

Hochsensitive FRET-Immunoassays zur Multiparameterdetektion in der Lungenkrebs-Frühdiagnostik

Daniel Geißler^{1*}, Stefan Stuffer², Hans-Gerd Löhmannsröben^{1,2}, Niko Hildebrandt³

¹ Universität Potsdam, Institut für Chemie, Physikalische Chemie, Potsdam (D)

² Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, NanoPolyPhotonik, Potsdam (D)

³ Université Paris-Sud, Institut d'Electronique Fondamentale, NanoBioPhotonics, Orsay (F)

* BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Fachbereich 1.10 Biophotonik, Berlin (D)

Abstract

Für eine erfolgreiche Behandlung von Lungenkrebs ist sowohl eine frühzeitige Diagnose als auch eine Unterscheidung zwischen kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) von großer Bedeutung. Eine sichere Diagnose von Lungenkrebs erfordert derzeit eine Lungenbiopsie. Da solche Eingriffe für eine standardmäßige Früherkennung nicht geeignet sind, benötigt man spezifische Serum-basierte Biomarker. Zwar existieren bereits Immunoassays für einzelne Lungenkrebs-Tumormarker in Serum, für eine einfache, selektive und sensitive Früherkennung ist jedoch die gleichzeitige Messung mehrerer Tumormarker (Multiplexing) in einer Probe notwendig.

In diesem Beitrag präsentieren wir eine optische Multiplexmethode zur sensitiven Detektion der SCLC- und NSCLC-spezifischen Tumormarker CEA, NSE, SCC, Cyfra21-1 und CA15.3 in Serum, die wir kürzlich in der Fachzeitschrift *Journal of the American Chemical Society* (Geißler *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (3), 1102-1109, doi: [dx.doi.org/10.1021/ja310317n](https://doi.org/10.1021/ja310317n)) veröffentlicht haben [1]. Das Messprinzip der homogenen Immunoassays beruht auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) von lumineszenten Terbiumkomplexen auf verschiedene organische Fluoreszenzfarbstoffe. Die FRET-Partner sind dabei an unterschiedliche Antikörper (AB1 bzw. AB2) gebunden, welche mit den Tumormarkern (TM) Immunkomplexe der Form „AB1-TM-AB2“ bilden. Die im Immunoassay gemessenen FRET-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff-Signale sind direkt proportional zur jeweiligen TM-Konzentration. Aufgrund der spektralen Überlappung der breiten Fluoreszenzfarbstoff-Emissionsbanden und des daraus resultierenden Crosstalks war FRET-Multiplexing

bisher auf maximal drei Akzeptoren beschränkt. Wir haben jedoch eine Auswertemethodik entwickelt, mit welcher der Crosstalk effizient korrigiert werden kann, wodurch die sensitive Detektion der fünf Tumormarker innerhalb einer Probe möglich wird. Die erreichten Nachweisgrenzen im ng/mL-Bereich sind für eine Anwendung in der klinischen Diagnostik hervorragend geeignet. Aufgrund der allgemeinen Anwendbarkeit der Methode sind unsere FRET-Immunoassays auf eine Vielzahl anderer Biomarker übertragbar.

Einleitung

Die Therapiemöglichkeiten und Überlebensraten von Lungenkrebs-Patienten hängen stark vom Stadium der Krebserkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose und vom histologischen Typus des Lungenkrebses ab, wobei zwischen kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) unterschieden wird. SCLC spricht oft gut auf Radio- oder Chemotherapie an, während zur Behandlung von NSCLC ein operativer Eingriff notwendig ist. Leider zeigen Lungenkrebs-Patienten oft erst sehr spät typische Symptome, so dass die Diagnose häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krebserkrankung erfolgt. Eine effektive Lungenkrebs-Früherkennung ist bis zum heutigen Tage nicht verfügbar, und zur sicheren Diagnose ist bisher eine Lungenbiopsie notwendig. [2-6] Einige wissenschaftliche Studien konnten jedoch zeigen, dass die Konzentrationen bestimmter Tumormarker (TM) im Blutserum eindeutig mit dem histologischen Typus und dem Stadium von Bronchialkarzinomen zusammenhängen, so dass diese als biologische Marker für die frühzeitige Lungenkrebs-Diagnose verwendet werden können. Als Tumormarker wurden dabei u.a. die Proteine CEA (Carcino-embryonales Anti-

gen), NSE (Neuronen-spezifische Enolase), SCC (*Squamous cell carcinoma*-Antigen), Cyfra21-1 (Cytokeratin-19-Fragment) und CA15.3 (*Cancer*-Antigen 15.3) verwendet. [5-7]

Für eine Lungenkrebs-Früherkennung müssen die Konzentrationen der fünf oben genannten Tumormarker im Blutserum gemessen werden. Eine der meistverwendeten und sensitivsten Methoden zur Detektion von Krankheitsmarkern in der Medizin sind *in-vitro*-diagnostische Tests, die auf der spezifischen Erkennung und Bindung von Antikörpern an ihre jeweiligen Antigene (die zu analysierenden Biomarker), sogenannte Immunoassays, beruhen. Homogene Assays ermöglichen die hoch-sensitive Analyse biochemischer Prozesse und besitzen gegenüber heterogenen (Festphasen-basierten) Assays den Vorteil, dass bei ihnen keine zeitraubenden Wasch- und Trennschritte nötig sind, weshalb sie in der Regel schneller und günstiger sind [8, 9]. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine abstandsabhängige, strahlungslose Energieübertragung von einem angeregten Donormolekül zu einem nicht-angeregten Akzeptormolekül, die sich im Abstand von ca. 1-20 nm voneinander befinden müssen. [10-13] Da viele biomolekulare Wechselwirkungen (z.B. Antikörper-Antigen-Bindungen) sich im nm-Größenbereich abspielen, ist FRET eine häufig genutzte und sehr empfindliche Methode zur Analyse biologischer Strukturen und Dynamiken, sowie zur Detektion von biologischer Erkennungsmechanismen und Bindungsreaktionen, wie z.B. in homogenen FRET-Immunoassays. [12-17]

Neben der hohen Sensitivität und Spezifität sind bei homogenen FRET-Immunoassays zwei Herausforderungen von besonderer Bedeutung: die Unterdrückung störender Autofluoreszenz, sowie die Möglichkeit zur gleichzeitigen Messung mehrerer Analyte in

einer einzigen Probe (sogenanntes Multiplexing). Die Autofluoreszenzsignale der biologischen Serumprobe und der zur Messung des FRET-Immunoassays verwendeten Komponenten (z.B. Autofluoreszenz der Mikrotiterplatte oder der optischen Filter), reduzieren die Sensitivität des Assays und Erhöhen somit die Nachweisgrenze (LOD, *limit of detection*) für die Analyten. Mit der Verwendung von lumineszenten Europium- oder Terbiumkomplexen als FRET-Donoren kann diese Problematik jedoch umgangen werden, da Lanthanoid-Komplexe außergewöhnlich lange Lumineszenz-Abklingzeiten im Millisekunden-Zeitbereich aufweisen, die auf verbotenen *f-f*-Übergänge zurückzuführen sind. Diese ms-Abklingzeiten ermöglichen eine zeitverzögerte Detektion der FRET-Signale im HTRF- (*homogeneous time-resolved fluorescence*) Immunoassay und damit die Unterdrückung der kurzlebigen Autofluoreszenzsignale, die im ns- bis μ s-Zeitbereich auftreten.[18-20] Die gleichzeitige Detektion (Multiplexing) von fünf Biomarkern, wie sie z.B. für die spezifische Früherkennung von Lungenkrebs zur Unterscheidung von SCLC und NSCLC notwendig ist, wird durch die Verwendung von fünf spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen als FRET-Akzeptoren erreicht. Jeder der fünf Lungenkrebs-TM wird dabei spezifisch mit einem der fünf FRET-Akzeptorfarbstoffe detektiert. Fünffach-Multiplexing mit einem Donor und fünf Akzeptoren ist mit Terbium-Donoren möglich, da das Terbium-Emissionsspektrum vier schmale, spektral gut getrennte Emissionsbanden aufweist, in deren Lücken die Emissionsspektren der fünf Akzeptorfarbstoffe detektiert werden können (siehe Abbildung 1). Durch die Multiplexing-Messung von fünf verschiedenen TM können deren Konzentrationen im Patientenserum miteinander korreliert werden, wodurch eine spezifischere und sensitivere Lungenkrebs-Diagnose getroffen werden kann, als es durch die Detektion nur eines einzigen TM möglich ist.[5-7]

Da die Emissionsspektren der fünf organischen Fluoreszenzfarbstoffe, die in diesem Fünffach-Multiplexing-Immunoassay als FRET-Akzeptoren verwendet werden, unsymmetrisch sind, d.h. jeweils eine Schulter im längerwelligen Bereich der Emissionsbande aufweisen, überlappen diese jedoch teilweise (vgl. Abbildung 1). Diese spektrale Überlappung führt dazu, dass Signale eines Akzeptorfarbstoffes in verschiedenen Detektionskanälen gemessen werden können, was als Crosstalk bezeichnet wird. So kann z.B. die Emission des „blauen“ Farbstoffes in Abbildung 1 nicht nur im dazugehörigen Detektionskanal D1 (520 nm, blau), sondern auch noch in den längerwelligen Detektionskanälen D2 (570 nm, grün) und D3 (610 nm, orange) gemessen werden. Der spektrale

Crosstalk verhindert, dass die fünf Lungenkrebs-TM ohne weitere Korrekturen unabhängig voneinander im Multiplexing-FRET-Immunoassay detektiert werden können, weshalb in diesem Fall eine Crosstalk-Korrektur notwendig ist.[21-23]

Material und Methoden

FRET-Donoren und -Akzeptoren

Als Donor für die FRET-Immunoassays wurde der kommerziell erhältlich lumineszente Terbium(III)-Chelatkomplex Lumi4-Tb von Lumiphore Inc. verwendet, welcher aus vier miteinander verbrückten 2-Hydroxyisophthalamid- (IAM-) Untereinheiten besteht, die ein zentrales Tb³⁺-Ion komplexieren. [24] Als FRET-Akzeptoren wurden die kommerziell erhältlichen organischen Fluoreszenzfarbstoffe OregonGreen 488 (OG488), AlexaFluor 555 (AF555), AlexaFluor 568 (AF568) und AlexaFluor 700 (AF700) von Invitrogen Life Technologies, sowie Cy5 von GE Healthcare verwendet. Die Emissionsspektren der FRET-Donoren und -Akzeptoren sind in Abbildung 1 dargestellt.

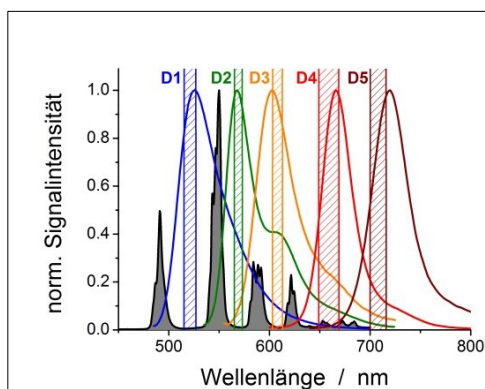


Abb.1: Emissionsspektren des Terbium-Donors (grau unterlegt) und der fünf verschiedenen Farbstoff-Akzeptoren (OG488 = blau, AF555 = grün, AF568 = orange, Cy5 = rot und AF700 = braun), sowie schematische Darstellung der fünf Detektionskanäle D1 bis D5 (farbig schraffierte Bereiche), in denen die Signale der fünf Farbstoff-Akzeptoren gemessen wurden. Aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren werden in den Detektionskanälen D1 bis D5 nicht nur die Emissionssignale der jeweils gewünschten Farbstoff-Akzeptoren gemessen (blauer Farbstoff in D1, grüner Farbstoff in D2, etc.), sondern es werden auch die Signale anderer, v.a. kürzerwellig-emittierender Akzeptorfarbstoffe, sowie ein Teil der Terbium-Emission als Hintergrundsignal detektiert. Aus diesem Grund ist für eine quantitative Messung mehrerer Analyte eine Berechnung zur Korrektur der Messsignale notwendig. (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quelle [1] Copyright 2013 American Chemical Society.)

Tumormarker (TM) und Antikörper (AB)

Für unsere Multiplexing-Assays zur Früherkennung von Lungenkrebs haben wir fünf der TM verwendet, die u.a. von Molina *et al.*

vorgeschlagen wurden, um eine hoch-spezifische Diagnose und Unterscheidung von SCLC und NSCLC bei gleichzeitig hoher Sensitivität zu ermöglichen. Diese fünf TM waren CEA, NSE, SCC, Cyfra21-1 und CA15.3. [5-7] Für alle diese TM existieren bereits kommerziell erhältliche Immunoassay-Kits von Cezanne / Thermo Fisher Scientific für den KRYPTOR-Immunoreader [25], die einen direkten Vergleich unseres Multiplexing-Assays mit den fünf klinischen (nicht-Multiplexing) Assays als „Goldstandard“ ermöglichen. Als TM-Proben wurden B•R•A•H•M•S KRYPTOR-Kalibratoren verwendet, die von Cezanne / Thermo Fisher Scientific zur Verfügung gestellt wurden. In den homogenen FRET-Immunoassays wurden jeweils zwei verschiedene monoklonale, primäre IgG-Antikörper gegen jeden der TM verwendet, wobei einer mit dem FRET-Donor markiert war (Donor-AB), während der andere mit dem FRET-Akzeptor markiert war (Akzeptor-AB). Die Lumi4-Tb-markierten Donor-AB und die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Akzeptor-AB wurden ebenfalls von Cezanne / Thermo Fisher Scientific zur Verfügung gestellt.

Fünffach-Multiplexing FRET-Immunoassay

Das Messprinzip des homogenen Multiplexing-FRET-Immunoassays zum gleichzeitigen Nachweis der fünf Lungenkrebs-TM in einer einzigen Probe beruht auf dem simultanen Förster-Resonanzenergietransfer von den lumineszenten Terbiumkomplex-Donoren auf die fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-Akzeptoren, wie in Abbildung 2 dargestellt ist. Gegen die zu messenden TM wird dabei jeweils ein Antikörperpaar (AB1 und AB2) verwendet, wobei beide AB den entsprechenden TM-Analyten an unterschiedlichen Epitopen (Bindungsstellen) spezifisch binden können, so dass jeweils Immunkomplexe der Form „AB1-TM-AB2“ gebildet werden. Für den Multiplexing-FRET-Immunoassays sind nun die AB1 mit dem Lumi4Tb-Donor markiert, während die AB2 jeweils mit einem der fünf FRET-Akzeptoren markiert sind, so dass jeder TM spezifisch durch einen Akzeptorfarbstoff „codiert“ wird. Im Assay gelangen dann bei Anwesenheit der jeweiligen TM die Terbium-Donoren und die entsprechenden Farbstoff-Akzeptoren durch die Bildung der Immunkomplexe in räumliche Nähe zueinander, so dass FRET möglich wird. Durch den Energietransfer wird die Anregungsenergie von den Terbium-Donoren auf die Akzeptorfarbstoffe übertragen. Die im Multiplexing-Immunoassay zeitverzögert gemessenen FRET-sensitivierten Emissionsintensitäten der fünf Akzeptorfarbstoffe sind dann direkt proportional zur jeweiligen TM-Konzentration in der Probe. [18, 19, 26-29]

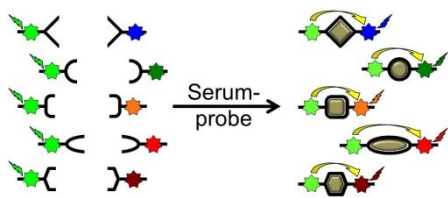


Abb.2: Schematische Darstellung des Multiplexing-FRET-Immunoassays zur simultanen Messung von fünf Tumormarkern in einer einzigen Messung. Die Detektionslösung enthält gegen jeden der zu messenden Antigene (Tumormarker) ein entsprechendes Antikörper-Paar, wobei einer der Antikörper mit dem Terbiem-Donor (hellgrün) markiert ist, während der jeweils andere Antikörper mit einem der fünf Farbstoff-Akzeptoren (blau, grün, orange, rot und braun) markiert ist. Vor Zugabe der Analytprobe liegen die Antikörper frei in Lösung vor und es kann kein FRET von den Terbiem-Donoren auf die Farbstoff-Akzeptoren stattfinden, so dass die Emission hauptsächlich von den Terbiem-Donoren ausgeht (links). Nach Zugabe der Analytprobe mit den zu messenden Antigenen (dunkelgelbe Figuren) binden die Antikörper-Paare aus der Detektionslösung spezifisch an ihre entsprechenden Antigene, wodurch die Terbiem-Donoren und Farbstoff-Akzeptoren in räumliche Nähe zueinander gelangen, so dass FRET (gelbe Pfeile) möglich wird. Durch den FRET wird die Anregungsenergie von den Terbiem-Donoren auf die Farbstoff-Akzeptoren übertragen, so dass diese nun emittieren (rechts). Die Signalintensitäten der fünf Farbstoff-Akzeptoren sind dabei direkt proportional zu den Konzentrationen der fünf Tumormarker in der Probe.

Modifizierter KRYPTOR-Immunoreader

Alle FRET-Immunoassays wurden an einem modifizierten KRYPTOR-Immunoreader [25] von Cezanne (B•R•A•H•M•S / Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Im KRYPTOR wurde ein maßgefertigter dichroitischer Spiegel mit scharfer Transmissionsgrenze zwischen 500 nm und 510 nm (Δ) verwendet, um die erste Terbiem-Emissionsbande bei ca. 495 nm von den Akzeptorfarbstoff-Emissionsbanden zu trennen. Da der KRYPTOR nur zwei Photonenvervielfacher- (PMT, *photomultiplier tube*) basierte Detektionskanäle besitzt (einen Donor- und einen Akzeptor-Detektionskanal für ratiometrische Messungen), wurden die fünf verschiedenen Akzeptorfarbstoff-Emissionen nacheinander durch wechseln der entsprechenden Bandpassfilter gemessen. Zur Detektion des Terbiem-Donors wurde ein 494 ± 5 nm Bandpassfilter (CVI Melles Griot) verwendet. Für die Akzeptorfarbstoffe OG488, AF555, AF568, und AF700 wurden Bandpassfilter von 521 ± 6 , 570 ± 3.5 , 608 ± 4 , und 708 ± 8 nm (Δ) genutzt, während die Cy5-Emission mit einem 659 ± 10 nm Bandpassfilter (Semrock Inc) detektiert wurde (vgl. Abbildung 1). Für alle Assays wurde ein

gepulster 337.1 nm-Stickstofflaser mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Pulsenergie von ca. 60 μ J als Anregungslichtquelle verwendet. Jedes Nöpfchen der Mikrotiterplatte wurde mit 100 Anregungslichtblitzen gemessen (5 s pro Messung), wobei das Assayvolumen im Nöpfchen immer 150 μ L betrug. Die zeitverzögerten Lumineszenzintensitäten der FRET-Donoren und -Akzeptoren wurden im Zeitfenster von 50 μ s bis 450 μ s detektiert, was eine effiziente Ausblendung von Autofluoreszenzsignalen und somit eine nahezu hintergrundfreie Messung ermöglichte.

Kalibrierung des spektralen Crosstalks

Um trotz der spektralen Überlappung der Akzeptor-Emissionsbanden alle fünf Lungenkrebs-TM unabhängig voneinander im Multiplexing-FRET-Immunoassay detektieren zu können, muss der spektrale Crosstalk korrigiert werden. Für diese Korrektur wurden die verschiedenen Crosstalk-Anteile der Fluoreszenzfarbstoff-Emissionen in den fünf Akzeptor-Detektionskanälen zuvor in Einzelassays gemessen. Für die fünf Einzel-TM-Assays wurden je 50 μ L einer Donor-AB-Mischung (bestehend aus 0.08 μ g/mL Lumi4Tb-markierter anti-NSE-, CEA- und Cyfra21.1-AB, 0.10 μ g/mL Lumi4Tb-markierter anti-SCC-AB und 0.14 μ g/mL Lumi4Tb-markierter CA15.3-AB in 100 mM TRIS-Puffer mit 0.1% BSA) zu 50 μ L einer Akzeptor-AB-Mischung (bestehend aus 4.0 μ g/mL Farbstoff-markierter anti-NSE-, CEA- und Cyfra21.1-AB, 5.0 μ g/mL Farbstoff-markierter anti-SCC-AB und 7.1 μ g/mL Farbstoff-markierter anti-CA15.3-AB in 100 mM TRIS-Puffer mit 0.1% BSA) gegeben. Zu diesen 100 μ L Donor-Akzeptor-AB-Mischung wurden 50 μ L einer Serumprobe gegeben, die jeweils einen der TM mit einer Konzentration vom 0.5-fachen (0.5x) bis zum 10-fachen (10x) der höchsten Normalkonzentration (1x) enthielt. Die höchste Normalkonzentration entspricht dabei dem Grenzwert der TM im Blutserum eines gesunden Menschen, d.h. alle TM-Konzentrationen kleiner als 1x gelten als normal (gesund), während alle TM-Konzentrationen größer als 1x als krankhaft erhöht gelten und somit einen Hinweis auf eine Lungenkrebs-Erkrankung geben. Die höchsten Normalkonzentrationen jedes TM liegen bei 12.5 ng/mL für NSE, 3 ng/mL für SCC, 5 ng/mL für CEA, 3 ng/mL für Cyfra21-1 und 30 U/mL für CA15.3 (vgl. Tabelle 2). Alle Einzel-TM-Assays wurden dann für 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend am KRYPTOR-Immunoreader gemessen. Die aus den fünf Einzel-TM-Assays erhaltenen Kalibrierkurven wurden dann verwendet, um in den nachfolgenden Fünffach-Multiplexing-Assays aus den gemessenen (bzw. mittels Crosstalk-Korrektur berechneten) Signal-

intensitäten die entsprechenden TM-Konzentrationen zu ermitteln.

Durchführung der Fünffach-Multiplexing FRET-Immunoassays

Es wurden zwei verschiedene Formate des Multiplexing-Immunoassays zum gleichzeitigen Nachweis der fünf Lungenkrebs-TM durchgeführt, zum einen ein Multiplexing-Assay mit gleichzeitigem Anstieg aller fünf TM-Konzentrationen von 0.5x auf 10x, und zum anderen ein Multiplexing-Assay mit maximalem spektralen Crosstalk zwischen den Akzeptor-Detektionskanälen. Für beide Assayformate wurden zunächst wieder die Donor-AB- und Akzeptor-AB-Mischungen hergestellt, wie es bereits oben für die Einzel-TM-Assays beschrieben wurde, und zur Donor-Akzeptor-AB-Mischung vereinigt. Für den Multiplexing-Assay mit gleichzeitiger Erhöhung der TM-Konzentrationen enthielt die zugegebene Serumprobe alle fünf Lungenkrebs-TM, deren Konzentrationen gleichzeitig von jeweils 0.5x bis 10x der höchsten Normalkonzentration (1x) anstiegen. Für den Multiplexing-Assay mit maximalem spektralen Crosstalk enthielt die zugegebene Serumprobe alle fünf Lungenkrebs-TM, wobei die Konzentration von NSE konstant bei 10x der höchsten Normalkonzentration gehalten wurde, während die Konzentrationen von SCC und Cyfra21-1 von 0.5x nach 10x anstiegen, die CEA-Konzentration von 10x nach 0.5x abnahm und die Konzentration von CA15.3 konstant bei 0.5x der höchsten Normalkonzentration gehalten wurde. Wie die Einzel-TM-Immunoassays wurden auch die Multiplexing-Immunoassays nach Zugabe der 50 μ L Serumprobe für 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend am KRYPTOR-Immunoreader gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Crosstalk-Korrektur

Aufgrund der spektralen Überlappung der Akzeptorfarbstoff-Emissionsbanden ist für die unabhängige Detektion der fünf Lungenkrebs-TM im Multiplexing-Assay eine Crosstalk-Korrektur notwendig. Für diese Crosstalk-Korrektur müssen die Signalintensitäten S_i , welche am KRYPTOR-Immunoreader in den fünf Akzeptor-Detektionskanälen i ($i = 1-5$) gemessen wurden, zunächst um die Hintergrundsignale korrigiert werden. Diese Hintergrundsignale entstehen hauptsächlich durch den spektralen Crosstalk der Terbiem-Donoremission in die Akzeptor-Detektionskanäle, aber auch durch die Autofluoreszenz der Assaykomponenten (biologische Probe, Mikrotiterplatte, optische Filter, etc.) und durch die Direktanregung der FRET-Akzeptoren. Daher wurde der Terbiem-Signalanteil ($f_{Tb} \cdot S_{Tb}$) sowie der Anteil der Autofluoreszenzsignale

$(S_i^0 - f_{Tb} \cdot S_{Tb}^0)$ von den gemessenen Signalintensitäten subtrahiert, um die Hintergrundbereinigten Signalintensitäten I_i zu berechnen:

$$I_i = S_i - f_{Tb} \cdot S_{Tb} - (S_i^0 - f_{Tb} \cdot S_{Tb}^0) \quad (1)$$

Dabei ist f_{Tb} der Anteil der Terbium-Signalintensität S_{Tb} im Akzeptor-Detektionskanal i und S_i^0 und S_{Tb}^0 sind die im Akzeptor- und Donor-Detektionskanal gemessenen Signalintensitäten der Nullprobe (nur Serum, ohne TM). Die Hintergrundbereinigten Signalintensitäten I_i müssen nun noch um den Crosstalk der fünf Akzeptorfarbstoffe untereinander korrigiert werden. Die verschiedenen Crosstalk-Anteile der fünf Fluoreszenzfarbstoff-Emissionen in den fünf Akzeptor-Detektionskanälen sowie die entsprechenden Anteile der Terbium-Signalintensität (Terbium-Hintergrundsignale) wurden zuvor in Einzelassays gemessen. Die dabei erhaltenen Crosstalk-Anteile sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Hintergrundbereinigten Signalintensitäten I_i können nun um die Anteile des spektralen Crosstalks zwischen den Emissionsspektren der fünf FRET-Akzeptoren korrigiert werden. Zu diesem Zweck wird aus den Signalanteilen der fünf Farbstoff-Akzeptoren in den fünf Akzeptor-Detektionskanälen i aus Tabelle 1 eine 5x5-Matrix \mathbf{M} gebildet. Mit Hilfe der (numerisch) invertierten Matrix \mathbf{M}^{-1} können dann aus den Hintergrundbereinigten Signalintensitäten I_i die Crosstalk-korrigierten Signalintensitäten A_j der fünf Akzeptorfarbstoffe $j = \text{OG488, AF555, AF568, Cy5 und AF700}$ im Multiplexing-Assay berechnet werden:

$$\begin{pmatrix} A_{OG488} \\ A_{AF555} \\ A_{AF568} \\ A_{Cy5} \\ A_{AF700} \end{pmatrix} = \mathbf{M}^{-1} \cdot \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \\ I_4 \\ I_5 \end{pmatrix} \quad (2)$$

Die Crosstalk-korrigierten Signalintensitäten A_j im Fünffach-Multiplexing-Assay sind nun direkt proportional zur Konzentration der mit dem entsprechenden Akzeptorfarbstoff markierten „AB1-TM-AB2“-Immunkomplexe, die wiederum direkt proportional zur jeweiligen TM-Konzentration in der untersuchten Serumprobe sind. Somit können durch die Messung einer einzigen 50 μL -Serumprobe eines Patienten in einem FRET-Immunoassays mit einem lumineszenten Terbium-komplex als Donor und fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-Akzeptoren (je einer spezifisch für einen Analyten), fünf Lungenkrebs-TM gleichzeitig detektiert werden.

Tabelle 1: Relative Signalanteile der fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-Akzeptoren in den fünf Akzeptor-Detektionskanälen $i = 1-5$, die durch den spektralen Crosstalk zwischen den Emissionsspektren der fünf FRET-Akzeptoren hervorgerufen werden. In der letzten Spalte sind zudem die relativen Anteile f_{Tb} der Terbium-Signalintensität im Akzeptor-Detektionskanal i gezeigt. (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quelle [1] Copyright 2013 American Chemical Society.)

Detektionskanal i	OG488	AF555	AF568	Cy5	AF700	f_{Tb}
$i = 1$ (520 nm)	1	0	0	0	0.005	0.094
$i = 2$ (570 nm)	0.140	1	0.076	0	0.009	0.093
$i = 3$ (610 nm)	0.025	0.372	1	0.002	0.035	0.069
$i = 4$ (660 nm)	0.004	0.234	0.645	1	0.057	0.361
$i = 5$ (710 nm)	0	0.033	0.091	0.212	1	0.007

Einzel-TM-Immunoassays

Um die Wirksamkeit der Crosstalk-Korrektur zu demonstrieren, wurden zunächst Einzel-TM-Immunoassays für jeden TM durchgeführt, d.h. es wurden FRET-Assays gemessen, bei denen zwar alle fünf Donor-Akzeptor-Antikörperpaare vorgelegt wurden, jedoch jeweils nur einer der fünf TM in der Probe vorhanden waren. Die am KRYPTOR-Immuno-reader gemessenen (unkorrigierten) Signalintensitäten S_i aller fünf Akzeptor-Detektionskanäle i sowie die mit Hilfe der oben beschriebenen Crosstalk-Korrektur berechneten Akzeptor-Signalintensitäten A_j für den Einzel-TM-Assay mit CEA sind in Abbildung 3 dargestellt.

Im oberen Graph von Abbildung 3 wird der spektrale Crosstalk zwischen den Akzeptorfarbstoff-Emissionen sowie der Einfluss der Terbium-Hintergrundsignale deutlich sichtbar. So steigen mit zunehmender CEA-Konzentration nicht nur die Signalintensitäten im entsprechenden Detektionskanal D3 (orange, Detektion von AF568) an, sondern auch im Detektionskanal D4 (rot, Cy5) sowie etwas schwächer in den Detektionskanälen D2 (grün, AF555) und D5 (braun, AF700). Außerdem sind deutlich die unterschiedlich starken Terbium-Hintergrundsignale in den fünf Detektionskanälen an den verschiedenen hohen Signalintensitäten bereits in Abwesenheit aller Tumormarker ($[\text{CEA}] = 0$) erkennen. So sind im CEA-Einzelassay aufgrund des starken Akzeptor-Crosstalks und aufgrund der hohen Terbium-Hintergrundsignale die gemessenen Signalintensitäten im Detektionskanal D4, welcher für den TM Cyfra21-1 vorgesehen ist, höher als im eigentlichen CEA-Detektionskanal D3. Die korrigierten Signalintensitäten im unteren Graph von Abbildung 3 bleiben jedoch für alle TM außer CEA annähernd konstant bei Null über den gesamten vermessene CEA-Konzentrationsbereich, was die Funktionsfähigkeit der angewendeten Crosstalk-Korrektur erfolgreich demonstriert.

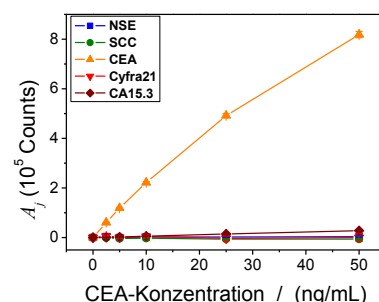
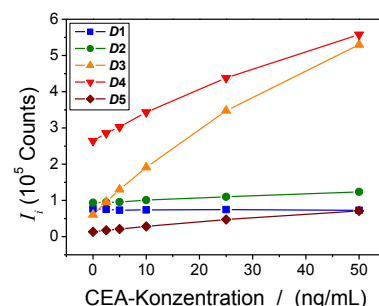


Abb.3: Ergebnisse des Einzel-TM-Immunoassays zum Nachweis von CEA vor (oben) und nach (unten) der Hintergrund-Korrektur entsprechend Gleichung (1) und der Crosstalk-Korrektur entsprechend Gleichung (2). Im CEA-Einzel-Immunoassay liegen alle fünf Lumi4Tb-markierten Donor-AB und alle fünf Fluoreszenzfarbstoff-markierten Akzeptor-AB vor, aber in der Serumprobe ist nur der TM CEA in ansteigenden Konzentrationen vorhanden, weshalb die Signalintensitäten im entsprechenden Detektionskanal bei 610 nm (orange) ansteigen. Aufgrund des spektralen Crosstalks wird in den unkorrigierten Signalen I_i (oben) jedoch auch ein Anstieg in den spektral benachbarten Detektionskanälen gemessen, und es zeigen sich zudem unterschiedlich hohe Hintergrund-Signalintensitäten (Offsets), die auf verschiedene Terbium-Hintergrundsignale in den fünf Detektionskanälen zurückzuführen sind. In den korrigierten Signalen A_j (unten) wurden die Terbium-Hintergrundsignale und Crosstalk-Signalanteile rausgerechnet, so dass nur noch der Anstieg der FRET-Signale in Abhängigkeit von der CEA-Konzentration zu verzeichnen ist. (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quelle [1] Copyright 2013 American Chemical Society.)

Fünffach-Multiplexing-Immunoassays

Im nächsten Schritt wurden nun Multiplexing-Immunoassays mit allen fünf Lungenkrebs-TM in der Serumprobe durchgeführt, wobei zunächst die Konzentrationen aller TM gleichzeitig von je 0.5x nach 10x der höchsten Normalkonzentrationen erhöht wurde. Zu beachten ist hierbei, dass sich die absoluten Konzentrationen (in ng/mL bzw. U/mL) der fünf TM in der Probe deutlich voneinander unterscheiden, da die Normalkonzentrationen (1x) aller fünf Lungenkrebs-TM unterschiedlich sind (12.5 ng/mL für NSE, 3 ng/mL für SCC, 5 ng/mL für CEA, 3 ng/mL für Cyfra21-1 und 30 U/mL für CA15.3). Die Ergebnisse des Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit gleichzeitigem Anstieg der TM-Konzentrationen sind in Abbildung 4 (oben) gezeigt, wobei die korrigierten Signalintensitäten bereits mit Hilfe der Kalibrierkurven, die aus den Einzel-TM-Immunoassays erhalten wurden, in die entsprechend gemessenen TM-Konzentrationen umgerechnet wurden.

Hierbei zeigt sich, dass die im Fünffach-Multiplexing-Immunoassay gemessenen Konzentrationen der fünf Lungenkrebs-TM sehr gut mit den nominal vorgelegten TM-Konzentrationen übereinstimmen, was nur mit Hilfe der Crosstalk-Korrektur möglich ist. Die auftretenden geringen Abweichungen der gemessenen von den vorgelegten TM-Konzentrationen sind zwar teilweise größer als die sich aus der Crosstalk-Korrektur ergebenden Fehlerbalken, sind jedoch nicht auf eine fehlerhafte Crosstalk-Korrektur-Berechnung zurückzuführen, sondern auf Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper zu den anderen Antigenen, was durch Kontrollmessungen bestätigt werden konnte. Nichtsdestotrotz lassen sich Dank der Crosstalk-Korrektur bereits jetzt mit dem noch nicht optimierten Fünffach-Multiplexing-Immunoassays gesunde TM-Konzentrationen (0.5x und 1x) von krankhaft erhöhten Konzentrationen der fünf Lungenkrebs-TM (2x bis 10x) unterscheiden.

Um die Leistungsfähigkeit der Crosstalk-Korrektur zu demonstrieren wurde schließlich ein Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit maximalem Crosstalk durchgeführt. Dabei wurde der TM, der mit dem kurzwelligsten Akzeptorfarbstoff detektiert wurde (NSE, mit OG488 in Detektionskanal D1 gemessen) in der höchsten Konzentration (10x) vorgelegt, so dass der Akzeptorfarbstoff OG488 eine hohe Signalintensität im Assay aufweist und dementsprechend maximalen spektralen Crosstalk in die längerwelligen Detektionskanäle (D2 bis D5) verursacht. Hingegen wurde der TM, der mit dem langwelligsten Akzeptorfarbstoff detektiert wurde (CA15.3 mit AF700 in Detektionskanal D5 gemessen) in der niedrigsten Konzentration (0.5x) vor-

gelegt, so dass der Akzeptorfarbstoff AF700 eine niedrige Signalintensität im Assay aufweist und der dazugehörige Detektionskanal D5 dementsprechend besonders stark von dem spektralen Crosstalk der kürzerwellig emittierenden Akzeptorfarbstoffe betroffen ist. Die Konzentrationen der drei anderen Lungenkrebs-TM wurden jeweils gegenläufig von 0.5x nach 10x (für SCC und Cyfra21-1) bzw. von 10x nach 0.5x (für CEA) variiert. Die Ergebnisse dieses Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit maximalem spektralem Crosstalk sind in Abbildung 4 (unten) dargestellt, wobei die korrigierten Signalintensitäten wieder mit Hilfe der Kalibrierkurven aus den Einzel-TM-Immunoassays in die gemessenen TM-Konzentrationen umgerechnet wurden. Trotz des starken spektralen Crosstalks, die sich aus den gewählten Konzentrationen der fünf TM in den Serumproben ergeben, stimmen die mittels Crosstalk-Korrektur bestimmten TM-Konzentrationen hervorragend mit den nominal vorgelegten TM-Konzentrationen überein.

Nachweisgrenzen (LOD)

Schließlich wurden für die durchgeführten Einzel-TM-Immunoassays und Fünffach-Multiplexing-Immunoassays die Nachweisgrenzen (LOD, *limit of detection*) berechnet, die sich aus dem Dreifachen der Standardabweichung des erhaltenen (Crosstalk-korrigierten Konzentrationswertes der Nullprobe (Serum, ohne TM) geteilt durch den (linearen) Anstieg der entsprechenden Kalibrierkurve ergibt. Die erhaltenen Nachweisgrenzen für die fünf Lungenkrebs-TM sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass die LOD des Fünffach-Multiplexing-Immunoassays beinahe so gut sind, wie die LOD der Einzel-TM-Immunoassays, was für die Güte der Crosstalk-Korrektur spricht. Ein Vergleich mit den Normalkonzentrationen der fünf Lungenkrebs-TM zeigt, dass vier der fünf TM deutlich unterhalb ihrer physiologischen Konzentrationen detektiert werden können, während die LOD für NSE immerhin im gleichen Konzentrationsbereich von 12-13 ng/mL liegt. Somit kann bereits mit dem jetzigen, nicht-optimierten Fünffach-Multiplexing-Assay zwischen gesunden und krankhaft-erhöhten TM-Konzentrationen unterschieden und auf dieser Grundlage eine Lungenkrebs-Diagnose gestellt werden. Zwar liegen die erreichten Nachweisgrenzen für NSE, SCC und Cyfra21-1 noch oberhalb der LOD der kommerziellen klinischen Assays, jedoch kann in diesen immer nur jeweils einer der TM gemessen werden, während mit dem Multiplexing-Assay die gleichzeitige Messung aller fünf Lungenkrebs-TM möglich ist. Für CEA und CA15.3 konnten bereits die gleichen LOD wie die des klinischen Goldstandards

erreicht werden, und für die anderen TM ist dies durch eine Optimierung der Antikörper-Antigen-Paare (ausschließen von Kreuzreaktivitäten) und der FRET-Immunoassay-Durchführung (z.B. automatisches Pipettieren und automatisierte Messung inkl. schneller Filterwechsel für jeden Detektionskanal) ebenfalls möglich.

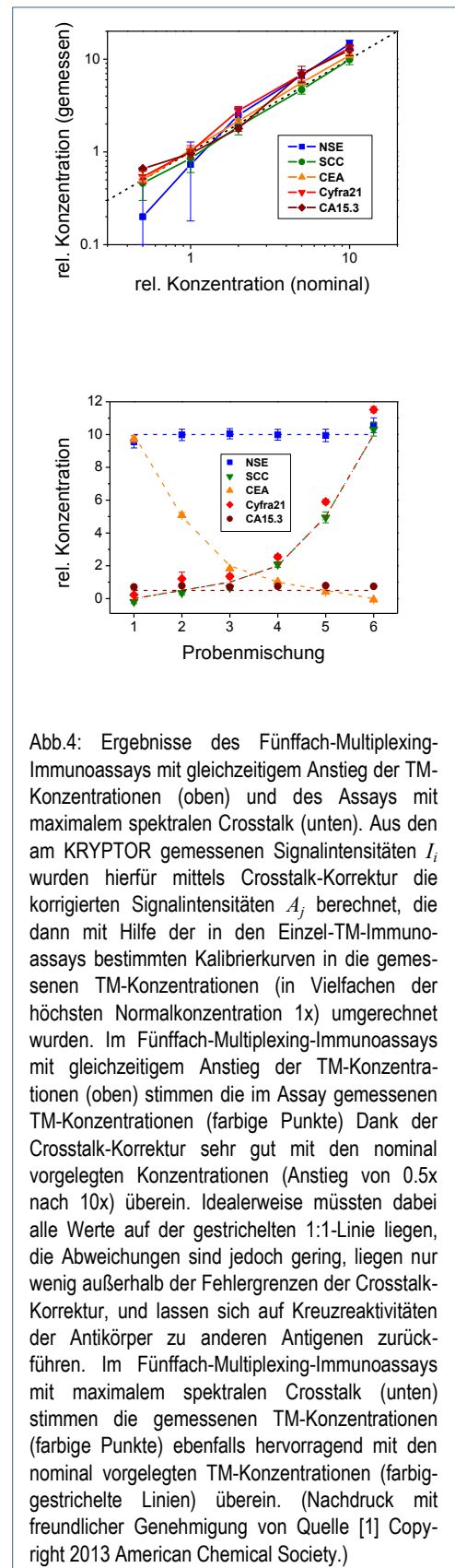


Abb.4: Ergebnisse des Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit gleichzeitigem Anstieg der TM-Konzentrationen (oben) und des Assays mit maximalem spektralem Crosstalk (unten). Aus den am KRYPTOR gemessenen Signalintensitäten I_i wurden hierfür mittels Crosstalk-Korrektur die korrigierten Signalintensitäten A_i berechnet, die dann mit Hilfe der in den Einzel-TM-Immunoassays bestimmten Kalibrierkurven in die gemessenen TM-Konzentrationen (in Vielfachen der höchsten Normalkonzentration 1x) umgerechnet wurden. Im Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit gleichzeitigem Anstieg der TM-Konzentrationen (oben) stimmen die im Assay gemessenen TM-Konzentrationen (farbige Punkte) Dank der Crosstalk-Korrektur sehr gut mit den nominal vorgelegten Konzentrationen (Anstieg von 0.5x nach 10x) überein. Idealerweise müssten dabei alle Werte auf der gestrichelten 1:1-Linie liegen, die Abweichungen sind jedoch gering, liegen nur wenig außerhalb der Fehlergrenzen der Crosstalk-Korrektur, und lassen sich auf Kreuzreaktivitäten der Antikörper zu anderen Antigenen zurückführen. Im Fünffach-Multiplexing-Immunoassays mit maximalem spektralem Crosstalk (unten) stimmen die gemessenen TM-Konzentrationen (farbige Punkte) ebenfalls hervorragend mit den nominal vorgelegten TM-Konzentrationen (farbig-gestrichelte Linien) überein. (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quelle [1] Copyright 2013 American Chemical Society.)

Zusammenfassung

In diesem Beitrag präsentieren wir einen optischen Multiplexing-Immunoassay zur Früherkennung von Lungenkrebs durch die Messung der SCLC- und NSCLC-spezifischen Tumormarker NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1 und CA15.3 in Serum, den wir kürzlich in der Fachzeitschrift *Journal of the American Chemical Society* (Geißler et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (3), 1102-1109, doi: [dx.doi.org/10.1021/ja310317n](https://doi.org/10.1021/ja310317n)) veröffentlicht haben. Das Messprinzip basiert auf dem simultanen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) von einem lumineszenten Terbiumkomplex zu fünf verschiedenen organischen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Terbium-Donoren und Farbstoff-Akzeptoren sind für den Immunoassay an zwei verschiedene Antikörper gegen die jeweiligen Tumormarker (TM) gebunden. Die Detektion beruht auf der Bildung von "AB1-TM-AB2"-Immunkomplexen, in denen FRET vom Terbium-Donor auf die fünf Akzeptorfarbstoffe möglich ist. Die in den fünf Detektionskanälen zeitverzögert gemessenen FRET-Signale werden um die Terbium-Hintergrundsignale und den Anteil der Crosstalksignale korrigiert, welche durch die spektrale Überlappung der Akzeptor-Emissionsbanden entstehen. Diese korrigierten Signalintensitäten sind dann direkt proportional zu den TM-Konzentrationen in der Serumprobe. Mit unserem homogenen Fünffach-Multiplexing FRET-Immunoassay haben wir eine sehr sensitive, parallele Detektion der fünf Lungenkrebs-TM in einer einzigen 50 µL Serumprobe entwickelt, wobei Nachweisgrenzen (LOD) im niedrigen ng/mL-Bereich erreicht werden, die teilweise bereits mit den etablierten klinischen Assays vergleichbar sind. Unser Fünffach-Multiplexing-Assay lässt sich auf viele andere Biomarker übertragen und ist hervorragend für schnelle und kostengünstige Vor-Ort-Messungen (Point-of-Care-Diagnostik) als auch für Hochdurchsatz-Messungen geeignet, weshalb er in vielen Bereichen der *in-vitro*-Diagnostik Anwendung finden kann.

Tabelle 2: Nachweisgrenzen (LOD) der durchgeführten Einzel-TM-Immunoassays und des Fünffach-Multiplexing-Immunoassays im Vergleich zu den LOD der entsprechenden kommerziellen, klinischen Assays von Cezanne / Thermo Fisher Scientific. Zum Vergleich sind zudem die höchsten Normalkonzentrationen (1x) der fünf Lungenkrebs-TM gezeigt, wie sie im Blutserum eines gesunden Menschen vorkommen. (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quelle [1] Copyright 2013 American Chemical Society.)

LOD	NSE (ng/mL)	SCC (ng/mL)	CEA (ng/mL)	Cyfra21-1 (ng/mL)	CA15.3 (U/mL)
Einzelassays	6.7	0.6	0.20	1.4	0.04
5xMultiplexing	12.8	0.9	0.15	1.9	0.23
klinischer Assay	0.8	0.1	0.2	0.16	0.3
Normalkonz. (1x)	12.5	3.0	5.0	3.0	30

Literatur

- [1] D. Geißler, S. Stufler, H.-G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1102-1109
- [2] P. Boyle, B. Levin, *World Cancer Report 2008, International Agency for Research on Cancer (IARC)*, Lyon, **2008**.
- [3] American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2008*, American Cancer Society: Atlanta, **2008**.
- [4] W. D. Travis, L. B. Travis, S. S. Devesa, *Cancer* **1995**, 75, 191-202.
- [5] R. Molina, X. Filella, J. M. Auge, *Eur. Oncol. Dis.* **2006**, 1, 106-109.
- [6] R. Molina, X. Filella, J. M. Auge, R. Fuentes, I.; Bover, J. Rifa, V. Moreno, E. Canals, N. Vinolas, A. Marquez, E. Barreiro, J. Borrás, P. Viladiuc, *Tumor Biol.* **2003**, 24, 209-218.
- [7] R. Molina, J. M. Auge, J. M. Escudero, R. Marrades, N. Vinolas, E. Carcereny, J. Ramirez, X. Filella, *Tumor Biol.* **2008**, 29, 371-380.
- [8] D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, 2nd ed. Nature Pub. Group, London, **2001**.
- [9] U. Wollenberger, R. Renneberg, F. F. Bier, F.W. Scheller, *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [10] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7-17.
- [11] B. W. Van Der Meer, G. Coker, S. S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, Wiley-VCH, Weinheim, **1994**.
- [12] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
- [13] R. M. Clegg, *Förster resonance energy transfer - FRET what is it, why do it, and how it's done*, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; T. W. J. Gadella (Ed.), Academic Press, Burlington, **2009**, 33, 1-57.
- [14] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819-846.
- [15] E. P. Diamandis, *Clin. Chim. Acta* **1990**, 194, 19-50.
- [16] J. Szöllosi, S. Damjanovich, L. Mátyus, *Cytometry* **1998**, 34, 159-179.
- [17] H. Sahoo, *J. Photochem. Photobiol. C - Photochem. Rev.* **2011**, 12, 20-30.
- [18] G. Mathis, *Clin. Chem.* **1993**, 39, 1953-1959.
- [19] P. R. Selvin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, 31, 275-302.
- [20] L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 2008, 3241-3251.
- [21] T. Kokko, L. Kokko, T. Soukka, *J. Fluor.* **2009**, 19, 159-164.
- [22] K. R. Kupcho, D. K. Stafslie, T. DeRosier, T. M. Hallis, M. S. Ozers, K. W. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13372-13373.
- [23] S. H. Kim, J. R.; Gunther, J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4685-4692.
- [24] J. Xu, T. M. Corneillie, E. G. Moore, G.-L. Law, N. G. Butlin, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19900-19910.
- [25] <http://www.kryptor.net/>
- [26] E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.* **1988**, 21, 139-150.
- [27] L. E. Morrison, *Anal. Biochem.* **1988**, 174, 101-120.
- [28] E. F. G. Dickson, A. Pollak, E. P. Diamandis, *Pharm. Therap.* **1995**, 66, 207-235.
- [29] A. K. Hagan, T. Zuchner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 2847-2864.