,6$	0,98190
Int	$1,04 \pm 0,11$	$9,9 \pm 0,3$	0,99445

Tabelle A.3: Fit-Parameter zu Abbildung 4.16, k_s -Linearisierung

anti-AMT Ak		Schnittpunkt mit der Y-Achse in 10^{-3}s^{-1}	Steigung in $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Kor. R-Quadrat
a) Ak 202	Exp	$0,63 \pm 0,26$	$2,76 \pm 0,14$	0,9848
	Abl	$0,85 \pm 0,19$	$2,80 \pm 0,06$	0,9968
	Int v	$1,21 \pm 0,30$	$3,13 \pm 0,31$	0,9437
	Int r	$0,96 \pm 0,35$	$2,30 \pm 0,27$	0,9246
b) Ak TU11	Exp	$1,73 \pm 0,17$	$1,67 \pm 0,05$	0,9941
	Abl	$1,69 \pm 0,39$	$1,92 \pm 0,14$	0,9696
	Int v	$1,97 \pm 0,62$	$2,22 \pm 0,26$	0,9250
	Int r	$1,46 \pm 0,11$	$1,54 \pm 0,05$	0,9930
c) Ak 8F9	Exp	$1,10 \pm 0,33$	$2,29 \pm 0,15$	0,9747
	Abl	$1,02 \pm 0,15$	$2,70 \pm 0,28$	0,9401
	Int v	$1,02 \pm 0,23$	$2,63 \pm 0,14$	0,9827
	Int r	$0,86 \pm 0,40$	$2,60 \pm 0,44$	0,8504

Tabelle A.4: Fit-Parameter zu Abbildung 4.19, Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante über Linearisierung

anti-AMT Ak	Schnittpunkt mit der Y-Achse	Steigung in 10^{-4}s^{-1}	Kor. R-Quadrat
Ak202	$-0,114 \pm 0,002$	$1,895 \pm 0,019$	0,7499
AkTU11	$-0,114 \pm 0,003$	$1,98 \pm 0,02$	0,6466
Ak8F9	$-0,0261 \pm 0,0010$	$0,495 \pm 0,009$	0,7593

Tabelle A.5: Fit-Parameter zu Abbildung 4.20 a), Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante über nichtlineare Kurvenanpassung für 500 nM anti-AMT Ak

anti-AMT Ak	x0	t1 in s	Kor. R-Quadrat
Ak202	652	675 ± 10	0,9981
AkTU11	657	718 ± 13	0,9971
Ak8F9	652	647 ± 19	0,9962

Tabelle A.6: Fit-Parameter zu Abbildung 4.20 b), Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante über Linearisierung für 500 nM anti-AMT Ak

anti-AMT Ak	Schnittpunkt mit der Y-Achse	Steigung in 10^{-4}s^{-1}	Kor. R-Quadrat
Ak202	$-0,130 \pm 0,003$	$2,33 \pm 0,02$	0,9560
AkTU11	$-0,168 \pm 0,002$	$2,89 \pm 0,02$	0,9752
Ak8F9	$-0,0324 \pm 0,0009$	$0,588 \pm 0,008$	0,9716

Tabelle A.7: Fit-Parameter zu Abbildung 4.22, Scatchard-Plot

anti-AMT Ak	Schnittpunkt mit der Y-Achse in l m mol^{-1}	Steigung in 10^7M^{-1}	Kor. R-Quadrat
Ak202	$0,022 \pm 0,005$	$-2,9 \pm 0,8$	0,6939
AkTU11	$0,017 \pm 0,004$	$-2,1 \pm 0,6$	0,6862
Ak8F9	$0,08 \pm 0,04$	$-3,6 \pm 1,9$	0,2994

Tabelle A.8: Fit-Parameter der logistischen Funktion zu den Kalibrierungen auf LFAs, Abbildung 4.28 Kalibrierung mit UV-Konjugat, 4.32 in Puffer und zehnfach verdünntem Serum, 4.35 Multi-Analyt-Kalibrierung mit Amitriptylin und Testosteron, 4.36 Kalibrierung nach magnetischer Separation

Abbildung	A_1	A_2	x_0 in $\mu\text{g l}^{-1}$	p	Kor. R-Quadrat
4.28	$1,03 \pm 0,03$	$0,085 \pm 0,011$	45 ± 4	$1,06 \pm 0,09$	0,9961
4.32 Puffer	$1,09 \pm 0,08$	$0,30 \pm 0,03$	26 ± 6	$1,1 \pm 0,2$	0,9852
4.32 Serum	$0,99 \pm 0,06$	$0,091 \pm 0,017$	19 ± 8	$0,64 \pm 0,11$	0,9787
4.35 AMT	$0,88 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,04$	32 ± 7	$0,92 \pm 0,16$	0,9786
4.35 T	$1,13 \pm 0,11$	$-0,010 \pm 0,018$	9 ± 4	$0,9 \pm 0,3$	0,9460
4.36	$0,92 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,02$	884 ± 265	$0,61 \pm 0,08$	0,9892

B. Veröffentlichungen

B.1 Publikationen

- Conrad, M., Fechner, P., Proll, G. und Gauglitz, G., **2023**, (R)evolution of the standard addition procedure for immunoassays, *Biosensors 13* (9), 849. <https://doi.org/10.3390/bios13090849>
- Conrad, M., Proll, G., Builes-Münden, E., Dietzel, A., Wagner, S. und Gauglitz, G. **2023**, Tools to compare antibody gold nanoparticle conjugates for a small molecule immunoassay, *Microchimica Acta 190*, 62. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05637-x>
- Conrad, M., Fechner, P., Proll, G. und Gauglitz, G., **2022**, Comparison of methods for quantitative biomolecular interaction analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry 414*, 661-673. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03623-x>
- Pölloth, B., Röhrig, H., Conrad, M. und Schwarzer, S. **2022**, Wie funktioniert der Antigenschnelltest auf SARS-CoV-2? Ein Modellexperiment zum Aufbau und zur Funktion von Lateral-Flow-Tests, *Naturwissenschaften im Unterricht: Chemie 33* (189), 25-31.
- Conrad, M., Builes, E., Dietzel, A., Wagner, S., Sill, A., Proll, G. und Gauglitz, G., **2021**, Vergleich von Strategien zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Antikörpern für Lateral Flow POCT, *15. Dresdner Sensor-Symposium (AMA)*, 37-42. <https://doi.org/10.5162/15dss2021/3.3>

B.2 Vorträge

- Standard addition for immunoassays, **2023**, *Euroanalysis*, Genf, Schweiz.
- Mehrkanalstrukturen auf Lateral Flow Teststreifen eröffnen neue Anwendungsgebiete, **2022**, *Dresdner Sensor-Symposium*, Dresden, Deutschland.

- Vergleich von Strategien zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Antikörpern für Lateral Flow POCT, **2021**, *Dresdner Sensor-Symposium*, online.

B.3 Poster

- Quantitative lateral flow test for amitriptyline with multi-channel structures, **2023**, *Anakon*, Österreich.
- Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Antikörpern für Lateral Flow Test zum quantitativen Nachweis von Amitriptylin, **2022**, *POCT Symposium*, München, Deutschland.
- Development of a lateral flow assay for quantification of amitriptyline, **2022**, *Eu-ChemS Chemistry Congress*, Lissabon, Portugal.
- Functionalization of gold nanoparticles with antibodies for quantitative lateral flow test for amitriptyline, **2022**, *Analytica Conference*, München, Deutschland.
- Vergleich von Auswertemethoden für quantitative Biomolekulare Interaktionsanalyse, **2021**, *Dresdner Sensor-Symposium*, online.
- Comparison of evaluation methods for kinetic analysis of binding events, **2021**, *European Biosensor Symposium*, online.