

Neue Technologie für die Entwicklung von molekularen Markern

Protein-Assays können zukünftig noch schneller durchgeführt werden



Georg Johnen, Thomas Brüning

Der Nachweis von spezifischen Proteinen steht im Mittelpunkt vieler Verfahren zur Diagnose von berufsbedingten Erkrankungen. Der weitverbreitete ELISA ist eine verlässliche und präzise Methode zum Proteinnachweis, die jedoch sehr zeitaufwändig sein kann. Am IPA wird nun eine neuartige Methode evaluiert, die die Messung von Proteinen und damit auch die Entwicklung neuer ELISAs erheblich beschleunigen kann.

Molekulare Marker

Bei nahezu allen Krankheiten treten Veränderungen auf, die nicht nur äußerlich sichtbar oder bemerkbar sind, sondern auch im mikroskopischen und submikroskopischen, das heißt molekularen Bereich Auswirkungen zeigen. Meist treten molekulare Veränderungen sogar deutlich früher auf, bevor eine Krankheit klinisch manifest wird. Diese molekularen Veränderungen finden sich in der Regel auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Speichel wieder, sodass sie hier häufig

als Biomarker (molekulare Marker) nachgewiesen werden können. Molekulare Marker können somit für vielfältige medizinische Fragestellungen eingesetzt werden. Verwendet werden diese Marker beispielsweise bei der Diagnose, der Früherkennung, der Prognose, der Ermittlung der individuell besten Behandlung oder der Überwachung des Therapieverlaufs einer Erkrankung. Die Herausforderung besteht darin, zunächst aus einer Vielzahl an Kandidaten die geeigneten Biomarker für eine Erkrankung zu finden und dann ein ausreichend empfindliches Verfahren zu entwickeln, um diese verlässlich zu bestimmen.

Proteine in der Diagnostik

Neben Stoffwechselprodukten wie Blutzucker, Cholesterin, Harnsäure etc. gelten Proteine als die klassischen Biomarker. Vom Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion über Allergene bis zur Früherkennung von Krebserkrankungen werden Nachweisverfahren, sogenannte Assays, verwendet, die auf der spezifischen Bestimmung von Proteinen beruhen. In der Regel werden dazu sogenannte Immunassays eingesetzt, bei denen man Antikörper nutzt, die passgenau ihr Zielprotein (Antigen) erkennen und binden. Sichtbar gemacht wird ein detektiertes Protein im Falle des ELISA-Verfahrens durch eine Farbreaktion, katalysiert durch ein Enzym, das an einen Detektionsantikörper gebunden ist (Abb. 1).

Flaschenhals Assayentwicklung

ELISAs und ähnliche Immunassays erlauben meist eine genaue Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe, sie sind jedoch eher langsam in der Durchführung – je nach Optimierungsgrad dauern sie ein bis zwei Tage. Entsprechend zeitaufwändig ist auch die Neuentwicklung von Immunassays. Hierzu sind oft viele Monate erforderlich.

Bei der Suche nach neuen Krankheits-Markern fallen häufig Dutzende neuer Kandidaten-Proteine an, bei denen sich eine Assay-Entwicklung potenziell lohnen würde. Manchmal ist jedoch erst spät in der Entwicklungsphase erkennbar, ob ein Marker beziehungsweise dessen Assay tatsächlich geeignet ist, eine Krankheit in Patientenproben zu entdecken. Diesen Flaschenhals aus vielen zu überprüfenden Kandidaten und langsamer Prozessierung gilt es zu überwinden, entweder durch schnellere Prozesse oder durch parallele Bearbeitung.

Kurz gefasst

Proteine dienen als wichtige molekulare Marker für die Diagnostik von Erkrankungen wie COVID-19 oder Krebs.

Präzise Nachweisverfahren für Proteine sind vergleichsweise zeitintensiv und eine Neuentwicklung erfordert eine sehr ressourcenaufwendige Optimierung.

Neue Methoden wie die sogenannte FO-SPR beschleunigen sowohl die Entwicklungsarbeit als auch die eigentlichen Messungen.

Neue Methode bringt Zeitgewinn

Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (engl. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) ist ein bereits länger bekannter Effekt, der aber in der Routine-Diagnostik bislang kaum Eingang gefunden hat. Das Prinzip beruht auf der Reflexion von Licht in einem Prisma, das mit einer dünnen Metallschicht versehen ist. Binden Moleküle an diese Metallschicht, ist eine Veränderung der Wellenlänge des Lichts messbar (Abb. 2). Eine Farbreaktion wie beim ELISA ist nicht notwendig.

In den 80er-Jahren wurde erstmals eine Verwendung in Immunassays beschrieben (Liedberg et al. 1983). Die in der Vergangenheit verwendeten SPR-Geräte waren aber meist groß, teuer und benötigten vor allem viel Probenmaterial. Die Arbeitsgruppe um Prof. J. Lammertyn an der Katholische Universität Löwen hat in den letzten Jahren die SPR zur sogenannten FO-SPR (FO = *Fiber Optic*) weiterentwickelt. Mit Hilfe der FO-SPR kann eine Messung nun an einer dünnen Glasfaser stattfinden, die einfach in eine Probe eingetaucht wird (Lu et al. 2017). Parallel wurden auch verschiedene

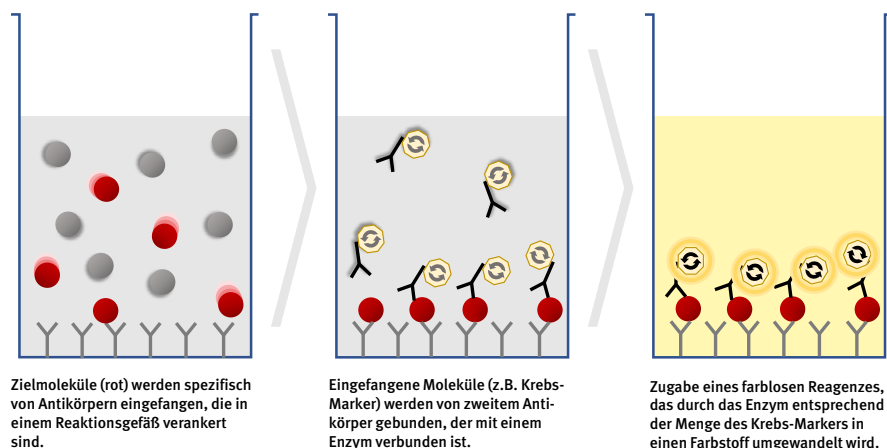


Abb. 1
Prinzip des ELISAs. Marker-Nachweis durch eine enzymatische Farbreaktion.

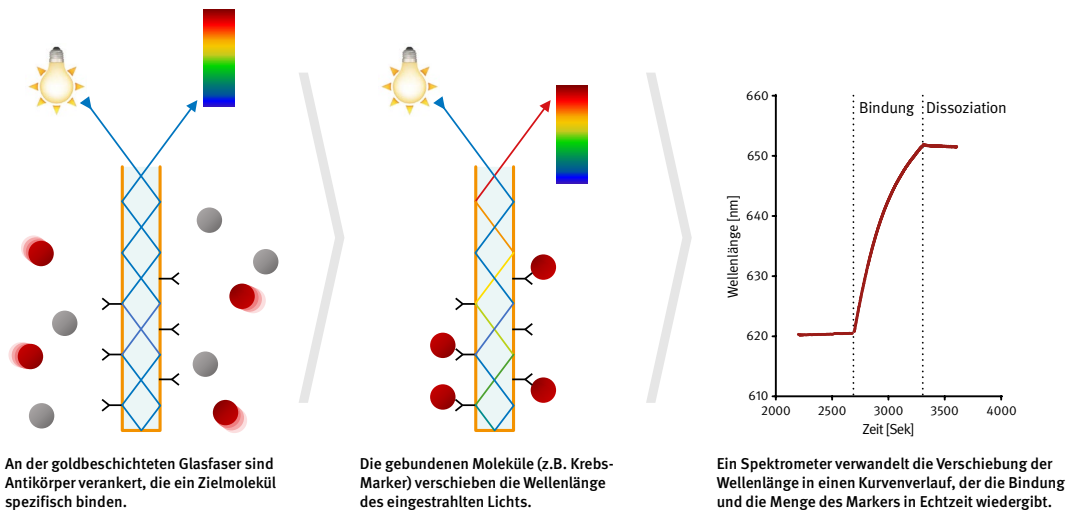


Abb. 2
Prinzip der SPR. Bei der SPR verschiebt sich die Wellenlänge des eingestrahlichten Lichts, wenn Moleküle an die Metalloberfläche eines beschichteten Lichtleiters (Glasfaser oder Prisma) binden.

Arbeitsschritte automatisiert. Zusammengefasst ergeben sich durch die neue Methode folgende Vorteile:

- **Schnelligkeit durch Messung in Echtzeit:** erste Ergebnisse bereits in Minuten, maximale Dauer eines Probenlaufs ein bis zwei Stunden
- **Minimaler Probenverbrauch:** Ersparnis bei wertvollen Proben
- **Multiplexing:** es können in derselben Probe mehrere Zielproteine parallel bestimmt werden
- **Kompaktes, robustes Gerät:** grundsätzlich auch für Point-of-Care-Tests verwendbar
- **Kosteneffizient:** wenig Verbrauchsmaterial, weniger Arbeitszeit

Zahlreiche Einsatzmöglichkeiten

Da ELISAs bewährte, etablierte Verfahren darstellen, die in allen klinischen Labors durchführbar sind, kann FO-SPR zunächst als Ergänzung und weniger als Alternative zum ELISA genutzt werden. Mit ihr kann die Entwicklung von neuen Immunassays deutlich beschleunigt werden und so wäre auch der Flaschenhals bei der Suche nach Biomarkern für Post-COVID oder berufsbedingten Tumoren wie Mesotheliomen, Lungenkrebs und Blasenkrebs zu überwinden. Die neue Methodik geht aber auch über die Möglichkeiten eines klassischen Immunassays hinaus (siehe Weblinks zur Methode).

Besonders geeignet ist die SPR, um zu ermitteln, wie stark zwei Moleküle aneinander binden (Messung von sogenannten Bindungskinetiken). Dies erlaubt beispielsweise Aussagen zur Wirksamkeit von Impfstoffen gegen Omikron-Varianten von SARS-CoV-2. Ein automatisiertes FO-SPR-Gerät kann auch dazu genutzt werden, gezielt krankheitsspezifische Zellen und sogenannte Vesikel aus Patientenproben zu „fischen“, um sie dann mit weiteren diagnostischen Verfahren, wie DNA- oder RNA-Analysen, zu untersuchen.

Fazit

Innovative Methoden verbessern nicht nur die bestehenden, sondern können auch neue Horizonte für eine komplexere und flexiblere Diagnostik eröffnen. Sicherheit und Gesundheit bei der Arbeit ist einem ständigen Wandel ausgesetzt. So ist zukünftig vermehrt mit neu aufkommenden Krankheitsbildern unter anderem in Folge des Klimawandels zu rechnen, bei denen derartige Technologien analytische Lösungswege aufzeigen können.

Die Autoren:

Prof. Dr. Thomas Brüning
Dr. Georg Johnen
IPA

Literatur

Liedberg B, Nylander C, Lunström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 1983; 4: 299-304

Lu J, Spasic D, Delpont F, Van Stappen T, Detrez I, Daems D, Vermeire S, Gils A, Lammertyn J. Immunoassay for Detection of Infliximab in Whole Blood Using a Fiber-Optic Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Anal Chem* 2017; 89: 3664-3671

Weblinks zur Methode:

www.bi.w.kuleuven.be/biosyst/mebios/biosensors-group
foxbiosystems.com/fo-spr-applications-fox-biosystems