

# ACUTLAB

## Entwicklung eines Vor-Ort-Analysensystems für organspezifische Notfalllaborparameter

Innere Medizin IV des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung für Klinische Chemie/Zentrallabor / Prof. Dr. E. Schleicher  
sabine.neukamm@med.uni-tuebingen.de

### Hintergrund

Bedingt durch die Notwendigkeit direkt am Patientenbett oder in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Patienten Analysen durchführen zu müssen, werden in den letzten Jahren Point-of-Care-Testing (POCT) Systeme entwickelt. Diese Systeme sollen bei lebensbedrohlichen Notfallsituationen zeitnah diagnostisch und therapeutisch relevante Messwerte liefern. Die in der klinisch-chemischen Diagnostik verwendeten und weltweit etablierten Parameter zur Erkennung von Organschäden (Herz, Niere, Leber, Pankreas) sind nicht auf einer POCT-Plattform verfügbar. Ein wesentlicher Grund dafür ist, dass die für die Bestimmung von Organschäden verwendeten Parameter Enzyme sind, die mittels Aktivitätsbestimmung spezifisch, sensitiv, präzise und billig nasschemisch quantifiziert werden können. Die Bestimmung einer Enzymaktivität eignet sich jedoch nicht für POCT-Geräte. Antikörperbasierte POCT-Geräte könnten mehrere Parameter parallel auf der gleichen Messplattform erfassen und so eine umfassende und schnelle Diagnostik ermöglichen.

### Ziel

Ziel des Projektes ist es, ein „Vor-Ort-Analysesystem“ für organspezifische Notfallparameter zu entwickeln und im klinischen Kontext zu evaluieren. Die organspezifischen Biomarker Cystatin C und Pankreaslipase werden im Rahmen dieses Projektes verwendet.

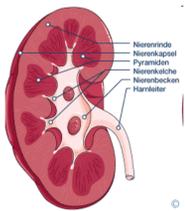
Das Projekt wird von zwei Projektpartnern gemeinsam bearbeitet und die Aufgaben sind folgendermaßen verteilt:

**Aufgabe des IPTC** ist die Assayentwicklung für die gewünschten Parameter, da jeder Parameter wegen seiner speziellen Antigen/Antikörper-Wechselwirkung immunologisch unterschiedliche Rahmenbedingungen erfordert und die notwendige Erfahrung zur Optimierung auch für niedrige Konzentrationsbereiche gesammelt werden muss. Als Testformat soll der Bindungshemmtest oder ein Sandwich Assay eingesetzt werden.

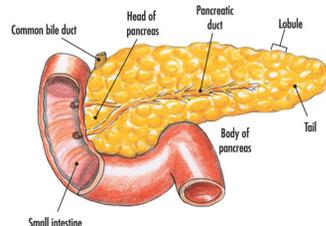
**Aufgabe des UKT** ist die Bereitstellung von spezifischen Bindungspartnern für Cystatin C und Lipase. Das soll u.a. durch Generierung von monoklonalen Antikörpern geschehen. Diese Antikörper werden dann auf ihre Affinität und Spezifität geprüft und gegebenenfalls mit kommerziell verfügbaren Antisera verglichen. Nach Fertigstellung eines Prototyp wird das System im klinischen Kontext evaluiert.

### Biomarker

Erkennung von Organschädigungen → organspezifische Biomarker



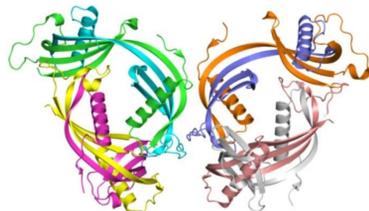
Niere → Cystatin C



Pankreas → Lipase

### Biomarker Cystatin C

- Eigenschaften:**
- kleines Protein (13,6 kDa)
- Cystein-Protease-Inhibitor
- gebildet von nahezu allen Gewebezellen
- konstante Konzentration im Blut von 0,53 – 0,95 mg/L



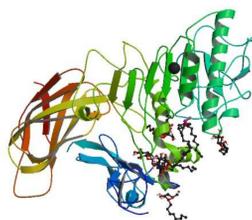
R. Janowski et al. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *Journal of Molecular Biology* 2004, 341, 151-160

- wird durch Niere filtriert und nicht rückresorbiert
- Biomarker für Nierenschädigung (Filtrationsleistung)
- Vorteil: nicht von der Muskelmasse abhängig (Kinder/Diabetiker)
- Plasmakonzentration korreliert mit Nierenfiltration (Quantitativ)

sehr spezifisch für Einschränkung der Nierenfiltrationsleistung

### Biomarker Pankreaslipase

- Eigenschaften:**
- Protein mit 46 kDa (420 AS) Cofaktoren !
- Enzym zur Fettverdauung
- Indikator für Entzündung der Bauspeicheldrüse (Pankreatitis)
- Referenzbereich 7 – 57 U/L
- Pankreatitis > 100 U/L
- akutes Pankreasversagen 300 – 1000 U/L



M.P. Egloff et al. The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* 1995, 34, 2751-2762

sehr spezifisch für Erkrankungen des Pankreas

### Generierung monoklonaler Antikörper

In Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München (Dr. E. Kremmer)

- Synthese antigener Peptide zur Immunisierung
- mehrere Peptide gegen verschiedene Bereiche im Protein
- “Doa” – (8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid) als hydrophiler Spacer
- “Abu” – (α-Aminobuttersäure) ersetzt sequenzeigenes Cystein
- Kopplung an BSA (bovine serum albumin) oder OVA (Ovalbumin)

#### Cystatin C

hCYTC 1 (27-40)	H-SSPGKPPRLVGGP-Doa-Doa-Cys-OH
hCYTC 2 (93-109)	H-Cys-Doa-Doa-cyclo [KTKTQPNLDNE]
hCYTC 3 (123-143)	H-Cys-Doa-Doa-cyclo [KSFQIYAVPWQGTMTLSKSTE]
hCYTC 4 (93-109)	H-Cys-Doa-Doa-Abu-KTKTQPNLDNE-Abu-NH <sub>2</sub>
hCYTC 5 (123-143)	H-Cys-Doa-Doa-Abu-SFQIYAVPWQGTMTLSKST-Abu-NH <sub>2</sub>

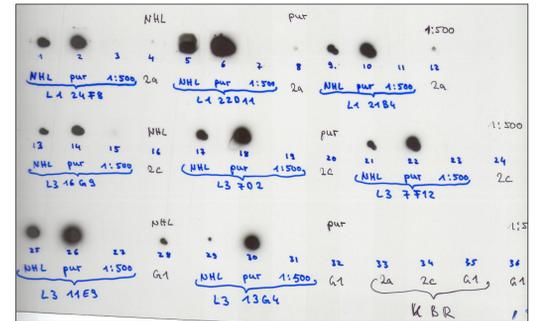
#### Pankreaslipase

hLIPP 1 (25-42)	H-Cys-Doa-Doa-FSDDSPWSGITERPLHI-NH <sub>2</sub>
hLIPP 2 (71-87)	H-Cys-Doa-Doa-DSSISGSNFKTRNRKTR-NH <sub>2</sub>
hLIPP 3 (248-266)	H-Cys-Doa-Doa-VEMPGCKKNILSQIVDID-NH <sub>2</sub>

### Doblot: Lipase Antikörper im Test

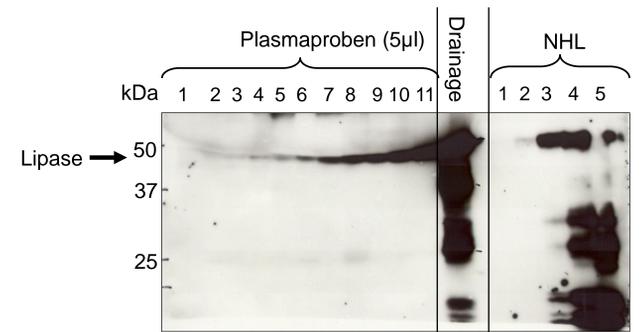
Lipase Antikörper im Test mit einem kommerziellen Antigen und humaner Drainage-Flüssigkeit

- NHL (Native Humane Lipase), kommerzielles Antigen als Positivkontrolle (500 ng/μl)
- Lipase-Konzentration der Drainage-Flüssigkeit im Zentrallabor ermittelt (ca. 150000 U/L)
- Drainage-Flüssigkeit pur und verdünnt (1:500; ca. 300 U/L) eingesetzt



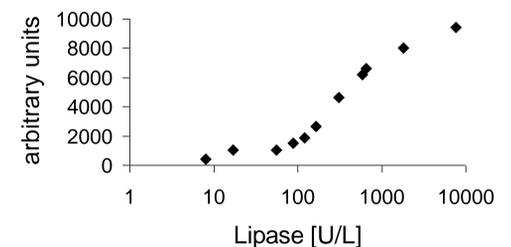
### Lipase Antikörper im Test mit Plasmaproben

Human Plasmaproben mit nicht-pathologischen und pathologischen Lipasekonzentrationen werden in aufsteigender Lipasekonzentration mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot wird die Membran mit einem Antikörper gegen Lipase inkubiert.



- Lane 1 – 3: 8 – 56 U/L (nicht-pathologisch)
- Lane 4 – 11: 89 – 7702 U/L (pathologisch)
- Drainage: 35 736 U/L
- NHL (Kontrolle): 31 – 500 ng

- graphische Darstellung der Lipasekonzentration
- Lipasekonzentration (U/L) gegen die Signalintensitäten des Antikörpers gegen Lipase im Western Blot aufgetragen



### Zusammenfassung

Im vorgestellten Teilprojekt wurden für die im Parallelantrag entwickelte Biosensortechnologie monoklonale Antikörper generiert und evaluiert. Mit Hilfe dieser Antikörper, die humane Pankreaslipase spezifisch erkennen, kann Pankreaslipase in humanen Plasmaproben im normalen und pathologischen Bereich quantifiziert werden. Zusammen mit den bereits vorhandenen Cystatin C Antikörpern werden diese Parameter nun auf die Plattform adaptiert um so Laborparameter für die Nierenfunktion und die Pankreasschädigung zu erhalten. Dabei soll eine Übertragung des Konzepts auf andere organspezifische Notfallparameter gewährleistet sein.

#### Antragsteller:

Prof. Dr. Günter Gauglitz  
Institut für Physikalische Chemie und Theoretische Chemie (IPTC), Universität Tübingen und

Prof. Dr. Erwin Schleicher  
Abt. Klinische Chemie/Zentrallabor am Universitätsklinikum Tübingen (UKT)

#### Projektbegleitender Ausschuss:

Klaus Haberstroh  
ESE Embedded System Engineering GmbH

Dr. Günther Proll  
Biametrics Marken und Rechte GmbH

Dr. Michael Steinwand  
Innovendia Consulting

Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Peter Lupp  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie Klinikum Rechts der Isar der TU München

Dr. Robert Goes  
Laborärzte Sindelfingen

**Projektlaufzeit: 24 Monate**

**Projektvolumen UKT: 150.000 €**

Wir bedanken uns beim Bundesministerium für Wissenschaft und der Allianz Industrie Forschung



Supported by:  
Federal Ministry of Economics and Technology

on the basis of a decision by the German Bundestag

**Kontakt:**  
Prof. Dr. Erwin Schleicher  
Abt. Klinische Chemie/Zentrallabor am Universitätsklinikum Tübingen (UKT),  
Hoppe-Seyler-Str. 3, D-72076 Tübingen  
Tel.: 07071-29-80602, Fax.: 07071-29-4696, Email: Erwin.Schleicher@med.uni-tuebingen.de

**Quellen:**  
Dhamidharka V. R., Kwon C., Stevens G. (2002) Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* 40(2): 221-226  
Smith R.C., Southwell-Keely J., Chesher D. (2005) Should serum pancreatic lipase replace serum amylase as a biomarker of acute pancreatitis? *ANZ J Surg.* 75: 399-404