
Für

**Julian,
Louis,
Leonie und
Luca**

Dissertation

**Bead-basierte
Fluoreszenz-Immunoassays
zum
Nachweis tumorinduzierter Proteine**

vorgelegt von
Dipl. Chem. Silvia Scheffler
aus Bielefeld
am
20.12.2007

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. p53 – ein zentrales Protein der Zellregulation	1
1.1.1. <i>Das p53-Protein und seine Funktion im Zellkern</i>	2
1.1.2. <i>p53-Antikörper in der Krebsdiagnostik</i>	4
1.2. Insuline-like Growth Factor-I und Tumorerkrankungen	5
1.3. Motivation für diese Arbeit	7
2. Theorie	10
2.1. Immunologischer Hintergrund	10
2.1.1. <i>Funktion und Struktur von Antikörpern</i>	10
2.1.2. <i>Der generelle Aufbau immunologischer Nachweise</i>	11
2.1.3. <i>Mögliche Realisierungen am Beispiel von ELISA und IMS-ECL</i>	15
2.1.4. <i>Bestimmung von Komplexbildungskonstanten</i>	17
2.2. Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung	21
2.2.1. <i>Absorption</i>	21
2.2.2. <i>Die Fluoreszenz organischer Farbstoffe</i>	23
2.2.3. <i>Fluoreszenzlöschung</i>	27
2.2.4. <i>Fluoreszenzlöschung in „Smart-Probes“</i>	31
2.3. Fluoreszenzmikroskopische Techniken in immunologischen Nachweisen	33
2.3.1. <i>Weitfeldmikroskopie</i>	35
2.3.2. <i>Konfokale Fluoreszenzmikroskopie</i>	36
2.3.3. <i>Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)</i>	37
3. Material und Methoden	41
3.1. Messinstrumente und mikroskopische Aufbauten	41
3.1.1. <i>Ensemble Messungen</i>	41
3.1.2. <i>FCS-Mikroskopie</i>	41
3.1.3. <i>interne Totalreflektionsmikroskopie (Total Internal Reflection TIR)</i>	42

3.1.4. Weitfeldmikroskopie	42
3.2. Vorbereitung der Proben	43
3.2.1. Fluoreszenzmarkierung von Oligopeptiden und Antikörpern	43
3.2.2. kovalente Beschichtung der PS-Beads mit den Peptiden	44
3.2.3. Versuchsvorbereitungen	45
3.3. Methoden	48
3.3.1. Bestimmung des Anteils gebundenen Epitops durch FCS-Experimente	48
3.3.2. Entwicklung einer Methode zur einfachen Unterscheidung von farbstofftragenden und freien Beads und zur quantitativen Bestimmung des Markierungsgrades	49
4. Ergebnisse und Diskussion	58
4.1. Nachweis von p53 Antikörpern aus humanem Blutserum in Lösung und an Glasoberflächen	58
4.1.1. Epitopwahl und Ensembleexperimente	59
4.1.2. Homogener Bindungsassay mittels FCS	62
4.1.3. Heterogener Nachweis an modifizierten Glasoberflächen	69
4.1.4. Diskussion der homogenen Experimente und der Versuche auf Glasoberflächen	72
4.2. Untersuchungen zu Lösungs- und Bindungsverlust der Epitope durch Zersetzung der Peptide	74
4.2.1. Betrachtung des Einflusses verschiedener Faktoren auf Fluoreszenzlösungs- und Bindungsverlust	74
4.2.2. Zusammenfassung und Diskussion der Beobachtungen zur Epitopzersetzung	80
4.3. Qualitativer und Quantitativer Nachweis von Proteinen aus humanem Blutserum durch Nachweise auf Mikrobeads	85
4.3.1. Kompetitiver, quantitativer Nachweis von Wachstumsfaktoren	85
4.3.2. Qualitativer Nachweis von p53-Autoantikörpern aus humanem Blutserum	91
4.3.3. Bewertung und Diskussion der Experimente auf PS-Beads	97
4.4. Bewertung und Vergleich der Versuche an p53-Antikörpern	100

4.4.1. Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden	100
4.4.2. Vergleich der Ergebnisse des Beadassays mit den Resultaten ähnlicher Arbeiten	102
5. Zusammenfassung	104
6. Ausblick	106
6.1. Quantitativer Nachweis von Serumproteinen	106
6.2. Qualitativer Nachweis von p53-Autoantikörpern	107
7. Anhänge	109
7.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109
7.2. Ein- und Dreibuchstaben-Code der Standardamino­säuren	110
7.3. Verzeichnis der biologischen Ausdrücke	111
7.4. Abbildungsverzeichnis	116
7.5. Literaturverzeichnis	120
7.6. Verzeichnis der Veröffentlichungen	128
Danksagung	129

1. Einleitung

VORBEMERKUNG: Zum leichteren Verständnis sind immunologische Fachbegriffe bei der ersten Verwendung durch kursive Schreibweise gekennzeichnet und im Anhang erklärt.

Die frühe Erkennung und somit erfolgreichere Behandlung von Krebs ist seit einigen Jahrzehnten der Gegenstand von Forschung in allen Bereichen der Naturwissenschaften. In der vorliegenden Arbeit wird ein hochsensitiver immunologischer Nachweis vorgestellt, welcher Antikörper gegen das signifikant mit der *Tumorgenese* verknüpfte Protein p53 selektiv in Krebspatienten nachweist. Der erste von vier Themenkomplexen dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem chemischen Verhalten der für den Nachweis verwendeten fluoreszenzmarkierten Peptidsonden so wie mit alternativen Techniken zum funktionierenden Nachweis. Im zweiten Themenbereich wird das chemische Verhalten der Peptide genauer untersucht und nötige Schlüsse für die im dritten Teil vorgestellten Nachweise gezogen. Abschließend werden die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Nachweisverfahren im biologischen Kontext betrachtet und mit weiteren bestehenden Nachweissystemen verglichen.

Thematisch ist die Arbeit eng mit Struktur und Funktion des *Tumorsuppressorproteins* p53, dessen Antikörpern sowie mit dem ebenfalls mit Krebs assoziierten IGF-I verbunden. Daher sollen die genannten Proteine auf den folgenden Seiten kurz vorgestellt werden.

1.1. p53 – ein zentrales Protein der Zellregulation

Im Jahr 1979 wurde p53 als Ziel des tumorinduzierenden Virus SV40 gefunden [Lane und Crawford 1979; Linzer und Levine 1979]. Nachdem über 10 Jahre später erste Veränderungen im Protein codierenden Erbgut festgestellt wurden [Harris 1993] wurden große Hoffnungen in das Protein als globaler *Tumormarker* gesetzt. Namen wie „Wächter des Genoms“ [Lane 1992], „good cop/bad cop“ [Sharpless und DePinho 2002], „Todesstern“ [Vousden 2000] oder „Akrobat der Tumorgenese“ [Moll und Schramm 1998] wurden dem Protein und seinem Gen gegeben. Sie zeigen plastisch die an dieses Protein geknüpften Erwartungen. Obwohl seine Bedeutung für die Signalwege nach *zellulärem Stress* bekannt ist [Vogelstein, Lane et al. 2000], ist die diagnostische Anwendbarkeit dieses

Wissens bis heute begrenzt. Seit der Entdeckung des Proteins war es Gegenstand von über 20.000 Publikationen. Diese Arbeiten führten einerseits zu einem tieferen Verständnis der Tumorgenese, andererseits werden seine Funktionen bis heute kontrovers diskutiert [Vogelstein, Lane et al. 2000].

1.1.1. Das p53-Protein und seine Funktion im Zellkern

Das 47,3 kDa große und 392 Aminosäuren lange *Nucleusprotein* p53 bildet im Körper Tetramere. Jede der vier Einheiten kann in drei funktional unterschiedliche Einheiten unterteilt werden. Im *N-Terminus* befinden sich die beiden *Transaktivierungsdomänen* des Proteins (AS 1-92). Sie enthalten einen der beiden Erkennungsorte für den Export des Proteins aus dem Zellkern. Die zentrale DNA-bindende Domäne (AS 101-300) setzt hauptsächlich sich aus unpolaren Aminosäuren zusammen und liegt globulär vor. Die meisten der über 1000 bekannten *Punktmutationen* des codierenden Gens liegen in diesem Bereich der Sequenz. Die *C-terminale* Domäne (AS 316-392) hat, wie die N-terminale, regulatorische Funktion. Sie enthält alle Kernlokalisationssignale für den Import in den Zellkern, ein weiteres Exportsignal sowie die Oligomerisierungsdomäne.

In letzter Zeit wird immer wieder diskutiert, ob p53 tatsächlich „nur“ ein zentrales Tumorsuppressorprotein ist. Es gibt deutliche Hinweise, dass viele seiner Funktionen wie Regulation der Alterung oder körperliche Konstitution [Pietsch, Humbey et al. 2006] auch im gesunden Organismus stattfinden und bisher nicht ausreichend beachtet wurden [Vousden und Lane 2007].

Die Kontrolle des p53-Proteins erfolgt kaum über die Menge der gebildeten *m-RNA* sondern wird über ein komplexes Zusammenspiel von Aktivierung, Stabilisierung und Abbau des Proteins erreicht. Die Kontrolle der in der Zelle vorliegenden Proteinmenge wird über eine rückkoppelnde Wechselwirkung mit seinem negativen Regulator MDM2 erreicht. Das p53-Protein aktiviert die Expression dieser *Ubiquitinligase*. Das bei höherer p53-Konzentration vermehrt hergestellte MDM2 bindet nun seinerseits N-terminal an das p53, ubiquitiniert es und markiert es so für den Abbau. In Anwesenheit von defekter DNA oder *Onkogenen* kommt es zu einer Aktivierung des p53. Stellen Kontrollproteine einen Fehler in der DNA fest, verlangsamen sie den *Zellzyklus*. Einige von ihnen sind *Kinasen*, die neben ihrer Kontrollfunktion auch für N-terminale Phosphorylierungen am p53 verantwortlich sind, welche die Bindung des hemmenden MDM2 an das p53 verhindern. Das p53 wird im Zellkern stabilisiert und die Einleitung von direkt und indirekt von p53 aktivierter Transkription erfolgt. Die Trennung von MDM2 und

p53 wird auch beim Eindringen von *Onkogenen*, z.B. Viren erreicht. In diesem Fall wird das MDM2 über ein weiteres Protein in den *Nucleolus* gebracht, in dem sich das p53 nicht aufhält. Während die Stabilisierung N-terminal reguliert wird, wird die DNA-Affinität durch *posttranslationale Modifikationen* des C-Terminus gesteuert. Durch Phosphat und Acetyl-Gruppen wird die Konformation des Proteins verändert und die DNA-Bindungsstellen freigegeben. Über verschiedene Signalwege kann die Zelle nun mittels p53 auf den Schaden reagieren. Eine Vielzahl von Prozessen kann direkt und indirekt eingeleitet werden. Sie können in vier grundlegende Funktionen unterteilt werden [Vogelstein, Lane et al. 2000].

Ein Anhalten des Zellzyklus wird in fast jedem Fall eingeleitet. Das p53 aktiviert die *Expression* von p21 welches über Regulation bestimmter Kinasen den Übergang zwischen *G1* und *S Phase* bzw. zwischen *G2* und *Mitose* verhindert [Ohki, Nemoto et al. 2000].

Eine weitere grundlegende Reaktion auf DNA-Schäden ist die häufig als programmierter Zelltod bezeichnete Apoptose. Die intrinsische Apoptose, an der p53 direkt beteiligt ist [el-Deiry 1998], führt zu einer Störung des Membranpotentials der *Mitochondrien* mit der daraus folgenden Freisetzung prä-apoptischer Faktoren wie z.B. Cytochrom C aus dem mitochondrialen *Intermembranraum* in das *Zellplasma*. Das Tumorsuppressorprotein wirkt in diesem Fall als BCL2-homology-domain-3(BH3)-only Protein, dessen Funktion es ist, die Expression der apoptotisch wirkenden Mitglieder der die mitochondriale Apoptose regulierenden BCL2-Proteine zu aktivieren [Cory und Adams 2002; Yu und Zhang 2003; Moll, Wolff et al. 2005].

Auch die Bildung neuer Blutgefäße ist ein Bereich, der von p53 reguliert wird. Das Protein stimuliert die Expression von Genen, die diesen Prozess verhindern [el-Deiry 1998; Hendrix 2000]. Ein Fehlen dieser Regulation stellt im Falle einer Tumorbildung einen kritischen Wachstumsvorteil dieses Gewebes dar.

Nicht alle Regulationen, die p53 beeinflusst, kontrollieren direkt den Zelltod oder das Zellwachstum. Es ist bekannt, dass p53 indirekt auch die Stabilität des genetischen Materials kontrollieren kann und eine Rolle in der DNA-Reparatur sowie in *Segregation* und *Rekombination* der Chromosomen spielt [Tlsty 1997; Wahl, Linke et al. 1997].

p53 ist ein komplexer Regulator der Zelle. Dieses und die Tatsache, dass in weit mehr als der Hälfte aller Tumorerkrankungen Veränderungen in p53 festgestellt werden [Soussi 2000], sind Grund dafür, dass die Analyse von p53 sowohl einen diagnostischen Nutzen hat, als auch viel zum Verständnis der Zellregulation

beiträgt. Die Durchführung entsprechender Untersuchungen am Protein gestaltet sich jedoch schwierig, da die Halbwertszeiten von 20 Minuten für *Wildtyp*-p53 und wenige Stunden für das stabilere mutierte Protein [Dowell, Wilson et al. 1994] recht kurz sind.

1.1.2. p53-Antikörper in der Krebsdiagnostik

Antikörper gegen das Tumorsuppressorprotein p53 werden mit einer *Spezifität* von 96% in Menschen mit Tumorerkrankungen gefunden und werden mit Punktmutationen im p53-Gen und mit Akkumulation des Proteins in der Zelle in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Antikörper auf einer Selbstimmunisierung des Körpers gegen das p53-Protein mit seiner außerordentlich hohen *Immunogenität* [Kress, May et al. 1979] beruht. Bis heute ist nicht vollständig verstanden, welche Bedeutung die Existenz der Antikörper fast ausschließlich in Krebspatienten hat. Die gefundenen Antikörper gehören hauptsächlich der Klasse IgG1 selten IgM an, was für eine *humorale Immunantwort* spricht. Aber nicht nur die Gründe für ihre Bildung, auch ihre Bedeutung als Tumormarker wird immer noch kontrovers diskutiert.

Besonders kritisch in diesem Zusammenhang ist die für einen erfolgreichen immunologischen Nachweis wichtige Wahl der Antigene. Während einige Untersuchungen zeigen, dass die Verwendung einzelner, *immunodominanter Epitope* zu einer großen Anzahl nicht erkannter antikörperhaltiger Proben führt [Vennegoor, Nijman et al. 1997], kommen andere zu dem Ergebnis, dass fast alle Patienten auf bestimmte immunodominante Epitope der N- und C-terminalen Region des p53 reagieren [Lubin, Schlichtholz et al. 1993].

Sicher ist jedoch, dass die Bildung nachweisbarer Mengen von Antikörper immer mit Akkumulation des Proteins einhergeht. So können für Krebsarten wie Brust-, Darm- oder Lungenkrebs, in denen Punktmutation des p53-Gens besonders häufig sind, auch deutlich häufiger Antikörper nachgewiesen werden, als im Durchschnitt der getesteten Krebserkrankungen.

p53-Autoantikörper und Lungenkrebs

Lungenkrebs stellt mit 15% der Krebsneuerkrankungen die dritthäufigste auftretende Krebserkrankung dar. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bis heute bei 12 (Männer) bzw. 14 Prozent (Frauen). So zählen diese häufigsten Tumore auch

zu jenen mit den geringsten Heilungschancen. Besonders gefährlich werden die verschiedenen Lungenkarzinome dadurch, dass die Veränderungen der Lunge auch mit entsprechenden Techniken (Thorax-Röntgen, Computertomografie, Sputum-Zelluntersuchung) nicht ausreichend früh erkannt werden. Bei Auftreten der ersten Beschwerden ist die Tumorbildung häufig schon weit fortgeschritten [Robert-Koch-Institut 2006].

Die Detektion von Antikörpern gegen p53 als Nachweis einer Tumorerkrankung ist besonders in Lungenkrebs von Vorteil, da auf diesem Weg die Krankheit bereits nachgewiesen werden kann, bevor die Veränderungen weit genug fortgeschritten sind, um optisch erfasst zu werden. Untersuchungen zeigten, dass erste Veränderungen des p53-Proteins bereits in einem sehr frühen Stadium erfasst werden können [Lubin, Zalcmán et al. 1995]. Während Tumore erst etwa 300-400 Tage nach der Tumorentwicklung optisch nachweisbar sind, können die Antikörper etwa 200 Tage früher nachgewiesen werden, was die Therapieerfolge deutlich erhöhen würde.

Da die Akkumulation von p53 der Auslöser der humoralen Immunantwort ist, war es von Interesse, den Antikörperspiegel im Verlauf von Behandlungen zu untersuchen. Ziel war es festzustellen, ob eine erfolgreiche Therapie, und damit eine verringerte Akkumulation von p53 mit einem Absinken des *Antikörpertiter* einhergeht und ob der Antikörperspiegel der Patienten vor der Behandlung einen Einfluss auf die Heilungschancen hat. Speziell für Lungenkrebs konnte eine gute Korrelation zwischen einem sinkenden Antikörpertiter und einer erfolgreichen Therapie nachgewiesen werden [Zalcmán, Schlichtholz et al. 1998]. Eine Heilungsprognose aus der Existenz von p53-Antikörpern zu erstellen ist jedoch nicht für alle Typen von Lungenkrebs möglich. Für nichtkleinzellige Karzinome wird ein hoher Antikörpertiter in den meisten Studien mit einer geringen Überlebensrate in Zusammenhang gebracht [Lai, Tsai et al. 1998; Laudanski, Burzykowski et al. 1998]. Studien über die Prognosen für kleinzellige Tumore liefern divergente Ergebnisse [Rosenfeld, Malats et al. 1997; Murray, Soussi et al. 2000; Zalcmán, Tredaniel et al. 2000].

1.2. Insuline-like Growth Factor-I und Tumorerkrankungen

Der 7,6 kDa große *Wachstumsfaktor* Insuline-like Growth Factor-I (IGF-I) wurde lange Zeit als *endokrin* wirkendes Protein gesehen, welches zusammen mit dem

Wachstumshormon *metabolische* und *anabolische* Funktionen reguliert. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen wird IGF nicht in speziellen Gewebearten *sezerniert*, sondern von fast jeder Körperzelle ausgeschüttet. Seine Konzentration liegt mit etwa 100 bis 200 ng/ml (etwa 1 bis $3 \cdot 10^{-8}$ M) in etwa tausendfach höherer Konzentration als andere Peptidhormone vor. Der IGF-Spiegel hängt stark von der Konzentration anderer Hormone und den Lebensumständen des Probenspenders ab [Moschos und Mantzoros 2002].

Seit der Entdeckung, dass es innerhalb der Zelle (*autokrin*) und in umgebenden Zellen (*parakrin*) auch an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und malignen Transformationen beteiligt ist [Holly und Wass 1989], ist das auch als Somatomedin C bezeichnete Protein Gegenstand der Krebsforschung geworden. Es spielt gemeinsam mit seinem Rezeptor IGF-IR eine zentrale Rolle in der Zellteilung und Apoptoseinhibition [Moschos und Mantzoros 2002].

Besonders für Brustkrebs wurde der Zusammenhang zwischen IGF-Serumspiegel und Tumorgenese deutlich festgestellt. IGF-I wirkt in Brustkrebszellen als Hormon mitosefördernd [Hankinson, Willett et al. 1998] und wird in den Nachbarzellen des Tumorgewebes produziert von wo aus es die Zellteilung parakrin und autokrin fördert [Yee, Paik et al. 1989]. Im Zusammenspiel mit Östrogen, das als *Effektor* wirkt [Hankinson, Willett et al. 1998], wurde in Brustkrebspatienten eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate der Tumorzellen festgestellt. Eine erfolgreiche Behandlung dieser Tumore mit Tamoxifen ist über ein sinken des IGF-I-Spiegels zu verfolgen. Er ist ein wichtiger Parameter in der Verfolgung des Therapieerfolges bei *Mammakarzinomen* [Colletti, Roberts et al. 1989].

Für andere Krebsarten wurden klare Zusammenhänge zwischen IGF-Spiegel im Blut und der Wahrscheinlichkeit an einer Tumorerkrankung zu sterben nachgewiesen [Frankel, Gunnell et al. 1998]. Vor allem Tumore der Geschlechtsorgane und des Verdauungstraktes sowie Lungenkrebs scheinen mit IGF in Zusammenhang zu stehen [Karasik, Menczer et al. 1994; Hankinson, Willett et al. 1998; Shaneyfelt, Husein et al. 2000; Renehan, Painter et al. 2001].

In den letzten Jahren wurde dazu übergegangen, klassische Krebstherapien mit Eingriffen in das Gleichgewicht zwischen IGF-I und seinem Rezeptor IGF-IR zu kombinieren, um deren Wirksamkeit zu erhöhen [Clemmons 2007]. Auch zur Behandlung von Zwergwuchs und Diabetes mellitus kann, falls die Krankheit über ein Ungleichgewicht im IGF-I-Spiegel hervorgerufen wird, eine Therapie über eine Einstellung des Serumlevels im Blut erfolgen.

Eine solche Therapie ist jedoch nicht ohne Risiken, da IGF in einer engen Wechselwirkung mit den strukturähnlichen Homologen Wachstumshormon (Growth Hormone GH) und Insulin steht und eine zentrale Rolle in der Apoptoseinhibition spielt [Clark 2004 und Referenzen darin]. Daher ist eine möglichst genaue quantitative Bestimmung der IGF-I-Konzentration von großem Nutzen.

1.3. Motivation für diese Arbeit

Tumorerkrankungen gehören zu den komplexesten und von Individuum zu Individuum verschiedensten Erkrankungen überhaupt. Eine Vielzahl von Faktoren wie erbliche Prädisposition, Lebensumstände und psychischer Verfassung haben Einfluss auf Tumorentwicklung und Therapieerfolg.

Die Diagnose einer Krebserkrankung vor Auftreten von Beschwerden oder bereits tast- oder sichtbaren Tumoren bleibt für die meisten Arten von Karzinomen zufälliger Detektion im Rahmen von Routineuntersuchungen überlassen. Um den Anteil früherkannter Erkrankungen zu erhöhen, wäre eine Analyse globaler Tumormarker aus Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Urin...), die ohne aufwendige Methodik mit geringem Kostenaufwand im Rahmen von Routineuntersuchungen durchgeführt werden können, ein wichtiger Schritt.

Das Protein p53 und seine Antikörper sind seit Jahren vielversprechende Moleküle auf der Suche nach dem globalen Krebsmarker. Trotz der Verschiedenheiten der einzelnen Karzinome können für die meisten Krebsarten Veränderungen im Tumorsuppressor und das Auftreten von Antikörpern in nachweisbaren Konzentrationen festgestellt werden. Der Nachweis der p53-Antikörper erfolgt in der Praxis über enzymgekoppelte Immunadsorptionstests, den sogenannten ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Für den p53-Nachweis werden in dieser Technik monoklonale Antikörper gegen das Protein adsorptiv auf eine Matrix aufgebracht. Nach einer Inkubation mit rekombinantem Tumorsuppressor erfolgt der eigentliche Nachweis durch Inkubation mit verdünnten Serumproben. Eventuell vorhandene Antikörper werden in einem weiteren Schritt mit gegen die konstante Region dieser Antikörper gerichteten Antikörpern inkubiert. Diese sind mit Biotin modifiziert, so dass an ihnen eine Enzym angebracht werden kann, welches die zum Nachweis herangezogene Farbreaktion katalysiert.

ELISA-Nachweise sind aufgrund ihrer im Vergleich zu anderen Verfahren (s. Kapitel 2.1) hohen Empfindlichkeit, der breiten Anwendbarkeit und relativen

Quantifizierbarkeit die am häufigsten durchgeführten Assays. Der Nachweis hat trotz seiner grundsätzlich zuverlässigen Arbeitsweise Schwachstellen, die die Detektion von Proteinen und Antikörpern erschweren und ungenau machen.

Das adsorptive Aufbringen des Fängerantikörpers und die enzymatisch verstärkte Farbreaktion stellen Probleme für die Sicherheit des Nachweises dar. Da die beiden Parameter stark von den Bedingungen während der Durchführung abhängen, sind sie als besonders kritisch zu betrachten. Der ELISA wird mit Verdünnungen der zu untersuchenden Lösungen durchgeführt, deren Signal durch einen Schwellenwert von dem durch unspezifisch gebundene Enzyme erhaltenen Signal unterschieden werden muss. Sowohl die Verdünnung als auch das Hintergrundsignal setzen der Sensitivität des ELISA Detektionsgrenzen, die für einen gut eingestellten Assay durchschnittlich bei etwa 10^{-12} mol/L liegen. Die notwendigen langen Inkubationszeiten des unspezifischen ersten Reaktionsschrittes stellen zwar keine Probleme hinsichtlich Sensitivität und Selektivität des Nachweises dar, verursachen jedoch Kosten, die in der praktischen Anwendung eines Nachweises eine nicht unerhebliche Rolle spielen.

Besonders der p53-Antikörpernachweis gestaltet sich mit dem ELISA schwierig. Neben den gerade beschriebenen Schwächen des Nachweises ergeben sich für den Nachweis von p53-Autoantikörpern zusätzliche Schwierigkeiten. Der Nachweis erfolgt über eine Immunreaktion mit rekombinantem Protein. Es verfügt über keine der im Körper an p53 vorgenommenen posttranslationalen Modifikationen. Daher kann nicht vollständig sichergestellt sein, dass Antikörper, die gegen ein im Körper modifiziertes Protein gebildet wurden, auch auf den gentechnisch hergestellten Tumorsuppressor ansprechen. Weiterhin werden in geringem Maße auch in Gesunden Antikörper gegen p53 nachgewiesen. Der ELISA bietet keine Möglichkeit festzustellen, ob es sich um das Vorhandensein von Antikörpern oder um unspezifische Wechselwirkungen handelt.

Da ein sicherer, empfindlicher Nachweis für die Verwendung der Autoantikörper als Tumormarker nötig ist, sollte an den beschriebenen Problemen des ELISA angesetzt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung des Nachweisverfahrens zur möglichst sensitiven und spezifischen Analyse von p53-Autoantikörpern aus menschlichem Blutserum. Im Rahmen der Assay-Erprobung sollte weiterhin geklärt werden, ob tatsächlich nur Krebspatienten diese Antikörper in sich tragen, oder ob ein im Vergleich zu klassischen Nachweisen empfindlicherer Assay auch in gesunden Menschen diese Marker nachweist.

Ein zweiter zu entwickelnder Nachweis verschiedener, relativ hoch konzentrierter Plasmaproteine sollte vor dem Hintergrund einer möglichst genauen quantitativen

Analyse bei minimalem präparativen Aufwand entwickelt werden. Herausforderung bei der Entwicklung dieses Nachweises war der Kompromiss zwischen Sensitivität und Einfachheit im Aufbau, so wie die Entwicklung einer Methode zur Auswertung immunologischer Nachweise, die mit geringer Störungsempfindlichkeit die absoluten Konzentrationen ohne Referenzmessungen erkennt.

Da die Arbeit grundsätzlich bezüglich der verwendeten physikalischen Methoden gegliedert ist, wird der zweite Nachweis, der am Beispiel von Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) entwickelt wurde, im dritten Themenkomplex gemeinsam mit dem ähnlich aufgebauten Antikörpernachweis vorgestellt.

2. Theorie

2.1. Immunologischer Hintergrund

2.1.1. Funktion und Struktur von Antikörpern

Die hochspezifische Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper zur Erkennung von Pathogenen steht am Ende der humoralen Immunantwort. Nach dem Eindringen eines sogenannten Antigens – hierbei handelt es sich um Viren, Bakterien oder pathogene Biomoleküle – in den menschlichen Organismus wird eine Abfolge von Prozessen eingeleitet, die in der Produktion von Antikörpern endet. Die Aufgabe dieser auch Immunglobuline (Ig) genannten Proteine ist die Markierung von körperfremden Eiweißen, die im Anschluss von Makrophagen erkannt und verdaut werden können.

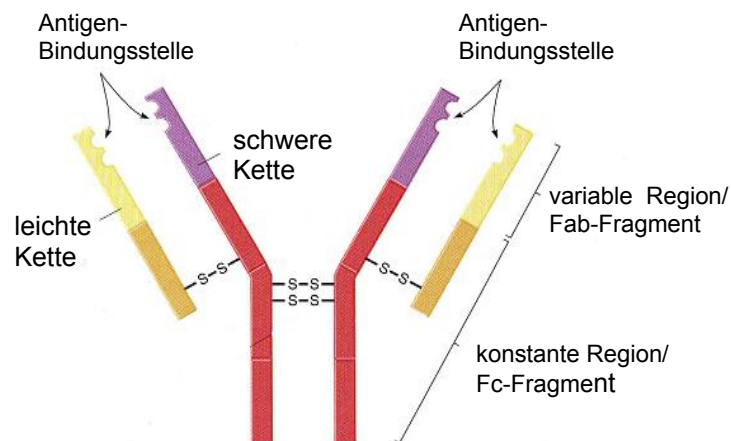


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Antikörpers. Die hochvariable Region der Antigen-Bindungsstelle erkennt spezifisch kurze Aminosäuresequenzen.

Chemisch besteht jeder Antikörper aus zwei mal zwei identischen Aminosäureketten, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Der „Fuß“ des Y-förmigen Moleküls wird ausschließlich von den beiden schweren Ketten gebildet, die im Bereich der „Arme“ an je eine leichte Kette gebunden sind. Die schweren Ketten legen durch ihren Aufbau fest, welcher Ig-Klasse ein Antikörper angehört und damit welche immunologische Funktion er hat. Klassen der 450 bis 550 Aminosäuren (AS) langen schweren Ketten werden mit den griechischen Buchstaben α , δ , ϵ , γ und μ bezeichnet, die Antikörper, die aus ihnen aufgebaut sind, entsprechend als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Während IgM pentamer und IgA dimer vorliegen, handelt es sich bei den anderen Antikörpern um Monomere. Leichte Ketten (211 bis 217 AS) unterscheiden sich innerhalb der

verschiedenen Klassen der Wirbeltiere. Bei den Säugetieren wird zwischen κ - und λ -Ketten unterschieden.

Funktionell wird zwischen der Fc-Domäne (Fragment, crystallizable) und den Fab-Domänen (Fragment, antigen binding) unterschieden. Die Fc-Region ist die konstante Region des Immunglobulins. Sie ist nicht an der Antigenbindung beteiligt, sondern bindet an verschiedene körpereigene Rezeptoren und ist wichtig für die Ausbildung einer gerichteten Immunantwort [Morgan und Weigle 1987]. Die variablen Fab-Regionen enthalten am N-terminalen Ende der Aminosäureketten eine hochvariable Region, an der die eigentliche Antigenbindung stattfindet. Diese Region, Antigen-Bindungsstelle oder Paratop genannt, bindet hochspezifisch an kurze Peptidsequenzen, sogenannte Epitope. Diese Epitope können je nach Antikörper aus kurzen, etwa 6-12 AS langen, linearen Oligopeptiden bestehen oder Teile von Tertiärstrukturen größerer Peptide sein, die sich durch die Faltung in räumlicher Nähe zueinander befinden. Jede Immunglobuline sezernierende B-Zelle produziert ein anderes Paratop, was zu einer Vielfalt von angenommenen 10 Millionen verschiedenen Antikörpern führt [Tonegawa 1983]. Die Bindung an das Epitop erfolgt durch verschiedene ionische, hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit Dissoziationskonstanten von 10^{-8} bis 10^{-12} molL⁻¹.

Bei den in dieser Arbeit analysierten und verwendeten Antikörpern handelt es sich ausschließlich um Moleküle der IgG-Klasse. Dieser Isotyp stellt mit 75% aller gelösten Immunglobuline den im Blut höchstkonzentrierten dar. Die hochspezialisierten Moleküle können etwa drei Wochen nach dem ersten Kontakt mit einem Pathogen in Serum und Lymphe nachgewiesen werden und verbleiben über Jahre dort. Diese Stabilität macht sie zu interessanten Instrumenten der medizinischen Diagnostik.

2.1.2. Der generelle Aufbau immunologischer Nachweise

Seit der Entwicklung des Radioimmunnachweises (RIA) [Yalow und Berson 1960] und des enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (EIA oder speziell Enzyme linked immunosorbent assay ELISA) [Engvall, Jonsson et al. 1971; Van Weemen und Schuurs 1971] in den sechziger und siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts ist eine große Vielfalt immunologischer Nachweismethoden (Immunoassays) entstanden, die verschiedenste Aufbauten und Durchführungen haben. Um eine Übersicht über die vorhandenen und eine Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Immunoassays zu ermöglichen, sollen zunächst allgemein verschiedene Prinzipien der Nachweisführung und Detektion

vorgestellt, und einzelne wichtige Techniken im Anschluss ausführlicher besprochen werden. Techniken, die methodisch wenig verwandt mit den hier entwickelten sind (z.B. Blot-Techniken, Protein-Arrays, Präzipitations- und Agglutinationstechniken), sollen hier der Übersichtlichkeit halber nicht berücksichtigt werden.

Die Gemeinsamkeit aller immunologischen Nachweismethoden ist das Ausnutzen der hohen Spezifität und Bindungsstärke der Antigen-Antikörper-Komplexe (Immuno-Komplexe). Durch die Verwendung von Antikörpern als Nachweisreagenzien können Analyten detektiert werden, die mit anderen Verfahren aufgrund ihrer Empfindlichkeit oder niedrigen Konzentration nur schwer zugänglich sind. Meist handelt es sich bei diesen Analyten um Proteine wie andere Antikörper oder *Enzyme*, es werden jedoch auch kleinere Biomoleküle wie *Hormone* oder größere *Zytokine* mit dieser Methode nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Zielsetzung des Nachweises können die Versuchsanordnungen stark voneinander abweichen, jedoch finden alle Assays in Lösung statt und können vier grundsätzlichen Kategorien zugeordnet werden, von denen sich je zwei gegenüberstehen:

kompetitiver Nachweis und nichtkompetitiver Nachweis
homogene Anordnung und heterogene Anordnung

Kompetitiver und nichtkompetitiver Nachweis von Antigenen

In klassischen Immunoassays wird der zum Nachweis verwendete Antikörper so markiert (gelabelt), dass über seine Detektion das Antigen nachweisbar wird. Diese Markierungen (Label) sind vielfältig und werden daher im Anschluss gesondert besprochen. Die stattfindende Immunreaktion wird über die Zugabe der weiteren für die Komplexbildung benötigten Komponenten gesteuert.

In einem nichtkompetitiven (lat.: „competere“ aufeinandertreffen, wettstreiten) Assay wird der Antigenlösung ein entsprechender markierter Antikörper zugegeben, um über diesen das Antigen direkt nachzuweisen. In einem klassischen kompetitiven Nachweis hingegen wird der Lösung zusätzlich ein markiertes Antigen zugegeben, mit welchem der Analyt um die vorhandenen Bindungsplätze am Antikörper konkurriert. In kompetitiven Assays wird zwischen Versuchsanordnungen unterschieden, in denen die Bindung zwischen den *Substraten* und den Antikörpern in einem Schritt, also durch direkten Wettbewerb um die Bindungsstellen, geschieht, und solchen, in denen dem Antikörper zunächst der Analyt zugegeben wird und erst in einem zweiten Reaktionsschritt die verbliebenen Bindungsstellen mit markierten Substraten abgesättigt werden.

Obwohl der zweischrittige Assay aufwendiger ist, wird er aufgrund seiner deutlich höheren Sensitivität häufig vorgezogen

Homogene und heterogene Versuchsführung

In homogenen Immunoassays findet die Komplexbildung in Lösung statt. Je nach Detektionsart kann eine anschließende Trennung des Komplexes von der Lösung nötig sein. Homogene Verfahren werden häufig für den Nachweis kleiner Analyte wie z.B. Betäubungsmittelrückständen verwendet. Der Vorteil homogener Verfahren liegt in der kurzen Inkubationszeit und der relativ einfachen Durchführung sowie der Tatsache, dass unspezifische Wechselwirkungen mit den Gefäßwänden die Reaktion nicht stören [O'Connor und Gosling 1998]. Eine Anreicherung des Signals in einem kleinen Volumen ist jedoch nicht möglich. Da die Reaktion nur bis zur Einstellung des chemischen Gleichgewichtes fortschreitet, ist für homogene Verfahren häufig ein großer Überschuss an einer Komponente nötig. Daher sind sie im Allgemeinen weniger sensitiv und häufig deutlich teurer.

Bei heterogener Versuchsführung wird die Immunreaktion an einer *stationären Matrix* durchgeführt. In den meisten Fällen handelt es sich um sogenannte Sandwichassays, in denen zunächst ein häufig *polyklonaler* Fängerantikörper unspezifisch an die feste Phase, meist eine Mikrotiterplatte, adsorbiert wird. Im Anschluss wird in einem zweiten Schritt die Analytlösung aufgebracht. Das anschließende Inkubieren mit dem hochspezifischen *monoklonalen* Detektionsantikörper schließt den Analyten wie den Belag eines Sandwichs ein [Oellerich 1984].

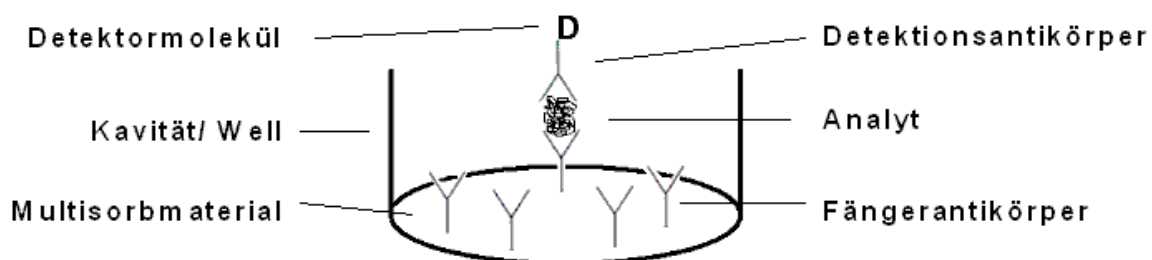


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines heterogenen Sandwichassays.

Häufig wird bei der Markierung der Antikörper mit Detektormolekülen die hochspezifische und sehr starke Wechselwirkung zwischen dem Protein Streptavidin (16,8 kDa) und dem Biotin-Molekül ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$, Vitamin B_7) genutzt ($K_a = 10^{14}-10^{15}$ L/mol). Der biotinylierte Antikörper wird hierbei mit einem kovalent an Streptavidin gebundenen Marker inkubiert.

Die heterogene Versuchsdurchführung ist deutlich aufwendiger als die homogene. Nach jedem Inkubationsschritt müssen in mehreren Waschschrinen nicht gebundene Moleküle aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Auch die eigentliche Inkubation nimmt mehr Zeit in Anspruch, da die Moleküle zunächst zu den Oberflächen diffundieren müssen, um an einen Immunkomplex binden zu können. Trotzdem werden die meisten in großem Maßstab durchgeführten Analysen (sog. High throughput assays) heterogen durchgeführt, da heterogene Assays im Allgemeinen deutlich empfindlicher sind.

Schwer in eine dieser Kategorien einzuordnen sind Beadassays. In ihnen findet die Immunreaktion an der Oberfläche kleiner Kugeln (engl.: „bead“ Kügelchen, Perle) mit Durchmessern zwischen 0,1 und 10 μm statt. Obwohl das Verfahren damit scheinbar deutlich zu den heterogenen Formaten gehört, gibt es Eigenschaften, die diese Einordnung uneindeutig machen.

Zunächst handelt es sich bei den meist aus Polyethylen, Glas oder Latex bestehenden Mikrosphären nicht um eine stationäre Phase. Daher sind die Inkubationszeiten eher mit denen homogener als mit denen heterogener Formate vergleichbar. Auch wird die unspezifische Adsorption des Fängerantikörpers an den Träger in Beadassays durch spezifische Bindungen ersetzt. So beruht der Nachweis, wie ein homogener Assay, ausschließlich auf spezifischen Bindungen. Allerdings ist die Versuchsdurchführung in den meisten Fällen derjenigen in heterogenen Formaten ähnlich: Es handelt sich im Allgemeinen um Sandwichassays mit Waschschrinen.

Detektion

Einige Nachweise benötigen keine zusätzliche Markierung. Neben den Methoden, die den Nachweis durch Agglutination erbringen, sind auch einige in biologischen Materialien natürlich vorkommende Moleküle zum Nachweis geeignet. So können zum Beispiel die Fluoreszenzeigenschaften der Aminosäure Tryptophan oder des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) zur Detektion herangezogen werden. In den meisten Fällen werden jedoch extrinsische (lat.: „extrinsecus“ von außen) Markierungen angebracht. Der Nachweis erfolgt meist auf einem der folgenden Wege:

Radioisotopenmarkierung

Enzymreaktionen

Markierung mit Metallen und deren Komplexen

Elektrochemische Reaktionen

Farbstoffmarkierung

Jede dieser Klassen stellt eine Vielzahl von Markern und daraus resultierenden Detektionsmöglichkeiten. Im folgenden Kapitel sollen zwei Techniken exemplarisch besprochen werden, um Möglichkeiten und Grenzen der häufig verwendeten Techniken aufzuzeigen.

2.1.3. Mögliche Realisierungen am Beispiel von ELISA und IMS-ECL

Beim nicht-kompetitiven Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) handelt es sich um den in der Praxis am häufigsten verwendeten heterogenen immunologischen Assay. Er findet immer in vier Inkubationsschritten statt, die durch Waschschriffe beendet werden. Nacheinander werden die ersten drei Inkubationsschritte wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben durchgeführt. Obwohl heute parallel 96 Nachweise maschinell durchgeführt werden, bleibt die Methode zeitaufwendig, da die einzelnen Inkubationsphasen zwischen 2 und 6 Stunden benötigen. Im ELISA trägt der Detektionsantikörper ein Biotinmolekül. Im letzten Inkubationsschritt wird ein Streptavidin tragendes Enzym, meist Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase HRP), angekoppelt. Im Detektionsschritt setzt diese nun das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (4,4'-Diamino-3,3',5,5'-Tetramethylbiphenyl, TMB) zusammen mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen Reaktionsprodukt (4'-Amino-3,3',5,5'-Tetramethyl-4'-nitrobiphenyl) um. Nach einer festen Reaktionszeit wird die Reaktion mithilfe von Schwefelsäure gestoppt und das zu gelb umgeschlagene Reaktionsprodukt spektroskopisch vermessen.

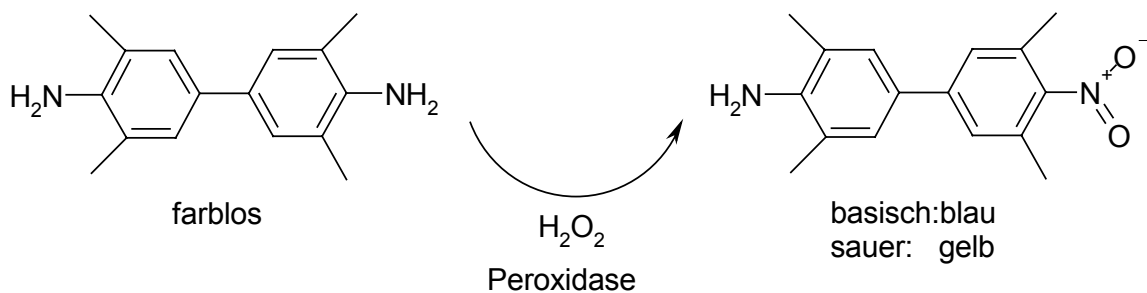


Abb.2.3: Chemische Umsetzung im Detektionsschritt eines ELISAs

Für starke Nachweisumsätze hat sich diese Technik bewährt. Einmal optimiert können viele Proben halbautomatisiert mit relativ hoher Empfindlichkeit (bis 10^{-12} M) vermessen werden. Obwohl durch die Automatisierung der Inkubations- und Waschschriffe viele Fehler ausgeschlossen werden, bleibt der ELISA jedoch aufgrund der hohen Rate unspezifischer Wechselwirkungen und der Abhängigkeit von einer Enzymreaktion anfällig für Ungenauigkeiten. Da es sich um eine *semiquantitative* Technik handelt, ist die aufwendige Erstellung von Eichgeraden

nötig. Hierzu wird ein sogenannter Standard benötigt, der meist aus *rekombinant* hergestellten Analytmolekülen besteht. Somit sind ELISA-Verfahren auf den Nachweis von Substanzen beschränkt, die sich isoliert herstellen lassen. Auch die Optimierung solcher Assays ist extrem aufwendig, was sie für Einzelnachweise wenig geeignet macht. Alle ELISAs arbeiten mit stark verdünnten Analytlösungen, woraus zusätzliche Arbeitsschritte und mögliche Fehlerquellen folgen und einige Anwendungen unmöglich werden [Baker, Rendall et al. 2002].

Immunologische Assays auf Beads haben sich seit den sechziger Jahren aus den zu dieser Zeit bekannten beadbasierten Agglutinations- und Präzipitationstests entwickelt. Seit Beginn der neunziger Jahre [Blackburn, Shah et al. 1991; Yang, Leland et al. 1994] werden Beads mit superparamagnetischem Kern als Matrix heterogener Nachweise verwendet. Der Name IMS-ECL gibt sowohl die Nachweisführung (Immunomagnetic separation IMS) als auch die Art der Detektion (Elektrochemilumineszenz ECL) wider. Der grundsätzliche Aufbau ähnelt dem eines ELISA, jedoch wurde die unspezifische Adsorption des Fängerantikörpers durch eine Streptavidin-Biotin-Kopplung ersetzt. Statt an den Detektionsantikörper über Streptavidin-Biotin ein Enzym anzubringen, wird bei der ECL ein Rutheniumkomplex (Ru(III)(bipy)₃) kovalent angebracht.

Einen deutlichen Fortschritt gegenüber dem ELISA stellt die Verkürzung der Inkubationszeiten dar. Da sich die Beads frei in Lösung bewegen, ist die Bildung des Immunkomplexes nicht mehr von Diffusion zum Boden der *Kavität* abhängig. Bei der Verwendung von Beads wird das Lumineszenzsignal lokal auf deren Oberfläche detektiert. Eventuelle unspezifische Wechselwirkungen in Lösung und an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes führen nicht mehr zur Störung des Nachweises.

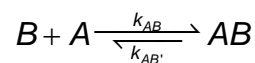
Die eigentliche Detektion erfolgt in einem ECL-Detektor, dessen Herzstück eine elektrochemische Reaktionszelle ist. Nach erfolgter Immunreaktion außerhalb des Detektors wird das Gemisch in die Flusszelle gebracht. Diese enthält einen Magneten zum Festhalten der Beads, die beiden Arbeitselektroden und eine Referenzelektrode. Die Beads werden festgehalten und die Kammer mit einer Lösung gespült, die einen Überschuss von Tripropylamin (TPA) enthält. Nachdem an die Elektroden eine Spannung angelegt wird, wird an der Anode TPA oxidiert, welches im Anschluss ein Proton abgibt und so zu einem starken Reduktionsmittel wird. Dieses reduziert den Ru(III)-Komplex zu einem angeregten Ru(II)-Komplex, welcher unter Emission eines Photons (620 nm) in den Grundzustand übergeht und an der gleichen Elektrode zu Ru(III) oxidiert wird. Da diese Reaktion ausschließlich in der Nähe der Grenzfläche zur Anode stattfindet, wird auf diesem

Weg ein starkes spezifisches Signal mit wenig Hintergrundrauschen erreicht [Blackburn, Shah et al. 1991].

Der Verzicht auf eine enzymatische Reaktion führt zu einer deutlich größeren Genauigkeit bei stark verkürzten Inkubationszeiten. Eine Schwachstelle dieses Verfahrens ist jedoch der relativ große Arbeitsaufwand und die aufwendige Detektionstechnik. Die eigentliche Immunreaktion findet außerhalb des Detektors statt, da die Reinigung der Flusszelle aufwendig ist [Yan, Xing et al. 2004]. Die nötigen Volumina sind mit 50 bis 100µL relativ groß und nicht beliebig verkleinerbar, da die elektrochemische Zelle eine Mindestgröße benötigt um störungsfrei arbeiten zu können. Ein optimales Verfahren verbände das deutliche Signal des IMS-ECL mit der einfachen Handhabung und Instrumentierung des ELISA.

2.1.4. Bestimmung von Komplexbildungskonstanten

Die Empfindlichkeit eines gut eingestellten Immunoassays hängt neben der Effizienz des Detektors vor allem von der Affinität des Antikörpers gegenüber dem Zielmolekül ab. Je stärker die Bindungskonstante der Gleichgewichtsreaktion, desto größer ist das Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Zielmolekülen und desto höher ist die Sensitivität des Nachweises:



Hierin steht B für die Bindungsstellen, A für das Antigen und AB für den Komplex aus beiden. Die zu den Reaktionen gehörenden Geschwindigkeitskonstanten sind mit k_{AB} und $k_{AB'}$ gekennzeichnet.

Bestimmen lässt sich die Bindungskonstante K_a über das Massenwirkungsgesetz, in dem molare Konzentrationen durch eckige Klammern dargestellt sind:

$$K_a = \frac{k_{AB}}{k_{AB'}} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (2.1)$$

Experimentell kann K_a über eine Titration bestimmt werden. Dabei wird eine Komponente, im Allgemeinen der Antikörper, konstant gehalten und die andere

Komponente sukzessive zugegeben. Der Parameter, der die Bindung anzeigt, wird gegen die Konzentration der zugegebenen Komponente aufgetragen. Solche Titrations führen zu Kurven wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Neben der Anpassung einer Funktion entsprechend Gleichung (2.1) an die erhaltenen Daten ist auch eine halblogarithmische Auftragung der Datenpunkte häufig. In dieser ist der Wendepunkt der Titrationskurve, der sogenannte Halbäquivalenzpunkt, leichter zu finden in dem gilt:

$$(2.2) \quad [AB] = [B] \Rightarrow K_a = \frac{1}{[A]}$$

An dieser Stelle entspricht die Bindungskonstante also genau der reziproken Antigenkonzentration. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Antikörperkonzentration für IgGs nur halb so groß wie die Konzentration ihrer Bindungsstellen ist.

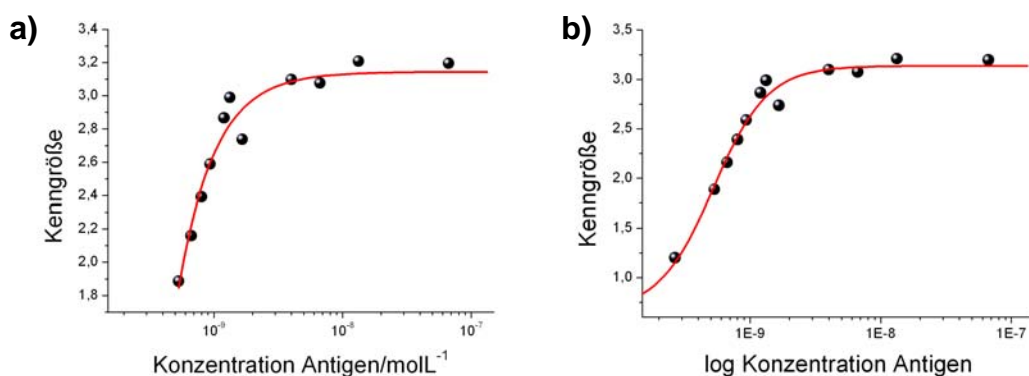


Abb. 2.4: Lineare (a) und üblichere logarithmische Darstellung (b) einer Titrationskurve. Kenngröße ist die Größe, über die die Komplexbildung nachgewiesen wird, sie ist im Normalfall linear zur Konzentration des Komplexes.

Der Scatchard Plot [Scatchard 1949] ist eine lineare Auftragung für die Bestimmung von Bindungskonstanten. Obwohl eine Bestimmung der Bindungskonstante über eine Kurvenanpassung genauer ist, wird sie auch heute noch verwendet, da die lineare Auftragung weitergehende Informationen über das Bindungsverhalten der Antikörper liefert.

In allen Auswertungen nach Scatchard wird das aufgestellte Massenwirkungsgesetz (2.1) auf die Ausgangskonzentration $[Ab]_0$ des Antikörpers normiert:

$$K = \frac{\frac{[AB]}{[Ab]_0}}{\left(\frac{[B] + [AB]}{[Ab]_0} - \frac{[AB]}{[Ab]_0} \right) \cdot [A]} \quad (2.3)$$

Hierbei wird die Konzentration der Bindungsstellen $[B]$ so notiert, dass der erste Term die Bindungsstellen pro Antikörper (n) liefert. Sowohl der zweite Term als auch der Zähler liefern die Konzentration der Komplexe normiert auf die Ausgangskonzentration der Antikörper (r). Somit kann das Massenwirkungsgesetz geschrieben werden als:

$$K_a = \frac{r}{(n-r)[A]} \quad \text{oder} \quad \frac{r}{[A]} = K_a n - K r \quad (2.4)$$

In der klassischen Scatchardauftragung (häufiger engl. Scatchard Plot) wird $r/[A]$ gegen r aufgetragen.

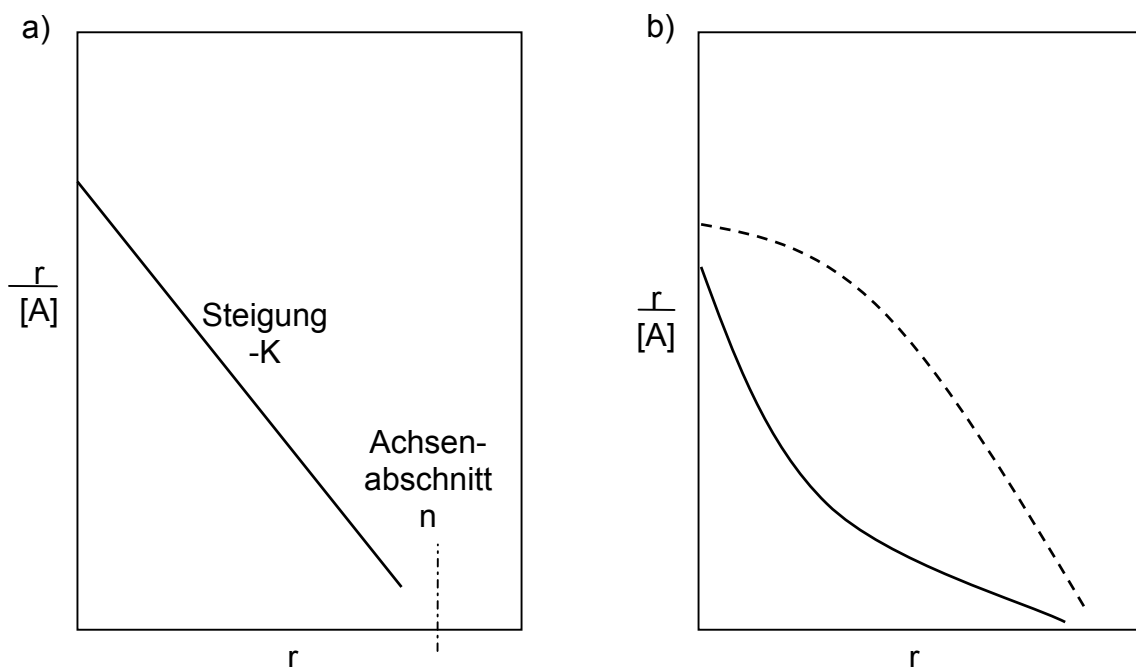


Abb. 2.5: a) Scatchard Plot für den Fall, dass alle Bindungsstellen gleich und unabhängig sind. b) Scatchard Plots in denen vorherigen Bindung des Antigens an den Antikörper aktivierend (gestrichelte Linie) bzw. hemmend (durchgezogene Linie) auf andere wirkt.

Sind die Bindungsstellen des Antikörpers unabhängig voneinander und binden sie das Antigen mit der gleichen Bindungskonstante, erhält man eine Gerade, die die Steigung $-K$ und als Achsenabschnitt das Verhältnis Bindungsstelle pro Antikörper n . Zwar ist der durch die Auftragung erhaltene Wert für die Bindungskonstante weniger genau, eine Gerade in der Scatchardauftragung zeigt jedoch, dass die ermittelte Bindungskonstante tatsächlich für beide Bindungsstellen gilt.

Ist dieses nicht der Fall wird, wie in Abbildung 2.5 b) zu sehen, keine Gerade mehr erhalten. Je nach Art der Änderung im Bindungsverhalten, weicht die Auftragung konvex oder konkav von der erwarteten Gerade ab. Im Gegensatz zum Angleichen einer Funktion an die Titrationskurve fallen Veränderungen im System sofort auf.

2.2. Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung

2.2.1. Absorption

Moleküle können Energie auf verschiedene Arten aufnehmen und speichern. Von der Menge der aufgenommenen Energie hängt ab, wie dies geschieht. Kleine Energiemengen werden durch Anregung von Rotationsniveaus absorbiert. Bei Raumtemperatur sind diese Niveaus bereits angeregt. Größere Energiemengen, die bei höheren Temperaturen der Umgebung oder bei Bestrahlung mit infrarotem (IR) Licht auf das Molekül übertragen werden können, regen die chemischen Bindungen zum Schwingen an.

In dieser Arbeit wurde die Absorption von sichtbarem und ultraviolettem (UV) Licht genutzt. Bestrahlung in diesem Bereich der elektromagnetischen Strahlung regt elektronische Übergangszustände an. Die einzelnen Übergänge können in einem hinreichend hoch aufgelösten Absorptionsspektrum als Linien erkannt werden. Besonders für komplexe, vielatomige Moleküle wird jedoch bei Absorption in diesem Bereich, aufgrund der vielen Niveaus ähnlicher Energie, ein breites Bandenspektrum erhalten. Dieses wird durch die Lebensdauer verbreiterung und durch Wechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen zusätzlich ausgedehnt.

Die Resonanzbedingung gibt vor, unter welchen energetischen Bedingungen Absorption stattfindet:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu \quad (2.5)$$

worin E_2 und E_1 die Energien des angeregten und Grundzustandes, h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz des Lichts ist.

Der Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand und die damit einhergehende Bewegung von Elektronen findet mit 10^{-15} s auf einer kürzeren Zeitskala als Bewegungen der Kerne statt, weshalb diese während dieses Prozesses als ortsfest betrachtet werden können (Born-Oppenheimer-Näherung). Durch die Anregung eines Elektrons in ein höher gelegenes Orbital verändert es seine Position und das Dipolmoment des Moleküls ändert sich.

Aufgrund der Energiequantelung sind nur diskrete Energiezustände und damit bestimmte Elektronendichteverteilungen möglich. Die Absorption eines Photons ist nur möglich, wenn der Wellenvektor der anregenden Strahlung parallel zu den

elektronischen Übergangsmomenten steht. Die Wahrscheinlichkeit des Übergangs wird durch die Molekülstruktur und sein Übergangsdipolmoment festgelegt.

Das empirisch aufgestellte Lambert-Beersche Gesetz (2.6) gibt für verdünnte Lösungen das Verhältnis zwischen Lichttransmission und den Eigenschaften des Materials an, durch welches das Licht gesendet wird:

$$(2.6) \quad I = I_0 e^{-\varepsilon cd}$$

I_0 und I sind darin die Start- und Endintensitäten, ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Probe.

Die logarithmische Schreibweise ergibt eine lineare Abhängigkeit der Absorption A von den eben genannten Größen.

$$(2.7) \quad A = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon cd$$

In organischen Farbstoffen bestehen die Chromophore aus Systemen konjugierter Doppelbindungen. In ausgedehnten delokalisierten π -Systemen liegt die Energie des π - π^* -Übergangs ähnlich der der Photonen des sichtbaren und ultravioletten spektralen Bereichs. Daher werden π - π^* -Übergänge durch UV/Vis-Strahlung angeregt. Während lineare konjugierte Systeme bis maximal 500 nm absorbieren können, absorbieren starre, planare Strukturen, wie zum Beispiel die in dieser Arbeit verwendeten Mitglieder der Oxazin- und Carbocyaninfamilie bis in den roten Spektralbereich.

2.2.2. Die Fluoreszenz organischer Farbstoffe

Unter der Annahme, dass das angeregte Molekül keine chemische Reaktion eingeht, findet eine Relaxation in den Grundzustand statt. Dieses geschieht in einer Vielzahl strahlender und nicht strahlender Übergänge, die in Abbildung 2.6 vereinfacht dargestellt sind:

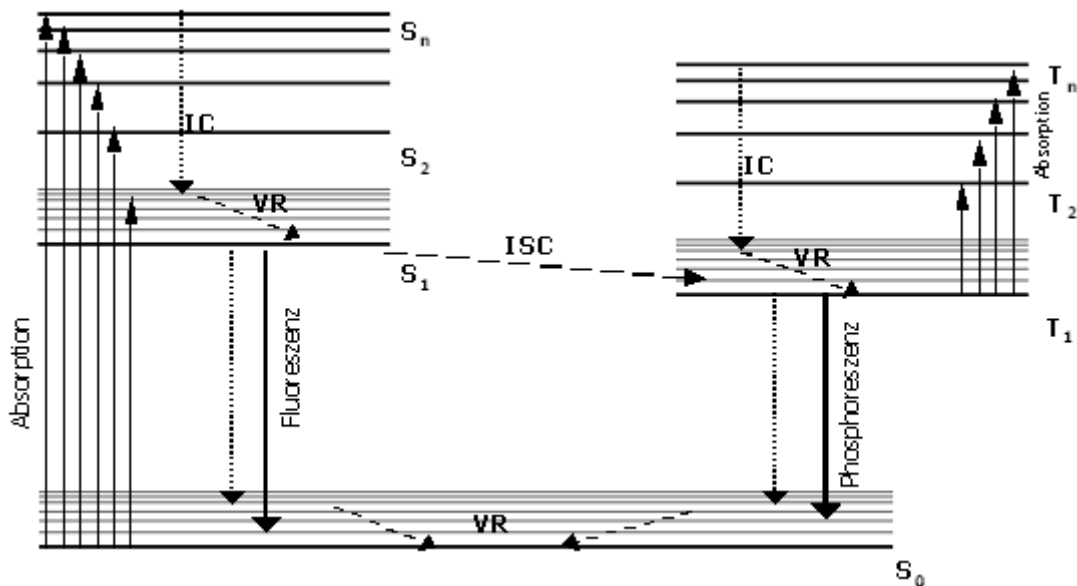


Abb. 2.6: Vereinfachte Darstellung der möglichen Übergänge in einem Farbstoffmolekül (Jablonski Diagramm). Nicht strahlende Übergänge (IC, VR, ISC) sind als durchbrochene, strahlende als durchgehende Pfeile dargestellt.

Nach der Anregung, die aufgrund des Franck-Condon-Prinzips nie direkt in den Schwingungsgrundzustand, sondern in angeregte Schwingungszustände des ersten oder höher angeregter elektronischer Zustände geschieht, kehrt das Elektron zunächst in den Schwingungsgrundzustand des S_1 -Niveaus zurück. Dies geschieht, indem das Elektron in einer strahlungslosen Desaktivierung (internal conversion IC) sehr schnell (10^{-11} - 10^{-13} s) in isoenergetische, hochangeregte Schwingungszustände des ersten angeregten Zustandes übergeht. Die anschließende Schwingungs-Relaxation (vibrational relaxation VR) in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände des S_1 -Zustandes geschieht im Subpikosekundenbereich unter Energieabgabe durch Stöße mit Nachbarmolekülen.

Von diesem Zustand aus sind neben der Fluoreszenz, die mit Geschwindigkeitskonstanten von 10^8 bis 10^9 s $^{-1}$ unter Abgabe eines Photons abläuft, zwei strahlungslose Übergänge möglich. Neben der spinerlaubten Deaktivierung S_1 - S_0 besteht die Möglichkeit, dass das Molekül in einem

Intersystem Crossing (ISC) in das System der angeregten Triplettzustände über geht.

Intersystem Crossing bezeichnet den Übergang von einem System in ein anderes mit unterschiedlicher Spinmultiplizität, also einen verbotenen Übergang. Innerhalb des Systems von Triplettzuständen folgen die Übergänge den gleichen Gesetzen wie innerhalb des Singulettsystems, allerdings stellt die Rückkehr in den Grundzustand erneut einen verbotenen Übergang dar. Daraus resultiert die lange Lebensdauer des Triplettzustandes (10^{-3} - 10^{-2} s), der sowohl strahlungslos als auch unter Abgabe eines Photons geschehen kann (Phosphoreszenz) [Johnson 2007]. Ein Intersystem Crossing ist für fluoreszenzbasierte Experimente unvorteilhaft, da sich Elektronen für relativ lange Zeit im Triplettzustand aufhalten und nicht für den fluoreszierenden Übergang zur Verfügung stehen. Auch unter diesem Gesichtspunkt sind Rhodamin- und Oxazinderivate gute Fluoreszenzfarbstoffe. Ihre relativ kleine Intersystem Crossing-Rate ist für viele Anwendungen vernachlässigbar [Drexhage 1977].

Die selektive Detektion von Fluoreszenzsignal neben Rayleighstreuung und Ramanstrahlung ist vor allem durch ihre Rotverschiebung möglich. Neben der Stokes-Verschiebung, die aufgrund des Energieverlustes durch Schwingungsrelaxation zu einer Verschiebung der Fluoreszenz in den langwelligeren Bereich führt, hat auch das Lösungsmedium einen Einfluss auf die Form des Emissionsspektrums. Lösungsmittelabhängige Stokes-Verschiebung (solvent Stokes shift) oder solvatochromer Effekt hängt von der Polarität des Lösungsmittels ab. In Abhängigkeit von dieser Polarität wird das nach der Anregung veränderte Dipolmoment des Moleküls anders stabilisiert als das Dipolmoment im Grundzustand. Je nachdem, ob sich mit steigender Polarität des Lösungsmittels die Lücke zwischen HOMO (highest occupied molecular orbital) und LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) vergrößert oder verkleinert, ergibt sich eine zusätzliche Rot- (bathochrome) oder Blau- (hypsochrome) Verschiebung [Lakowicz 2006].

Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute

Fluoreszenz findet immer neben den strahlungslosen Prozessen statt, daher kann das Geschwindigkeitsgesetz zur Abnahme der Konzentration $[F(t^*)]$ der angeregten Farbstoffmoleküle am Zeitpunkt t nach einem infinitesimal kurzen Anregungspuls geschrieben werden als:

$$\frac{d[F(t)^*]}{dt} = -(k_F + k_{ISC} + k_{IC})[F(t)^*] \quad (2.8)$$

mit k_F als Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k_{ISC} und k_{IC} die der entsprechenden strahlungslosen Übergänge.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ ist der reziproke Wert der Gesamtgeschwindigkeitskonstante k und ergibt sich damit als:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_F + k_{ISC} + k_{IC}} \quad (2.9)$$

Eine Integration in den Grenzen von $t=0$ und t ergibt sich:

$$[F(t)^*] = [F(0)^*] e^{-t/\tau} = I(t) = I(0) e^{-t/\tau} \quad (2.10)$$

Die Gleichsetzung von Konzentration und Intensität I ist zulässig, solange die Verdünnung ausreichend stark ist und zusätzliche Effekte, wie z.B. die Bildung nichtfluoreszierender Dimere, ausbleiben. Die Fluoreszenzlebensdauer kann experimentell durch den Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Fluoreszenzintensität auf $1/e$ des Ausgangswertes abgefallen ist. Diese Zeitspannen liegen im Allgemeinen im Bereich von Nanosekunden.

Die bisher aufgestellten Aussagen über die Fluoreszenzlebensdauer gelten für Fälle, in denen das Abklingen der Fluoreszenz monoexponentiell verläuft. In organischen Farbstoffen und biologischen Systemen kann häufig mehr als ein Übergangsmechanismus beobachtet werden. Diese konkurrierenden Zerfälle führen dazu, dass mehrere sich überlagernde Prozesse beobachtet werden, die als Summe über die Exponenten angenähert werden müssen:

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{mit} \quad \sum_i a_i = 1 \quad (2.11)$$

Wobei a_i die Amplitude der i -ten Komponente Zustand ist.

Fluoreszenzabklingkurven in Lösung müssen häufig durch exponentielle Zerfälle höherer Ordnung beschrieben werden. Aufgrund dieser Komplexität kann bei Beschreibung des exponentiellen Abfalls nicht jedem Grad direkt eine

physikalische Bedeutung zugeordnet werden. Im Allgemeinen ist die auf die beschriebene Weise bestimmte Fluoreszenzlebensdauer kürzer als die Lebensdauer τ_0^n , welche nur die strahlenden Prozesse berücksichtigt.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F gibt den Anteil der Relaxation, die unter Emission eines Photons stattfindet, zur Gesamtanzahl aller Übergänge in den Grundzustand wieder. Sie ist also ein Maß für die Effizienz der Fluoreszenz. Sie kann geschrieben werden als:

$$(2.12) \quad \phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = \frac{\tau}{\tau_0^n} = \frac{N_{\text{emittierte Photonen}}}{N_{\text{absorbierte Photonen}}}$$

mit der Geschwindigkeitskonstante k_{nr} für nicht radiative Deaktivierungsprozesse und der Teilchenzahl N .

Für Messungen in biologischen Proben ist eine langwellige Anregung durch rotabsorbierende Fluoreszenzfarbstoffe von Vorteil, da viele Biomoleküle bis in den langwelligen sichtbaren Bereich absorbieren. Besonders störend sind bei Messungen in Blutserum Hämoglobin und sein Abbauprodukt Bilirubin, da diese einerseits sehr langwellig emittieren und andererseits in hohen Konzentrationen vorliegen können. In gesundem Blutserum liegt Bilirubin mit bis zu $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ L deutlich höher konzentriert vor als die in dieser Arbeit nachzuweisenden Antikörper. Es hat sein Absorptionsmaximum bei 450 nm und emittiert bei etwa 530 nm mit einer Quantenausbeute von 0,1 [Krasner und Yaffe 1973; Cu, Bellah et al. 1975; Agati und Fusi 1990].

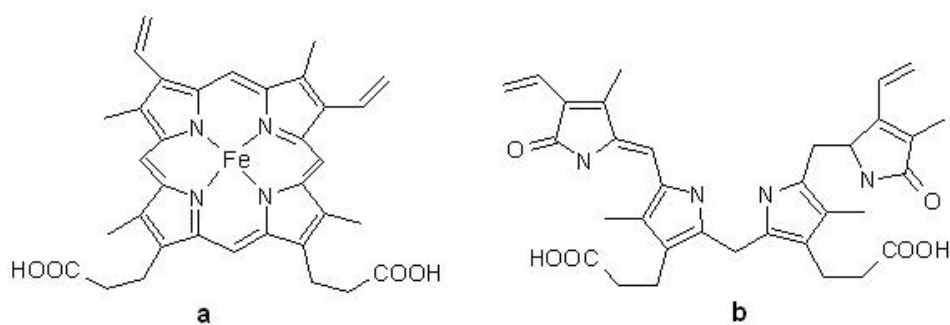


Abb.2.7: Chemische Strukturen von a) Hämoglobin und b) Bilirubin

Bei bestimmten Krankheiten oder während der Aufreinigung des Vollblutes kann aufgrund von Hämolyse Hämoglobin in das Serum einfließen. Erkennbar ist dies an der, nicht wie im Allgemeinen gelblich grünen, sondern nun roten Farbe des Serums. Obwohl Hämoglobin eine starke Absorptionsbande bei etwa 580 nm [Newcomer 1919] hat, ist es nicht fluoreszierend und stört die Nachweise daher nicht.

2.2.3. Fluoreszenzlöschung

Jeder Prozess, der zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität führt, wird als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Darunter fallen bimolekulare Prozesse wie Kollisionslöschung (collisional quenching), Reaktionen der angeregten Zustände, die Bildung nicht fluoreszierender Komplexe oder Energietransfer. Gemeinsam ist diesen Prozessen, dass eine Annäherung des angeregten Fluorophors an ein umgebendes Molekül erfolgen muss, um eine Wechselwirkung zu ermöglichen. Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit eines Quenchers Q hängt von der Geschwindigkeitskonstante der intramolekularen Prozesse k (Gl.(2.9)) sowie der bimolekularen Löschkonstante k_q ab:

$$I(t) = I(0) e^{-(k+k_q[Q])t} \quad (2.13)$$

Die Lebensdauer ergibt sich analog zu (2.9) als:

$$\tau = \frac{1}{k + k_q[Q]} \quad (2.14)$$

Die allgemeinste Unterscheidung dieser Prozesse ist jene zwischen dynamischer und statischer Löschung, wobei diese Kategorien Grenzformen darstellen. Im Experiment werden meist Mischtypen gefunden. Die Unterscheidung erfolgt über Existenz und Nichtexistenz von Grundzustandskomplexen zwischen Fluorophor und löschendem Molekül. Während es bei dynamischen Quenchingprozessen ausschließlich zu diffusionskontrollierten Begegnungskomplexen des Quenchers mit dem fluoreszierenden Molekül kommt, existieren bei statischen Löschrprozessen auch Grundzustandskomplexe.

Während eines dynamischen Löschrprozesses (Abb. 2.8), einer Kollisionslöschung, bildet sich bei ausreichender Annäherung ein Begegnungskomplex zwischen Chromophor und Löschrmolekül. Der Stoß führt zu einem Energieübertrag und anschließender strahlungsfreier Rückkehr in den Grundzustand. Charakteristisch ist neben der Abnahme der Fluoreszenzintensität eine gleichzeitige Verkürzung der Lebensdauer.

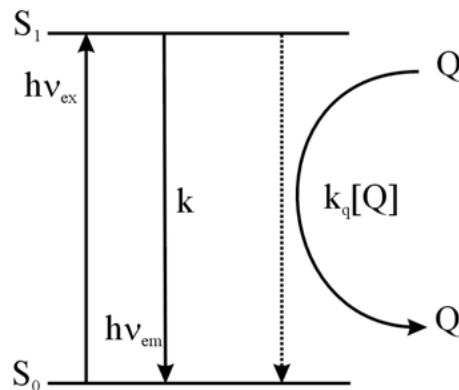


Abb. 2.8: Dynamische (oder Kollisions-)Löschung eines Farbstoffes in Anwesenheit eines Löschmoleküls Q. k_q ist dabei die bimolekulare Löschungskonstante aus Gleichung (2.17).

Da Moleküle, die rein dynamischen Löschungsprozessen unterliegen, keine Grundzustandskomplexe bilden, sind solche Kollisionsereignisse ausschließlich diffusionskontrolliert. Unter der Annahme, dass die Moleküle im Grundzustand nicht wechselwirken und dass der eigentliche Löschprozess sehr viel schneller als die Diffusion ist, ist die Geschwindigkeit des Quenchings durch die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeitskonstante (Maximalstoßgeschwindigkeit) k_d limitiert. Diese hängt vom Kollisionsradius r_K , dem Gesamtdiffusionskoeffizienten D_0 und der Avogadrokonstante N_a ab:

$$(2.15) \quad k_d = \frac{4\pi r_K D_0 N_a}{1000}$$

Sowohl D_0 als auch r_K setzen sich additiv aus den Größen von Farbstoff und Löschmolekül zusammen. $N_a/1000$ verändert die Konstante von einer molaren Größe in eine, die von der Anzahl der Teilchen pro Kubikzentimeter abhängt.

Die einzelnen Diffusionsradien können experimentell bestimmt oder über die Stokes-Einstein-Gleichung (2.16) mit der Boltzmannkonstante k_B , der absoluten Temperatur T und dem Kollisionsradius r berechnet werden.

$$(2.16) \quad D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Mit der beobachtbaren Löschungskonstante k_q hängt die Maximalstoßgeschwindigkeit k_d über die Löscheffizienz E zusammen:

$$k_d = Ek_q \quad (2.17)$$

Für den Fall einer rein dynamischen Löschung gilt $k_q = k_d$. Die Stern-Volmer-Gleichung für dynamische Prozesse beschreibt den Prozess als:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (2.18)$$

τ_0 ist hierbei die Lebensdauer in Abwesenheit von Löschmolekülen.

In rein dynamischen Prozessen zeigt die Auftragung der Funktion eine lineare Abhängigkeit der Intensitäts- und Lebensdauerquotienten. Im Experiment wird für die Auftragung der Lebensdauer gegen die Quencherkonzentration aufgrund statischer Löschrbeiträge jedoch häufig eine konvexe oder konkave Abweichung gefunden.

Im Fall solch einer statischen Löschung sind stabile Grundzustandskomplexe vorhanden, deren angeregter Zustand allenfalls schwach fluoresziert (Abb. 2.9).

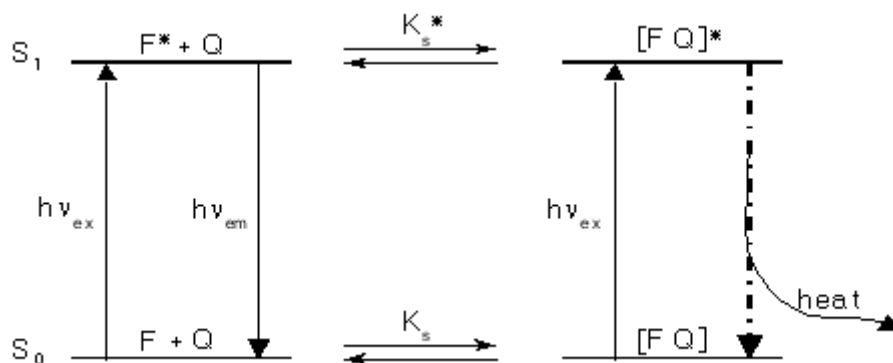


Abb. 2.9: Statischer Löschrprozess. Der Fluorophor F und das Löschmolekül Q bilden einen nicht oder schwach fluoreszierenden angeregten Komplex, der die Menge an freiem Farbstoff in Abhängigkeit der Komplexbildungskonstante K_S reduziert.

Unter der Annahme ähnlicher Bindungskonstanten im Grund- und im angeregten Zustand, reduziert der gebildete Komplex die Menge an freiem, fluoreszierendem Farbstoff. Da dessen Eigenschaften jedoch unverändert bleiben, hat ein statischer Löschrprozess keine Auswirkungen auf die Lebensdauer des angeregten Zustands. Somit hängt die Fluoreszenzintensität der Probe im statischen Grenzfall nur vom Konzentrationsverhältnis von Quencher und Fluorophor sowie der Gleichgewichtskonstante K_S ab. Die zugehörige Stern-Volmer-Gleichung für statische Löschung lautet:

$$(2.19) \quad \frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q] \quad \text{mit} \quad K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]}$$

Für den Fall einer Fluoreszenzlöschung, die nach beiden Mechanismen stattfindet, kann eine modifizierte Stern-Volmer-Gleichung formuliert werden, die nun bezüglich der Quencherkonzentration zweiter Ordnung ist (2.20).

$$(2.20) \quad \frac{I_0}{I} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q])$$

Die Fluoreszenzlöschung, deren thermodynamisches Verhalten durch die Stern-Volmer-Gleichungen beschrieben wird, kann in vier generelle Löschemechanismen gegliedert werden:

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Intersystem Crossing (ISC)

Photoinduzierten Elektronentransfer

Im Experiment ist es häufig schwer, den genauen Mechanismus hinter einem Lösprozess nachzuweisen, häufig treten mehrere Mechanismen nebeneinander auf.

Im Gegensatz zu bimolekularen Lösprozessen findet der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) [Förster 1948] ohne direkten Kontakt zwischen Donor und Akzeptor statt. Dieser strahlungslose Übergang findet als sogenannter "spectroscopic ruler" (spektroskopisches Lineal) weitläufig Anwendung [Stryer und Haugland 1967]. Die Dipol-Dipol Wechselwirkung, die bei ausreichend großem Überlappintegral des Donor Emissionsspektrums mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors möglich ist, findet in Abständen im Bereich von einem bis zehn Nanometern statt. Der Prozess ist stark abstandsabhängig und erlaubt auf molekularer Ebene Aussagen über Entfernungen.

Ein häufig auftretendes System, bei dem von Fluoreszenzlöschung durch induziertes Intersystem Crossing ausgegangen wird, ist die Löschung organischer Farbstoffe in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff [Evans 1957]. Wechselwirkung mit Triplett Sauerstoff begünstigen den Übergang des Fluorophors in das Triplett-System, es gibt allerdings Hinweise, dass auch hier Prozesse, die anderen Mechanismen folgen, stattfinden [Kikuchi, Sato et al. 1993].

Die beiden anderen oben aufgeführten Lösungsmechanismen beruhen auf Elektronentransfer zwischen Donor und Akzeptor. Während eines Dexter Elektronentransfers findet ein nach Anregung des Donors ins LUMO konzertierter oder zweistufiger Elektronentransfer von dort in das angeregte LUMO des

Akzeptors und vom HOMO des Akzeptors in das durch die Anregung nur noch halb besetzte HOMO des Donors statt. Die Ladungsverteilung vor und nach dem Prozess ist also konstant, er wird gern als Austauschreaktion bezeichnet.

Während eines photoinduzierten Elektronentransfers (PET) hingegen findet ein einfacher Ladungsübertrag zwischen Donor und Akzeptor statt, es handelt sich um eine Redoxreaktion, bei der die beteiligten Moleküle vor und nach dem Prozess in unterschiedlichen elektronischen Situationen sind. Da im Rahmen dieser Arbeit photoinduzierter Elektronentransfer (Abb. 2.7) als Nachweis verwendet wurde, soll er zunächst generell und später in diesem Kapitel am verwendeten System beschrieben werden.

Nach der Absorption eines Photons befindet sich der Farbstoff in einem elektronisch angeregten Zustand, in dem mehrere seiner Orbitale nur halb besetzt sind. Im Falle der Bildung eines Stoßkomplexes während der Lebensdauer des Zustands ist daher die Reaktionsfreudigkeit des Moleküls erheblich heraufgesetzt, die mit Oxidation oder Reduktion einhergehende Ionisierung wahrscheinlicher. Die Richtung des Elektronentransfers ist bestimmt von der Lage der elektrochemischen Potentiale der angeregten und Grundzustände. Die sich bildenden Radikationen relaxieren in einem Anschlussprozess durch Ladungsrekombination.

2.2.4. Fluoreszenzlöschung in „Smart-Probes“

Viele fluoreszierende Substanzen reagieren mit Änderung ihres Fluoreszenzverhaltens auf Veränderungen in ihrer direkten Umgebung. Neben Veränderungen in Polarisierung und Wellenlänge der emittierten Strahlung, wird vor allem die Fluoreszenzlöschung genutzt, um Veränderungen der chemischen Umgebung nachzuweisen. Besonders in homogenen Assays ist es wichtig, mit möglichst einfachen Mitteln gebundene Marker von freien zu unterscheiden, da eine Auftrennung der Probe häufig nur mit hohem Aufwand möglich ist. Homogene fluoreszenzbasierte Immunnachweise sind neben der Bindungskonstante des Antikörper-Antigenkomplexes hauptsächlich durch die Hintergrundfluoreszenz der ungebundenen Proben limitiert, da in homogenen Assays ein großer Überschuss an Marker nötig ist, um nach dem Massenwirkungsgesetz eine quantitative Komplexbildung zu gewährleisten.

Optimal für solche Anwendung ist die Verwendung von „Smart Probes“ (engl. : „smart“ gerissen, pfiffig), die nur nach erfolgter spezifischer Bindung ein

Fluoreszenzsignal aussenden. Dieses kann durch geschicktes Ausnutzen verschiedener Lösungsmechanismen erreicht werden. Bei molekularen Leuchtbojen (molecular beacons) [Tyagi und Kramer 1996; Knemeyer, Marme et al. 2000] wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer genutzt. Donor/Akzeptor-Paare oder Farbstoff/Quencher-Paare, die vor Auftreten einer spezifischen Bindung hinreichend nah beieinander liegen, entfernen sich bei deren Bildung voneinander und die Probe verändert ihr Fluoreszenzverhalten.

Um eine maximale Affinität und Spezifität im Bindungsverhalten zu erreichen, ist es sinnvoll, die chemische Struktur der Substanzen so wenig wie möglich zu modifizieren. Peptide lassen sich durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) zwischen der Aminosäure Tryptophan (Trp) und einem Fluorophor leicht als Smart Probes verwenden [Neuweiler, Schulz et al. 2002]. Bei diesen Proben wirkt das leicht oxidierbare Indolderivat Tryptophan als Elektronendonator für einen in unmittelbarer Nähe befindlichen Fluoreszenzfarbstoff [Jones, Lu et al. 1995].

In der in dieser Arbeit verwendeten Technik zum Nachweis von Antikörpern werden kurze, tryptophanhaltige Epitope eines Proteins mit dem rot absorbierenden Oxazinderivat MR121 markiert. Wichtig ist hierbei, dass die Epitope nicht so lang sind, dass es zur Ausbildung von Sekundärstrukturen kommen kann, die den Kontakt zwischen Farbstoff und Trp erschweren können. Durch die Bildung stabiler Grundzustandskomplexe zwischen Indolring und aromatischem System des Fluorophors kommt es im freien Peptid zu einer Löschung der Farbstofffluoreszenz. Die verbleibende Fluoreszenz ist hauptsächlich auf im Gleichgewicht nichtkomplexierte Farbstoffmoleküle zurückzuführen [Neuweiler 2002].

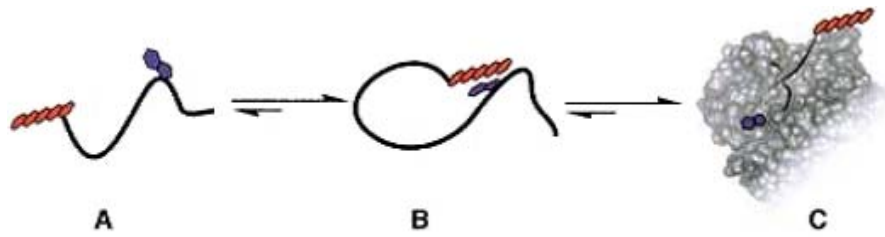


Abb. 2.10: Prinzip der Smart Probes für die Detektion von Antikörpern. In ungebundenen, freibeweglichen Proben bildet sich ein Gleichgewicht zwischen offener Konformation (A), ohne Kontakt zwischen Farbstoff (rot) und Tryptophan (blau), und dem geschlossenen Komplex (B). Bei der spezifischen Bindung an einen Antikörper wird die Struktur des Epitops fixiert und die aromatischen Systeme können nicht mehr in Kontakt treten (C)

Die spezifische Wechselwirkung des Epitops mit der Bindungstasche des Antikörpers führt zu einer Fixierung der Aminosäurereste am Antikörper und damit zu einer Fixierung des Epitops. Ein Kontakt zwischen den aromatischen Systemen ist nicht mehr möglich und die Fluoreszenzquantenausbeute steigt stark. Aufgrund des deutlich stärkeren Signals der gebundenen Epitope eignen sich Smart Probes gut zum homogenen Antikörpernachweis.

2.3. Fluoreszenzmikroskopische Techniken in immunologischen Nachweisen

Die klassischen, ensemblebasierten Immunonachweise sind durch ihre Reaktionsführung in Sensitivität und Selektivität begrenzt. Jede Technik, die eine enzymatische Reaktion zur Signalverstärkung nutzt, kann nur semiquantitativ sein. Aber auch bei direktem Nachweis ist die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Bindungen nicht möglich. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren können hier sinnvoll eingesetzt werden, um die Beobachtung und Bewertung immunochemischer Reaktionen genauer und sicherer zu machen.

Die Entwicklung immer besserer lichtmikroskopischer Verfahren erlaubte bereits Ende der achtziger Jahre die Detektion einzelner Moleküle [Moerner und Kador 1989; Shera, Seitzinger et al. 1990].

Seitdem ist eine Vielzahl mikroskopischer Techniken entstanden, die die Betrachtung von Subpopulationen einer Probe bis hin zu einzelnen Molekülen ermöglichen. Derart empfindliche Methoden stellen hohe Anforderungen an Probe und technische Ausstattung der Messapparatur. Unabhängig von der Messmethode ist ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R-

Verhältnis) nötig. Die Aufbauten benötigen neben effektiven, photostabilen Farbstoffen eine hocheffiziente Sammeloptik und Detektoren mit hoher Quanteneffizienz. Allgemein wird bei fluoreszenzmikroskopischen Aufbauten in Abhängigkeit von der Art der Anregung zwischen konfokalen, evaneszenten und defokussierten (Weitfeld-) Methoden unterschieden, die sich in ihren Anwendungen stark unterscheiden.

Weitfeldmethoden haben den einfachsten Aufbau und den breitesten Anwendungsbereich in der Fluoreszenzmikroskopie. Da das Anregungsvolumen noch verhältnismäßig groß ist, weist diese Technik zwar noch kein optimales Verhältnis von Signal zu Hintergrund auf, ist jedoch variabler einsetzbar als konfokale Mikroskopie. Da sie auf die Bereiche in der Nähe der Oberfläche der Probe beschränkt ist, ist eine dreidimensionale Abbildung nicht möglich. Durch Immobilisierung von Proben an der Oberfläche können in der Fluoreszenzweitfeldmikroskopie jedoch einzelne Probenmoleküle voneinander unterschieden und getrennt betrachtet werden.

In der konfokalen Mikroskopie ist das Anregungsvolumen auf einen Fokus von wenigen Femtolitern reduziert. Unter Verwendung von Pinholes zur weiteren Reduktion des Hintergrundes können sehr gute S/R-Verhältnisse und eine hohe zeitliche Auflösung erreicht werden. In biologischen Proben wie z.B. Zellen kann über Verschiebung des Fokus innerhalb der Probe eine dreidimensionale Abbildung der Probe angefertigt werden. Eine gleichzeitige Betrachtung größerer Bereiche einer Probe ist jedoch nicht möglich. Zur Untersuchung solcher Systeme werden Weitfeld- oder defokussierte Methoden herangezogen.

Die Anregung durch ein evaneszentes Feld stellt eine weitere Möglichkeit zur Reduktion des Hintergrundsignals dar. Hierbei trifft das Licht über ein Prisma (Prism type) oder Objektiv (objective type) in einem so großen Winkel auf den Probenträger, dass es an der Grenzfläche zur Probe zur Totalreflexion kommt. Da die Photonen jedoch eine gewisse Aufenthaltswahrscheinlichkeit hinter der Grenzfläche haben, entsteht eine exponentiell abklingende evaneszente Welle, die wenige Nanometer tief in die Probe eindringt. So können mit stark vermindertem Hintergrundsignal gezielt Vorgänge an dieser Grenzfläche betrachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Weitfeld- als auch konfokale Mikroskope verwendet, die im Folgenden mit ihrer Anwendung vorgestellt werden sollen.

2.3.1. Weitfeldmikroskopie

Das Weitfeldfluoreszenzmikroskop ist eine Weiterentwicklung des klassischen Lichtmikroskops. In Fluoreszenz-Weitlichtmikroskopen wird das Fluoreszenzlicht durch das selbe Objektiv gesammelt, durch das die Anregung erfolgt.

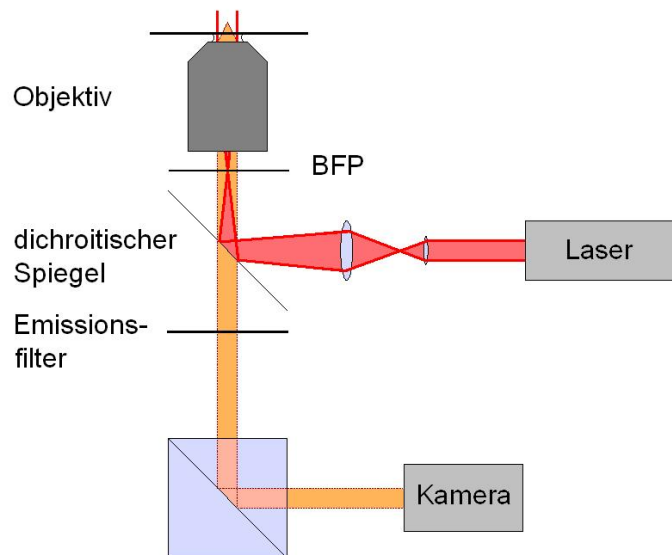


Abb. 2.11: Aufbau eines Weitfeldmikroskops

Um eine möglichst große Oberfläche auszuleuchten, wird der Laserstrahl zunächst durch ein Linsensystem aufgeweitet. Über einen dichroitischen Spiegel wird das Licht zum Objektiv gelenkt, wo der Strahl auf die hintere Brennebene (back focal plane BFP) des Objektivs fokussiert wird, sodass es parallel aus dem Objektiv austritt. Das Fluoreszenzlicht der angeregten Objekte wird im Objektiv gesammelt, tritt durch den dichroitischen Spiegel, wird durch einen Emissionsfilter aufgereinigt und von einer CCD-Kamera detektiert. Die Technik ermöglicht Aussagen über die Verteilung und zeitliche Veränderungen des Fluoreszenzsignals zu erhalten.

Totale-interne-Reflexion-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM)

TIRFM ist eine Technik auf Grundlage der Weitfeldmikroskopie. Sie wurde in den frühen achtziger Jahren in Ann Arbor, Michigan entwickelt [Axelrod, Thompson et al. 1983]. Im Unterschied zur gerade beschriebenen Technik tritt das Licht bei TIR Aufbauten in einem so großen Winkel auf die Glas/Wasser-Grenzfläche zur Probe, dass es zu Totalreflexion kommt. Der kritische Winkel, oberhalb dessen es bei einem Übergang vom dichteren Medium mit dem Brechungsindex (n_1) zum weniger dichten Medium ($n_2 < n_1$) zu Totalreflexion kommt ist gegeben als:

$$(2.21) \quad \sin \theta_k = \frac{n_2}{n_1}$$

Die Anregung der Fluorophore erfolgt über evaneszente Wellen. Dieses exponentiell abfallende Feld regt nur eine dünne Schicht, meist weniger als 100 nm dick, der Probe direkt an der Grenzfläche an, was für Beobachtungen an der Oberfläche zu einem besonders guten Signal-Rausch-Verhältnis führt.

Das verwendete Mikroskop erreicht die Totalreflexion über ein Objektiv durch ein Verschieben des Laserstrahles parallel zur ursprünglichen Einstrahlung an dessen Rand. Hierfür sind Objektive mit großer numerischer Appertur nötig.

2.3.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Auch bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird der Laser zunächst durch ein Linsensystem aufgeweitet. Das Licht tritt im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie jedoch parallel durch den dichroitischen Spiegel in das Objektiv und wird in der Probe fokussiert. Die in dem kleinen Anregungsvolumen emittierte Fluoreszenz wird durch das Objektiv gesammelt und passiert den Strahlteiler. Um Fluoreszenzlicht von außerhalb der Brennebene auszublenden wird eine Lochblende verwendet. Sie kann jedoch im verwendeten Aufbau entfallen, da die Linse nicht direkt auf die Lawinenphotodioden (avalanche photodiodes, APD), sondern auf optische Kabel fokussiert, die die Funktion der Lochblende erfüllen.

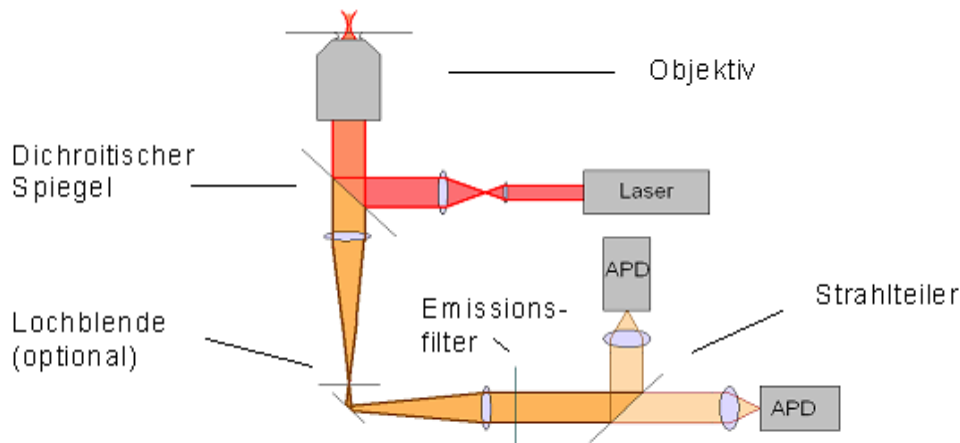


Abb. 2.12: Aufbau eines konfokalen Mikroskops

Generell ist ein Aufbau mit nur einer APD möglich. In dieser Arbeit wurde das konfokale Mikroskop für Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Fluorescence correlation spectroscopy, FCS) verwendet. Da FCS-Experimente durch die Totzeiten der Detektoren limitiert sind, wurden zu deren Minimierung zwei APDs verwendet.

2.3.3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die FCS wurde Anfang der siebziger Jahre entwickelt [Magde, Elson et al. 1974]. In FCS Experimenten werden die Informationen über eine Probe durch Beobachtung der Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität gewonnen. Veränderungen auf molekularer Ebene, z.B. Konformationsänderungen oder Komplexbildung einzelner Komponenten des Systems, können detektiert werden, so lange sie mit Änderungen im Fluoreszenzverhalten oder der Diffusionszeit einhergehen. Die Messgröße der FCS ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit. Die Fluoreszenzsignale werden aufgenommen und miteinander korreliert. Aus der Auftragung ihrer Autokorrelationsfunktion $G(t)$ lassen sich die Konzentration der Probe sowie die mittlere Diffusionszeit ihrer Moleküle direkt bestimmen [Krichevsky, 2002 ; Magde, 1974].

Um $G(t)$ zu erhalten wird ein System mit einer Spezies detektierbarer Moleküle betrachtet. Betrachtet werden soll zunächst ihre lokale Konzentration $C(\vec{r}, t)$, die durchschnittliche Konzentration $\bar{C} = \langle C(\vec{r}, t) \rangle$ und die lokale Abweichung

$\delta C(\vec{r}, t) = C(\vec{r}, t) - \bar{C}$. Im Gleichgewicht gilt aufgrund des ersten Fickschen Gesetzes für $C(\vec{r}, t)$:

$$(2.22) \quad \vec{J} = -D\nabla C(\vec{r}, t)$$

mit der Teilchenstromdichte \vec{J} und dem Diffusionskoeffizienten D .

Dieses statische Gesetz wird unter Einbeziehung der Kontinuitätsgleichung das zweite Ficksche Gesetz, welches eine Beziehung zwischen zeitlichen und örtlichen Konzentrationsunterschieden beschreibt:

$$(2.23) \quad \frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 C(\vec{r}, t)$$

Analog gilt für die lokale Abweichung:

$$(2.24) \quad \frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 \delta C(\vec{r}, t)$$

Die Signalstärke hängt des Weiteren vom Produkt Q aus Absorptionsquerschnitt und Fluoreszenzquantenausbeute ab. Unter der Annahme, dass die Anzahl der emittierten Photonen pro Molekül proportional zur Verteilung der anregenden Strahlung $I(\vec{r})$ ist, kann die Anzahl $n(t)$ der über ein Zeitintervall Δt detektierten Photonen beschrieben werden als:

$$(2.25) \quad n(t) = \Delta t \int d^3 \vec{r} I(\vec{r}) C(\vec{r}, t) Q$$

Analog gilt für die Abweichung $\delta n(t)$ vom Mittelwert $\bar{n} = \langle n(t) \rangle$:

$$(2.26) \quad \delta n(t) = n(t) - \bar{n} = \Delta t \int d^3 \vec{r} I(\vec{r}) \delta C(\vec{r}, t) Q$$

Die Autokorrelationsfunktion für FCS Experimente ist gegeben als das zeitliche Mittel des Produkts der Intensitätsänderungen zu verschiedenen Zeiten. Normalisiert wird auf das Quadrat der durchschnittlichen Intensität.

$$(2.27) \quad G(t) = \frac{1}{\bar{n}^2 T} \sum_{i=0}^{T-1} \delta n(t') \delta n(t'+t)$$

T ist hierbei die Gesamtzahl der zu untersuchenden Zeitintervalle Δt und i die Anzahl der zurückgelegten Zeitintervalle. t bezieht sich auf ein späteres Zeitintervall $m=t/\Delta t$, womit $\delta n(t') = n_i - \bar{n}$ und $\delta n(t'+t) = n_{i+m} - \bar{n}$ gilt, wobei n_i und n_{i+m} die Anzahl der Photonen ist, die in den Zeiträumen $t' = i\Delta t$ und $t'+t = (i+m)\Delta t$

detektiert werden. Für die einfachere Entwicklung der Autokorrelationsfunktion wird das zeitliche als statistisches Mittel geschrieben:

$$G(t) = \frac{1}{n} \langle \delta n(0) \delta n(t) \rangle \quad (2.28)$$

Einsetzen von Gleichung (2.26) führt zur Autokorrelationsfunktion

$$G(t) = \frac{(\Delta t)^2}{n} Q^2 \iint d^3 \vec{r} d^3 \vec{r}' I(\vec{r}) I(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle \quad (2.29)$$

Sie ist damit eine Faltung der Korrelationsfunktionen mit dem Anregungsprofil. In weiteren Schritten wird die Korrelationsfunktion so umgestellt, dass sie nur noch von Nullzeitgrößen abhängig ist.

Auf diesem Weg kann $G(t)$ ausschließlich durch experimentelle Parameter wie die Konzentration oder Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Zur expliziten Berechnung von $G(t)$ müssen weitere Aussagen zu $I(\vec{r})$ getroffen werden. In dem verwendeten konfokalen Aufbau kann die Intensitätsverteilung mithilfe einer Gaussverteilung über die drei Raumachsen x , y und z beschrieben werden:

$$I(\vec{r}) = I_0 e^{-\left(\frac{2x^2}{\omega_x^2} + \frac{2y^2}{\omega_y^2} + \frac{2z^2}{\omega_z^2} \right)} \quad (2.30)$$

Mit einem solchen Ausleuchtungsprofil ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion:

$$(2.31) \quad G(t) = \frac{1}{CV} \left(1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 + \frac{t}{\tau_D'} \right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 + \frac{t}{\tau_D''} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

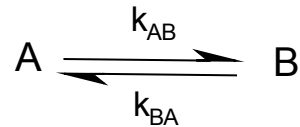
Darin ist $V = \pi^{3/2} \omega_x \omega_y \omega_z$ das effektive Probenvolumen, $\tau_D = \omega_x^2 / 4D$, $\tau_D' = \omega_y^2 / 4D$, und $\tau_D'' = \omega_z^2 / 4D$ sind die charakteristischen Diffusionszeiten entlang der Raumrichtungen. Da in einem konfokalen Anregungsvolumen die Länge des Fokus in z -Richtung deutlich größer ist als entlang der x - und y -Achse. Somit wird der dritte Term in Gleichung vernachlässigbar klein. Unter der Annahme, dass die Ausdehnung und damit die spezifischen Ausdehnungskoeffizienten in x - und y -Richtung gleich sind, ergibt sich die Autokorrelationsfunktion für die 2-dimensionale Diffusion als

$$(2.32) \quad G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1}$$

sofern keine weiteren Effekte auftreten. N ist hierin die durchschnittliche Anzahl der Moleküle im Volumen V bei der durchschnittlichen Konzentration \bar{C} .

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sollten jedoch nicht nur Änderungen der Diffusionszeit beobachtet. Es wurden die in Abschnitt 2.2.4 vorgestellten fluoreszenzgelöschten Peptide zur Detektion von Änderungen des chemischen Systems herangezogen. Neben der Diffusionszeitverlängerung durch Komplexbildung sollte die Aufhebung der Fluoreszenzlöschung mithilfe der FCS Autokorrelationsfunktion dargestellt werden, da es sich bei der Löschung um eine Kontaktformation und daher um ein chemisches Gleichgewicht handelt.

Hierbei sei A die fluoreszierende Form des Peptids ohne Trp-Farbstoffkontakt und



B der nichtfluoreszierende Grundzustandskomplex. Gleichung (2.24) für die lokale Konzentrationsabweichung muss nun um einen Term für die chemischen Veränderungen erweitert werden. Die entsprechende Gleichung für A lautet:

$$(2.33) \quad \frac{\partial \delta C_A(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \bar{\nabla}^2 \delta C_A(\vec{r}, t) - k_{AB} \delta C_A + k_{BA} \delta C_B$$

Entsprechend gilt für B:

$$\frac{\partial \delta C_B(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \bar{\nabla}^2 \delta C_B(\vec{r}, t) + k_{AB} \delta C_A - k_{BA} \delta C_B \quad (2.34)$$

Durch mathematische Operationen [Krichevsky und Bonnet 2002] erhält man $G(t)$:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + K e^{-t/\tau} \right) \quad (2.35)$$

In dieser ist N die Anzahl aller detektierbaren Moleküle, $K = k_{AB}/k_{BA} = \bar{C}_B/\bar{C}_A$ die Gleichgewichtskonstante und $\tau = (k_{AB} + k_{BA})^{-1}$ die Relaxationszeit. Gleichung (2.35) gilt für alle Fälle, in denen τ und τ_D sich so stark unterscheiden, dass sie sich gegenseitig nicht beeinflussen. In den untersuchten Peptiden liegen die Relaxationszeiten bei weniger als 100 ns, während die Diffusionszeiten auf der Millisekundenskala liegen, weshalb die Gleichung verwendet werden kann.

3. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Sigma (München) bezogen. Alle verwendeten Puffer wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und nach dem Mischen mit Sterilfiltern (Porengröße 0,45 μm , Carl Roth, Karlsruhe) von Verunreinigungen befreit.

3.1. Messinstrumente und mikroskopische Aufbauten

3.1.1. Ensemble Messungen

Die Absorptionsmessungen wurden in Quarz Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Mühlheim) mit einem UV-Vis-Spektrometer (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham USA) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian, Darmstadt) aufgenommen. Alle ermittelten Quantenausbeuten $\Phi_{f,rel}$ wurden in Abhängigkeit von der Fluoreszenz des freien Farbstoffs angegeben.

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern τ wurden mit einem Spektrometer (5000MC) für zeitkorreliertes Einzelphotonon zählen (time-correlated single-photon counting (TCSPC) der Firma IBH (Glasgow, Großbritannien) durchgeführt. Angeregt wurde mit einer gepulsten Laserdiode bei 635 nm, das Fluoreszenzsignal wurde in 4096 Kanälen gefangen, bis der maximale Kanal 5000 Photonen gezählt hatte.

3.1.2. FCS-Mikroskopie

Der Aufbau (s.a. Abbildung 2.12) für die Einzelmolekülexperimente bestand aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg), die Anregung erfolgte über einen HeNe-Laser bei 633 nm. Der aufgeweitete, parallele Strahl wurde bei einer Laserleistung von 0,2 mW durch einen dichroitischen Strahlteiler (645 DLRP, Omega Optics, Brattleboro VT, USA) in ein Ölimmersionsobjektiv (63x, NA 1,4, Zeiss, Jena) gekoppelt. Das Fluoreszenzlicht wurde durch das gleiche Objektiv gefangen. Nach dem Passieren des Emissionsfilters (675RDF50; Omega Optics; Brattleboro VT, USA) wird das Signal durch einen 50/50 Strahlteiler geteilt und im aktiven Bereich von 2 Lawinenphotodioden (APD, AQR-14, EG&G, Vaudreuil, Kanada) abgebildet. Die von den APDs erhaltenen Signale werden von einer PC-Karte für TCSPC (SPC-630, Becker&Hickl, Berlin)

aufgenommen und mit einer digitalen Korrelatoreinheit (ALV-6010, ALV, Langen) mit einer zeitlichen Auflösung von 6,25 ns kreuzkorreliert.

3.1.3. interne Totalreflektionsmikroskopie (Total Internal Reflection TIR)

Die TIR-Messungen wurden an einem inversen Standardmikroskop (Olympus IX71, Olympus, Hamburg) durchgeführt (s.a. Abb. 2.11). Die 647 nm-Linie eines Ar⁺/Kr⁺-Lasers (Stabilite 2018-RM Mixed Gas Ion Laser) wurde von hinten in das Mikroskop eingekoppelt und über einen dichroitischen Strahlteiler so in das Öl-Immersionsobjektiv (Olympus 100x, 1.45 NA) gebracht, dass es an der Grenzfläche zur Probe zu Totalreflexion kam. Das Fluoreszenzlicht wurde im Objektiv gesammelt, und nach Passieren des Emissionsfilters mit einer EM-CCD-Kamera gesammelt (RIXON DV 887 DSC-BV, EM CCD).

3.1.4. Weitfeldmikroskopie

Für die Weitfeldmikroskopie (Abb 2.11) wurde ein inverses Standardmikroskop (Olympus IX70, Olympus, Hamburg) mit einem 60fach Ölimmersionsobjektiv (NA 1,45, Olympus, Hamburg) verwendet. Die Anregung erfolgte mit einem Kr⁺-Ionenlaser (Lexel Model 85) bei 647 nm. Der Laserstrahl wurde durch einen Anregungsfilter (Z647/10) auf die hintere fokale Ebene des Objektivs fokussiert, mit dem auch das Fluoreszenzlicht gesammelt wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde durch einen Emissionsfilter (HQ700/75) mit einer EM-CCD-Kamera (RIXON DV 887 DSC-BV EM CCD, Andor Technology, South Windsor CT, USA) auf einer Fläche von 150 x 112 µm abgebildet.

3.2. Vorbereitung der Proben

3.2.1. Fluoreszenzmarkierung von Oligopeptiden und Antikörpern

Markierung der Oligopeptide

Es wurden folgende Peptide von der Firma Biosynthan (Berlin) bezogen:

Epitop 1:	HN – SQETFSDLWKLLPEN – OH	(1807 g/mol)
Epitop 2a:	HN – DDLMLSPDDIEQWFT – OH	(1825 g/mol)
Epitop 2b:	Biotin – GSGSDDLMLSPDDIEQWFTGSGSK – OH	(2659 g/mol)
Epitop 3:	HN – SKKGQSTSRHW – OH	(1301 g/mol)

0,5 mg Peptid (180-300 nmol) wurden in 50 μ L Wasser aufgenommen und mit 1 mg (2 μ mol) MR121-NHS-Ester (Atto-tech, Siegen) in 10 μ L N,N-Dimethylformamid (DMF) versetzt. Zur Aktivierung des Esters wurden 20 μ L eines 0,1 M NaHCO_3 Puffers des pH-Wertes 8,5 zu der Lösung gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung der am primären Stickstoff markierten Peptide (Reaktionsschema in Abbildung 3.1) erfolgte durch HPLC (Agilent Technologies, Böblingen) auf einer reversed-phase-Säule (Hypersil-ODS C18 Partikel, 5 μ m Durchmesser, Porengröße 10 nm) unter Verwendung eines linearen Konzentrationsgradienten von 0-75% Acetonitril in Wasser bei einer konstanten Triethylammoniumacetatkonzentration von 0,1 M. Die Detektion des gewünschten Produktes erfolgte durch Messung der Absorption und Emission des Farbstoffs bei 660 bzw. 680 nm sowie durch Aufzeichnung der Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm. Im Falle mehrerer peptidhaltiger, farbstoffmarkierter Produkte erfolgte die Unterscheidung der Reaktionsprodukte über Bestimmung der Quantenausbeuten und durch den Fluoreszenzanstieg bei erfolgreicher Bindung an den entsprechenden Antikörper (Kapitel 2.2). Lösungsmittel und Puffer wurden bei 35°C und 0,1 mbar vollständig entfernt, die Proben mit 200 μ L phospatgepufferter 0,1 molarer NaCl-Lösung (PBS) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Ausbeuten lagen zwischen 25 und 60% bezüglich des eingesetzten Peptides.

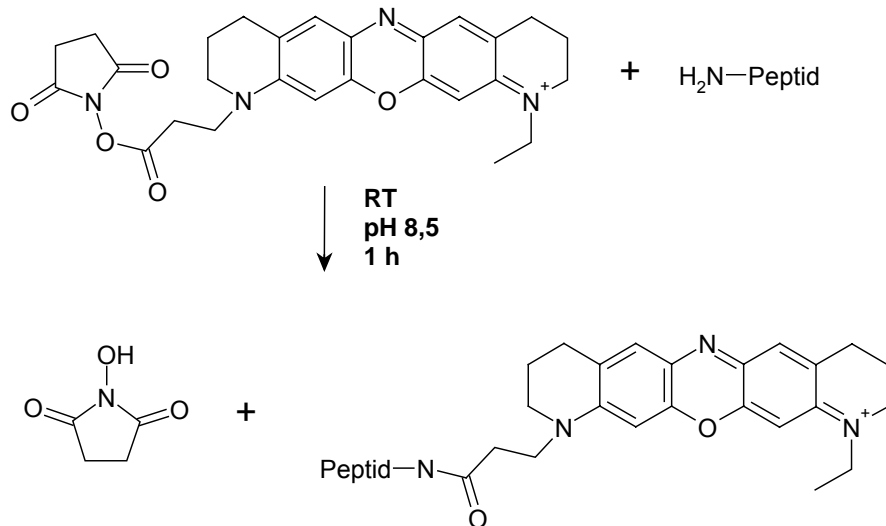


Abb. 3.1: Reaktionsschema einer Farbstoffmarkierung mittels NHS-Ester am Beispiel MR121.

Die für die Untersuchung der Bindungsstabilität vermessenen farbstoffmarkierten GS-Peptide wurden freundlicherweise von Herrn Marc Löllmann zur Verfügung gestellt, W-MR121, FW-MR121 und GW-MR121 wurden in 95%iger Reinheit gekauft (Atto-tech, Siegen).

Markierung der Antikörper

Die Markierung aller Antikörper erfolgte mit dem Carbocyaninderivat Alexa 647 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) der Molekülmasse 1250 g/mol. 30 µL der 1,4 µmolaren Antikörperlösung in PBS (Dianova, Hamburg) werden mit 6 µL einer 1,6·10⁻⁵ M Lösung des Farbstoffs versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 30 µL 0,1 M NaHCO₃ Puffer des pH-Wertes 8,5 gestartet. Nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wird der überschüssige Farbstoff durch Größenausschlusschromatographie über eine NAP-5 Säule (GE Healthcare, München) entfernt. Die so erhaltene 40 nM Antikörperlösung trägt pro Antikörper im Mittel 1,5 Farbstoffmoleküle einer Quantenausbeute von 1,13 relativ zu freiem Alexa 647. Die Antikörperlösungen wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

3.2.2. kovalente Beschichtung der PS-Beads mit den Peptiden

Bei den Beads handelte es sich um Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die superparamagnetischen Polystyrolbeads mit einem Durchmesser von 2,8 µm wurden entsprechend der Anleitung [Bangs Laboratories 2004] mit dem „PolyLink Protein Coupling Kit“ für carboxymodifizierte Mikrokugeln (Microspheres) (Bangs Laboratories, Fischers IN, USA) in einer zweischrittigen

Reaktionsfolge belegt. Die Belegung der Beads wurde über Bestimmung der Peptidmengen in Lösung durch Messung der Proteinabsorption bei 280 nm vor und nach dem Umsetzen bestimmt. Die auf diesem Wege ermittelte Besetzung von ~ 300 Epitopmolekülen/ Bead ist jedoch nur ein ungefährender Wert. Zur Bestimmung der Menge nicht umgesetzten Proteins musste die Lösung aufkonzentriert und mittels HPLC von ebenfalls bei diesen Wellenlängen absorbierenden Bestandteilen getrennt werden. Bei diesen Arbeitsschritten kann ein Verlust von Peptid nicht ausgeschlossen werden.

3.2.3. Versuchsvorbereitungen

Vorbereitung der FCS-Experimente

Der Puffer für alle Experimente war PBS mit Zusatz von 0,05% TWEEN20 (PBST 0,05%) und 0,3 mg/ml Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA).

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten und des Oxidationsverhaltens wurden die monoklonalen Antikörper BP53-12 (E1), PAb 1801 (E2a) und PAb 122 (E3) (alle Dianova, Hamburg, Deutschland) wie geliefert als $1,4 \cdot 10^{-6}$ M Lösungen in PBS oder, je nach gewünschter Konzentration, als 1:100 Verdünnung im Reaktionspuffer verwendet. Aus den in 1.1.1 hergestellten farbstoffmarkierten Peptiden wurden Stammlösungen der Konzentration $1 \cdot 10^{-8}$ mol/L hergestellt. Jede Probe hatte ein Volumen von 200 μ L. 20 μ L Epitop-Stammlösung wurden mit der zur Einstellung der gewünschten Konzentration nötigen Menge Antikörper versetzt, mit dem Puffer aufgefüllt und 1 h inkubiert. Vor der Messung wurden 100 μ L der Probe in einen Objektträger mit Vertiefung gegeben und durch ein Deckglas (beide Carl Roth, Karlsruhe) verschlossen.

Die Vorbereitung der Blutprobe verlief analog. Es wurden jedoch nur 2 μ L der Peptidlösung verwendet und der monoklonale Antikörper wurde durch 2 μ L Blutserum ersetzt.

Die Vorbereitung von Glasoberflächen für TIR-Experimente

Die Versuche wurden in 8well-Lab-Teks[®] (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgeführt. Zur Reinigung der Glasoberflächen wurden diese 1 Minute mit 0,5% HF (aq) geätzt und anschließend 3 mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Oberflächen mit einer Lösung von 5 mg/ml ($8 \cdot 10^{-5}$ M) BSA und 0,5 mg Biotin-BSA

($8 \cdot 10^{-6}$ M) für 15 Stunden inkubiert. Die Kammern wurden 3 mal vorsichtig mit PBST 0,05% gewaschen und für 5 Minuten mit einer Lösung aus $10 \mu\text{g/ml}$ ($1,5 \cdot 10^{-7}$ M) Streptavidin und $0,13 \mu\text{g/ml}$ Epitop 2b ($1,5 \cdot 10^{-8}$ M) aus 1.1.1 in PBST 0,05% inkubiert. Eine Lösung von $1,4 \mu\text{g/ml}$ PAb 1801 ($1,5 \cdot 10^{-8}$ M) in PBST 0,05% mit $0,3 \text{ mg/ml}$ BSA wird erst nach Vermessungsbeginn zu der Probe gegeben.

Probenpräparation für den quantitativen Beadassay (IGF-I)

$0,2 \mu\text{L}$ Dynabeads[®] M-280 Streptavidin (Invitrogen, Karlsruhe)¹ mit $1,2 \cdot 10^{-11}$ mol Biotinbindungsstellen wurden mit biotinyliertem und nicht biotinyliertem polyklonalem goat-anti-human IGF-I Antikörper sowie mit rekombinantem IGF-I (alle R&D Systems, Wiesbaden) in den Mengen versetzt, dass nach Auffüllen mit PBST 0,05% mit 3 mg/ml BSA $200 \mu\text{L}$ Probenvolumen der gewünschten Konzentrationen (Tabelle 3.1) erhalten wurden. Der nicht biotinylierte Detektionsantikörper war im Vorfeld mit ALEXA 647 markiert worden (3.1.1). Die aufgefüllten Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurden sie in Bewegung gehalten, um eine vorzeitige Sedimentation der Partikel zu verhindern. Die Proben wurden vollständig in 96well-Titerplatten mit optischem Boden (Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben und mit $100 \mu\text{W}$ Eingangsleistung vermessen.

Tabelle 3.1: Übersicht über die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen

$C_{\text{DetektionsAB}}/\text{molL}^{-1}$	$C_{\text{FängerAB}}/\text{molL}^{-1}$	Konzentrationsbereich IGF/ molL^{-1}	Konzentration am Signalmaximum
$1 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8}$
$8 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-9}$
$5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9} - 5 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$
$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-10} - 3 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$
$8 \cdot 10^{-10}$	$8 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9} - 5 \cdot 10^{-10}$	$8 \cdot 10^{-10}$

¹ Laut Hersteller enthält die gelieferte Suspension $2 \cdot 10^9$ beads/ml entsprechend 10 mg Beads/ml oder $6 \cdot 10^{-8}$ mol Biotinbindungsstellen/ml (Invitrogen und Dynal, "Product Information Dynabead(R) M280- Streptavidine." (2006).).

Probenpräparation für den qualitativen Beadassay (p53)

Die Inkubation erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden 0,5 µL Lösung der peptidtragenden Beads² (3.1.2) zwei mal mit 200 µL PBST 0,05% gewaschen. Zur Trennung der Beads von der Lösung wurde eine magnetische Trennungsvorrichtung (DynaL MPC1, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Nachdem die Beads an der Reaktionsgefäßwand festgehalten waren, konnte der Überstand abpipettiert werden.

Die gewaschenen Beads wurden mit 200µL der zu untersuchenden Serumprobe versetzt und 1 h unter leichter Bewegung bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST 0,05% wurden 200 µL einer $1 \cdot 10^{-9}$ molaren Lösung von Alexa647-markiertem, polyklonalem Ziegenantikörper gegen die konstante Region humaner IgG-Moleküle (Dianova, Hamburg) in PBST 0,05% mit 3mg/ml BSA zugegeben und eine weitere Stunde unter gleichen Bedingungen wie im ersten Schritt inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit dem BSA-freien Puffer wird mit 200µL BSA-haltigem Puffer aufgefüllt und in Mikrotiterplatten mit optischem Boden (Nunc, Roskilde, Dänemark) vermessen. Den Referenzproben wurde im ersten Inkubationsschritt PBST 0,05% mit 10 mg/ml BSA statt des Serums zugegeben. Alle Messungen erfolgten mit einer Eingangslaserleistung von 100µW.

Die Blutseren wurden von Dr. Oliver Meyer und Dr. Ashraf Agaylan der Charité Berlin zur Verfügung gestellt.

² Die Beadkonzentration in der verwendeten Lösung lag bei ungefähr 30 mg Beads/ml Lösung entsprechend $6 \cdot 10^9$ Beads /ml. Eine genaue Aussage über die Beadkonzentration ist nicht möglich, da während der Arbeitsschritte zur Belegung der Beads Verluste auftreten.

3.3. Methoden

3.3.1. Bestimmung des Anteils gebundenen Epitops durch FCS-Experimente

In den Einzelmolekülexperimenten sollte die Bindungskonstante der Reaktion zwischen farbstoffmarkiertem Epitop und dem zugehörigen monoklonalen Antikörper bestimmt werden. Grundlage der Bestimmung sollte die verlängerte Diffusionszeit der Antikörper-Epitopkomplexe gegenüber der des freien Epitops sein. Die Autokorrelationsfunktion bei ausschließlicher Betrachtung der Diffusionskomponente eines Einkomponentensystems lautet nach Gleichung 2.42:

$$G(t) = \frac{1}{N} (1 + t/\tau_D)^{-1}$$

Für Zweikomponentensysteme müssen nicht nur verschiedene Diffusionszeiten berücksichtigt werden, sondern auch die Fluoreszenz beeinflussende Faktoren wie Quantenausbeute, Fluoreszenzintensität des Farbstoffs und Absorptionsquerschnitt, deren Einfluss in Q zusammengefasst ist. In Abhängigkeit von Q und der Teilchenzahlen N der beiden Komponenten ergibt sich:

$$(3.1) \quad G(t) = \frac{Q_1^2 N_1}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \cdot (1 + t/\tau_{diff,1})^{-1} + \frac{Q_2^2 N_2}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \cdot (1 + t/\tau_{diff,2})^{-1}$$

Da es sich bei beiden Komponenten um Träger des gleichen Farbstoffs handelt, kann Q mit der Quantenausbeute Y gleichgesetzt werden. Aus der für die Experimente zu entwickelnden Gleichung soll der Anteil des gebundenen Epitope direkt ablesbar sein. Daher werden die Teilchenzahlen N_1 und N_2 über den Anteil A bzw. $1-A$ der Gesamtzahl der erfassten Moleküle ausgedrückt:

$$(3.2) \quad G(t) = \frac{Y_1^2 A}{(Y_1 A + Y_2 (1-A))^2} \cdot (1 + t/\tau_{diff,1})^{-1} + \frac{Y_2^2 (1-A)}{(Y_1 A + Y_2 (1-A))^2} \cdot (1 + t/\tau_{diff,2})^{-1}$$

Für die Auswertung wurde die Anzahl der detektierten Moleküle auf 1 normiert, um die Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten. Verwendet man diese Art der Normierung, muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der verschiedenen Quantenausbeuten von gelöschtem und ungelöschtem Epitop diese Normierung noch nicht gleichen Teilchenzahlen entspricht. Das gebundene Epitop trägt mit seiner höheren Quantenausbeute deutlich stärker zum Signal bei, als das freie Epitop. Um dem Rechnung zu tragen, muss Gleichung 3.3. auf die als 1 wiedergegebene tatsächliche Anzahl Moleküle korrigiert werden:

$$G(t) = \frac{\frac{Y_1^2 A}{(Y_1 A + Y_2 (1 - A))^2} \cdot (1 + t / \tau_{diff,1})^{-1} + \frac{Y_2^2 (1 - A)}{(Y_1 A + Y_2 (1 - A))^2} \cdot (1 + t / \tau_{diff,2})^{-1}}{\frac{Y_1^2 A + Y_2^2 (1 - A)}{(Y_1 A + Y_2 (1 - A))^2}} \quad (3.3)$$

Ein Anlegen dieser Funktion an ein Korrelationssignal im Bereich der Diffusionszeit liefert bei bekannten Grenzkorrelationszeiten von Komplex ($\tau_{Diff,1}$) und freiem Epitop ($\tau_{Diff,2}$) gute Ergebnisse für Zweikomponentensysteme.

Im Experiment kam es durch Zersetzung des Peptides zu niedrigeren Bindungskonstanten. Eine Lösung des Problems ist mit dem Hinzufügen einer zusätzlichen Komponente zu Gleichung 3.4 nicht möglich, da die Diffusionszeit des zerstörten Epitops gleich der des intakten ist und seine Quantenausbeute im Bereich der Quantenausbeute des Komplexes liegt.

3.3.2. Entwicklung einer Methode zur einfachen Unterscheidung von farbstofftragenden und freien Beads und zur quantitativen Bestimmung des Markierungsgrades

Die in 3.1.3 beschriebenen Versuche auf Mikrobeads liefern als Messergebnis digitale Aufnahmen der ausgeleuchteten Fläche. Es musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubte möglichst einfach in Abhängigkeit weniger experimenteller Parameter präzise Angaben über das Ergebnis des Experimentes zu treffen. Ziel war es, den Zustand der Probe über einen einzigen Wert zu beschreiben. Hierzu waren verschiedene Arbeitsschritte nötig.

Korrektur der ungleichmäßigen Ausleuchtung

Aus experimentellen Gründen ist unter Verwendung eines 60x Objektivs eine vollständig homogene Ausleuchtung der betrachteten Fläche von 100 x 100 μm nicht möglich. Bei der Vermessung eines Immunochips mit einer Fläche von 1 x 1 mm wird dieses Problem verstärkt auftreten. Wie groß diese Fehler in Extremfällen sein können, ist in Abbildung 3.2 zu sehen.

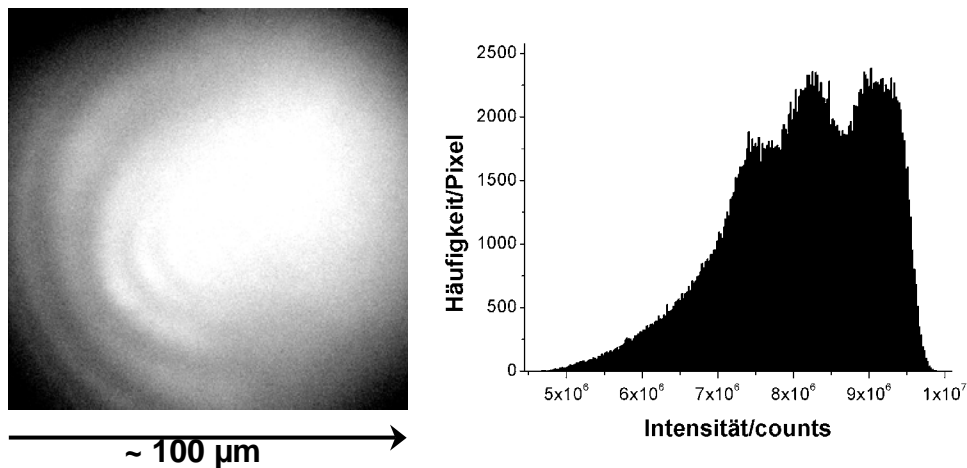


Abb. 3.2: a) Aufnahme einer Farbstofflösung. Zu sehen ist sowohl ein helles Zentrum, als auch Interferenzringe. b) Histogramm der Aufnahme

Die ungleichmäßige Ausleuchtung kann korrigiert werden, indem für jede Versuchsreihe eine Farbstoffreferenz wie in Abbildung 3.2 vermessen wird. Unter der Annahme, dass die Anregungsleistung des Lasers sich in einem Bereich bewegt, in dem Anregungs- und Fluoreszenzintensität sich linear zueinander verhalten, kann eine Ausleuchtungskorrektur vorgenommen werden. Hierzu wird die Intensität der Pixel auf die Intensität des hellsten Pixels normiert, sodass eine Referenzaufnahme mit Werten zwischen null und eins erhalten wird. Division jeder Aufnahme einer Probe durch diese Referenz liefert ein korrigiertes Bild (Abb. 3.3):

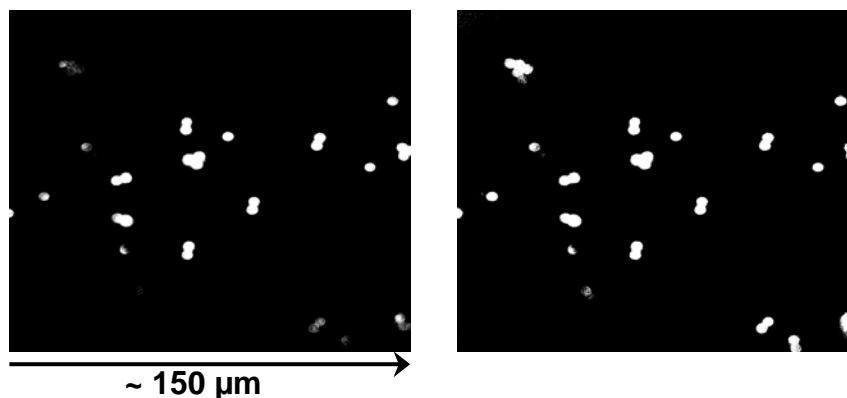


Abb. 3.3: Die gleiche Aufnahme einer Probe stark fluoreszierender 2,8 μ m großer Beads vor und nach der Ausleuchtungskorrektur.

Dieses Vorgehen stellt eine Lösung für Experimente dar, in denen die Bereiche maximaler Helligkeit besonders genau herausgestellt werden sollen, da so in den Randbereichen der Abbildung zusätzliches Signal erhalten wird. Die Ausleuchtungskorrektur findet im quantitativen Nachweis von IGF-I Anwendung.

Für eine möglichst sensitive Detektion auch schwach fluoreszierender Beads ist diese Korrektur nicht verwendbar (Abb. 3.4). In den Nachweisen von p53-Antikörpern ist das Hintergrundsignal sehr schwach. Bei einer Eingangsleistung des Lasers von $100\mu\text{W}$ sind die Außenbereiche der Abbildung so dunkel, dass ihr Signal im Hintergrundrauschen der Kamera aufgeht. Das Fluoreszenzsignal verhält sich nicht mehr in allen abgebildeten Bereichen linear zur Anregungsstärke. Eine Korrektur der Ausleuchtung führt in diesen Fällen dazu, dass die Außenbereiche unverhältnismäßig hell werden und eine weitere Bildanalyse unmöglich machen (Abbildung 3.4).

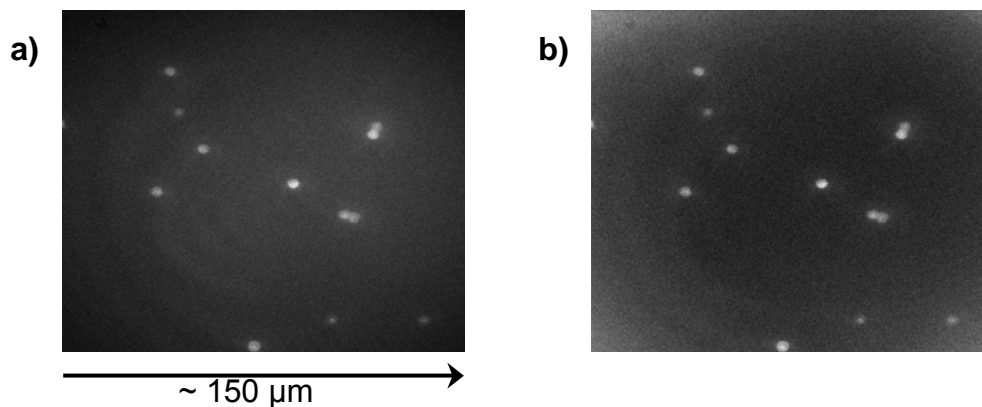


Abb. 3.4: a) Abbildung schwach fluoreszierender Beads vor einer Korrektur der Ausleuchtung. b) Die gleiche Probe nach der Korrektur.

Helligkeitsunterschiede innerhalb von Mikrobeads

Für die sensitive Erkennung von Helligkeitsunterschieden wurde ausgenutzt, dass die Helligkeitsverteilung der Beads mit steigender Farbstoffbesetzung an ihrer Oberfläche breiter wird. Dies liegt daran, dass nur das Fluoreszenzlicht der fokalen Ebene optimal gesammelt wird. Da auf die breiteste Stelle der Beads fokussiert wird, werden die Umrisse der Beads heller abgebildet als höher oder tiefer liegende Bereiche (Abbildung 3.5).

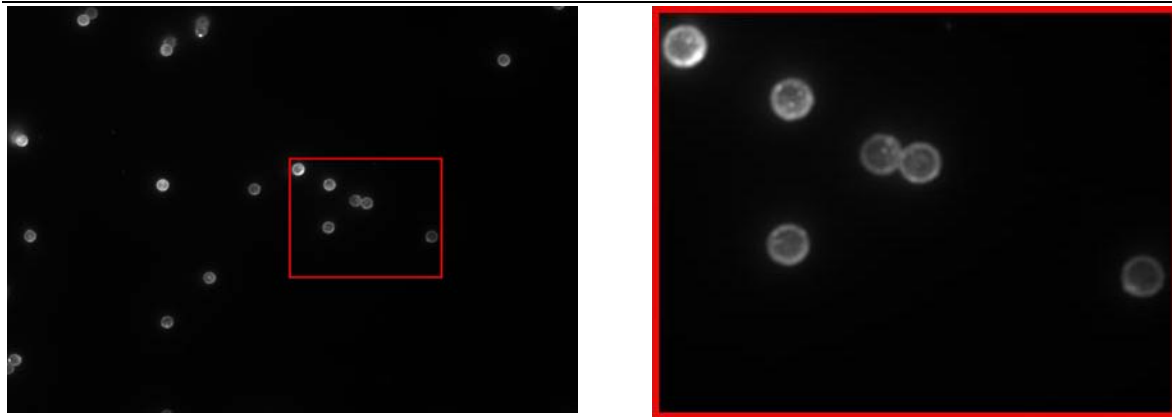


Abb. 3.5: fluoreszierende Beads, links komplette Aufnahme, rechts Ausschnitt. Deutlich erkennbar sind die hellen Ränder der Beads.

Die Heterogenität der Beadhelligkeit ist stark abhängig von Besetzung der Beads mit Farbstoffmolekülen. In Abbildung 3.6 ist links die Aufnahme der Probe aus Abbildung 3.5 zu sehen. Der Unterschied zwischen hellsten und dunkelsten Signalen ist in dieser Einstellung 2600 counts. Rechts daneben ist eine ähnliche Abbildung für eine Probe zu sehen, der kein Fängerantikörper zugesetzt wurde, in der keine Detektorantikörper spezifisch gebunden werden können. Die Spannweite der abgebildeten Helligkeiten ist hier jedoch nur 150 counts.

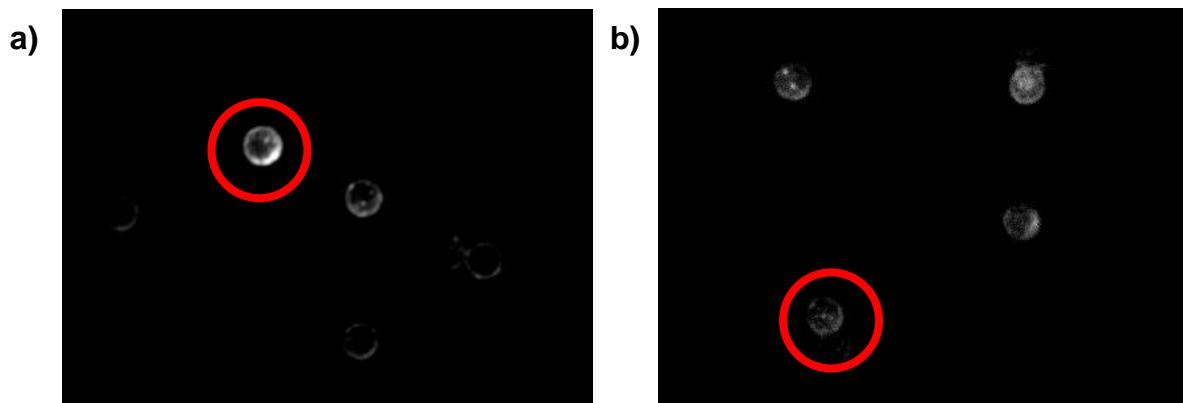


Abb. 3.6: etwa 40 x 30 μm große Ausschnitte einer positiven Probe (a) und einer negativen Probe (b). Der Unterschied zwischen hellstem und dunkelstem abgebildeten Pixel beträgt 2600 (a) bzw. 150 (b) counts.

Obwohl der dargestellte Bereich der Helligkeit der negativen Probe weniger als ein Zehntel der der positiven ist, erscheinen die Beads in Abbildung 3.6b) dennoch homogener als die stark fluoreszierenden. Noch deutlicher wird dieses in einer dreidimensionalen Auftragung der Helligkeiten der in Abbildung 3.6 markierten Beads.

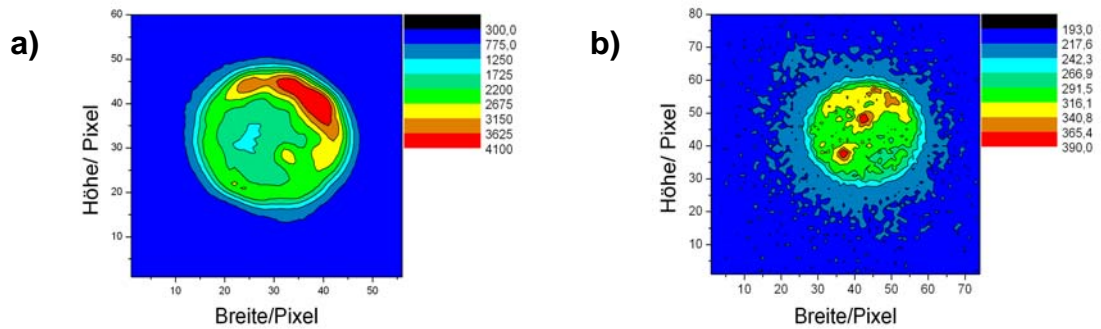


Abb. 3.7: Helligkeitsverteilung in fluoreszierenden (a) und nichtfluoreszierenden (b) Beads. Neben der deutlich engeren Verteilung in a) ist zu erkennen, dass fluoreszierende Beads hauptsächlich in den Außenbereichen emittieren.

Neben der deutlich stärkeren Lumineszenz der farbstoffbesetzten Beads fällt zusätzlich auf, dass ihre Fluoreszenz zum Zentrum des Beads hin abnimmt, während die Autofluoreszenz des leeren Beads über seine gesamte Fläche annähernd konstant ist.

Die breitere Verteilung der Helligkeiten von Beads, die fluoreszenzmarkierte Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen, wurde für die Unterscheidung positiver und negativer Proben herangezogen.

Ein Kennwert für die Helligkeitsverteilung in Beads

Zur Beschreibung des oben dargestellten Verhaltens der Beads wurden die Histogramme der digitalen Aufnahmen verwendet. Die Erstellung der Histogramme stellt den ersten Schritt zu einer einfachen Unterscheidung verschieden stark markierter Beads dar. In allen Versuchen wurden aus 32bit Bildern Histogramme mit einer Klassengröße von 10 Counts/Pixel erstellt.

In Abbildung 3.8 sind die Histogramme der in Abbildung 3.6 ausschnittsweise dargestellten Aufnahmen zu sehen. Für leere Beads schwimmt die Helligkeitsverteilung der Beads mit der des Hintergrundes, während die Verteilung für Label-tragende Beads deutlich zu höheren Intensitäten verschoben ist.

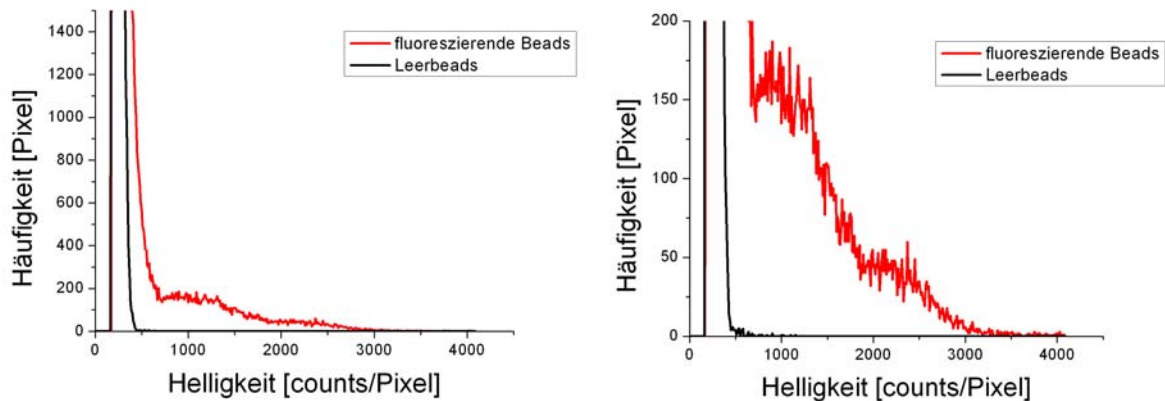


Abb. 3.8: Histogramme der Aufnahmen aus Abbildung 3.6. Die Verteilung des Hintergrundes ist bei Häufigkeiten von 1500 bzw. 200 Pixel abgeschnitten.

Für eine möglichst einfache Beschreibung eines solchen Histogramms wurde im nächsten Schritt die Information über absolute Helligkeiten aus den Histogrammen entfernt. Das geschieht in mehreren Schritten.

Zunächst muss festgestellt werden, welcher Anteil der Pixel Beads abbildet. Der Chip gibt eine Fläche von $100 \times 100 \mu\text{m}$ auf 512×512 Pixeln wider, was einer Anzahl von 262144 Pixeln im Gesamthistogramm entspricht. $2,8 \mu\text{m}$ Beads werden in diesen Aufnahmen mit einem Durchmesser von 15 Pixeln dargestellt. Jedes Bead wird dementsprechend auf etwa 80 Pixeln abgebildet, was $0,3 \text{ ‰}$ der Fläche entspricht. In einer durchschnittlichen Aufnahme mit 10 bis 40 Beads liegt der Anteil des Signals, der von den Beads herrührt dementsprechend bei $0,3$ bis $1,2\%$.

Für jede Versuchsreihe wird die mittlere Anzahl der Beads auf den Aufnahmen ermittelt und die der Beadmenge entsprechende Anzahl von Pixeln für die weitere Analyse verwendet. Bei den hellsten beginnend, werden die in den Klassen enthaltenen Pixel bis zum Erreichen der ermittelten Pixelanzahl verwertet, der bei geringeren Counts liegende Teil des Histogramms wird verworfen. Die niedrigste, noch in der Verteilung erfasste Klasse bekommt in der resultierenden neuen Verteilung jeweils den Wert 10 Counts/Pixel zugeordnet.

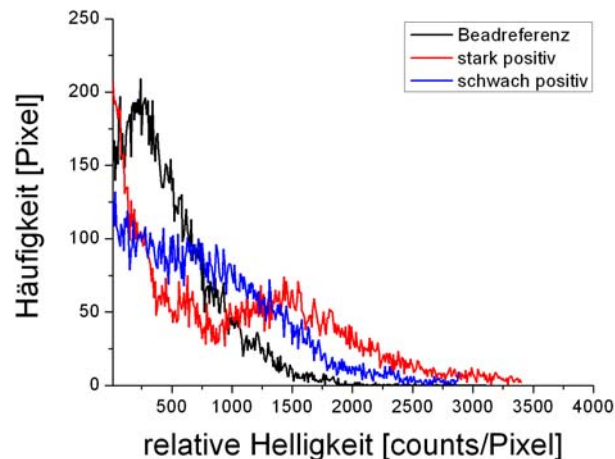


Abb. 3.9: Intensitätsverteilung der hellsten Pixel in verschiedenen Proben. Die Verteilung der Beadreferenz (schwarz) ist deutlich schmäler als die anderen Verteilungen. Je stärker die Fluoreszenz der Beads, desto deutlicher verschiebt sich das Maximum der Verteilung.

Abbildung 3.9 zeigt das Verhalten der Histogramme für eine Beadreferenz, eine schwach fluoreszierende und eine stark fluoreszierende Probe. Die Histogramme wurden zur besseren Übersichtlichkeit so geschnitten, dass ein Teil der Verteilung des Hintergrundes erkennbar blieb. Die Verteilung der Referenz ist schmäler als die der fluoreszierenden Proben, ihr Maximum liegt bei niedrigeren Werten.

Um dieses Verhalten in einem Wert zu beschreiben wurde der Weg über Mittelwerte gewählt. Zunächst wird ein Mittelwert mit quadratischer Gewichtung auf der Helligkeit der Klasse (\bar{I}_i) gebildet.

$$\bar{I}_i = \left(\frac{\sum_{i=1}^n I_i^2 F_i}{\sum_{i=1}^n F_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.4)$$

Hierin sind n die Anzahl verbliebener Klassen, I ihr Zahlenwert, und F die Anzahl der in der entsprechenden Klasse zusammengefassten Pixel.

Dieser Mittelwert steigt stark mit der Population hellerer Klassen. Er ist grundsätzlich ausreichend, um die Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe miteinander zu vergleichen und die sensitivste Möglichkeit, die Breite der Helligkeitsverteilung zu beschreiben. So wird für die leeren Beads in Abbildung 3.9 ein Wert von $\bar{I} = 607$ erhalten, für die schwach positiven von 971 und für die stark fluoreszierenden Beads liegt der Mittelwert nach Gleichung 3.5 bei 1296.

Optimierung der Histogrammbeschreibung durch Mittelwerte

Die Aufgabenstellung für den quantitativen IGF-Nachweises umfasste die Entwicklung einer von möglichst wenigen Parametern abhängigen Auswertungsmethode. Die Vermessung der Messzellen auf den Chips sollte so erfolgen, dass ohne weitere Referenzmessungen von Laien ein Ergebnis abgelesen werden kann. Die Verteilungsfunktion ist jedoch von der Anzahl der auf der Aufnahme befindlichen Beads und der Anregungsleistung abhängig. Während sich das Problem der Beadabhängigkeit des Mittelwertes über automatische Befüllung der Messzellen lösen lässt, sind gewisse Schwankungen in der Laserleistung, dem Einstrahlungswinkel und in der fokalen Ebene nicht immer zu verhindern.

Unter der Annahme, dass die Laserleistung nur in einem Bereich schwankt, in dem das Fluoreszenzsignal linear von der Anregungsleistung abhängt, wird die Verteilungsfunktion in ihrer Breite schwanken, aber ihre grundsätzliche Form beibehalten. Dieser Effekt kann genutzt werden, um das Signal unabhängig von den absoluten Populationen der Klassen zu machen.

Der statistische Mittelwert (Gl. 3.6) hängt in gleicher Weise von Laserleistung und Beadmenge ab wie der in Gleichung 3.5 aufgestellte.

$$(3.5) \quad \bar{I} = \frac{\sum_{i=1}^n I_i F_i}{\sum_{i=1}^n F_i}$$

Bildet man nun das Verhältnis der beiden Mittelwerte (ratio of means, rom) zueinander (Gl. 3.7), erhält man einen Wert, der deutlich weniger empfindlich gegen Schwankungen in der Laserleistung und der Ausleuchtung ist .

$$(3.6) \quad rom = \left(\frac{\sum_{i=1}^n I_i^2 F_i}{\sum_{i=1}^n F_i} \right)^{1/2} / \left(\frac{\sum_{i=1}^n I_i F_i}{\sum_{i=1}^n F_i} \right)$$

Der rom Wert hat gegenüber der Betrachtung der Verteilungen entsprechend Gleichung 3.5 einen weiteren Vorteil. Wählt man den Ausschnitt des Histogramms, wie in Abbildung 3.9 geschehen, ein wenig größer als die Beadmenge erfordert, zeigen Aufnahmen leerer Beads aufgrund ihrer homogenen Helligkeitsverteilung ein deutliches Maximum bei relativ niedrigen Intensitäten. Der Beginn der Helligkeitsverteilung der Beads ist für leere Beads schärfer von der auslaufenden Helligkeitsverteilung des Hintergrundes abgegrenzt als bei schwach fluoreszierenden Beads. Dadurch nimmt die Besetzung der Klassen im Bereich schwächerer Intensität jenseits des Maximalwertes ab, während die Verteilung schwach positiver Proben aufgrund der breiteren Verteilung mit der Verteilung des Hintergrundes verschwimmen (Abb. 3.10).

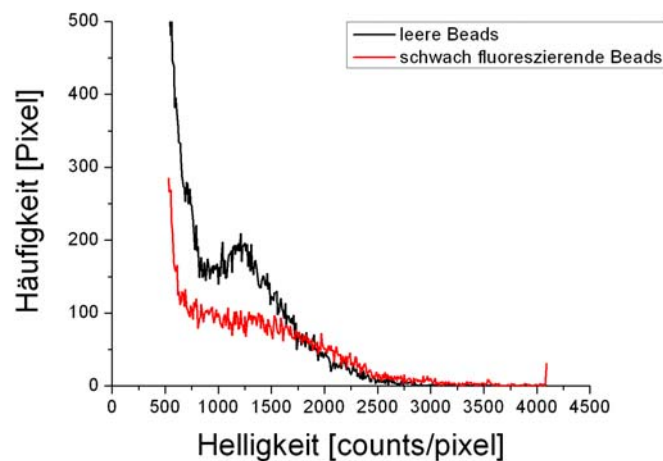


Abb.3.10: Vergleich der Formen der Verteilungen von leeren und schwach fluoreszierenden Beads. Während leere Beads ein Maximum zeigen, verschwimmen die Signale schwach fluoreszierender Beads mit der Hintergrundverteilung.

Während dieses Verhalten keiner der beiden einfachen Mittel aus den Gleichungen 3.5 und 3.6 direkt zu entnehmen ist, ist der rom-Wert der leeren Beads höher als der schwach fluoreszierender Proben. Für Analysen, in denen wie im p53-Nachweis, ohne Positiv-Referenz gemessen werden muss, können jedoch Proben, deren rom-Wert über dem der Beadreferenz liegt eindeutig als positiv bewertet werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Durchführung aller Experimente der vorliegenden Arbeit geschah vor dem Hintergrund, ein optimales Verfahren zum Nachweis verschiedener Proteine aus Blutserum zu entwickeln. Sowohl für den quantitativen Nachweis der Wachstumsfaktoren als auch für die qualitative Detektion von Antikörpern erwies sich ein Assay auf superparamagnetischen Polystyrol-Beads als optimal. Im ersten Teil der Ergebnisse werden Methoden zum Proteinnachweis beschrieben und diskutiert, deren Ergebnisse wichtige Voraussetzungen für die Experimente auf Beads und deren Bewertung darstellen. Während der Durchführung dieser Versuche stellte sich heraus, dass die für den p53-Nachweis verwendeten Peptide empfindlich gegen Zerstörung sind. Dieses Problem wird im Anschluss betrachtet werden. Abschließend sollen die heterogenen Nachweise auf PS-Beads wegen der Ähnlichkeit des Experimentaufbaus unabhängig von der Art des Analyten gemeinsam besprochen werden.

4.1. Nachweis von p53 Antikörpern aus humanem Blutserum in Lösung und an Glasoberflächen

Ziel der Versuchsreihe war die Entwicklung eines zuverlässigen Nachweises von p53-Autoantikörpern im Blutserum von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen. Hierbei sollten die unspezifischen Wechselwirkungen, die als Grund für häufig auftretende positive Reaktion gesunder Seren in ELISA-Nachweisen gesehen werden, vermieden werden. Des Weiteren sollte der zu entwickelnde Assay hochempfindlich und in geringer Zeit kostengünstig durchzuführen sein.

Zur Lösung der Aufgabenstellung wurden verschiedene fluoreszenzmikroskopische Methoden in Bezug auf ihre Sensitivität und ihre Anwendbarkeit in der Praxis untersucht.

4.1.1. Epitopwahl und Ensembleexperimente

Die Auswahl der Epitope

Es wurden kurze Epitope des N- und C- Terminus für die Nachweise verwendet. Die Verwendung des rekombinanten Gesamtproteins p53 als Fängerprotein für den Antikörpernachweis scheidet aus mehreren Gründen aus. Neben den hohen Kosten sind Gesamtproteine aufgrund der vorhandenen Tertiärstruktur deutlich empfindlicher gegen Umwelteinflüsse. Für die durchgeführten FCS-Experimente war es zudem sinnvoll, möglichst kurze Epitope zu verwenden, die sich in ihrer kurzen Diffusionszeit möglichst stark von den Antikörper-Epitop-Komplexen unterscheiden (s. Abschnitt 4.1.2).

Um einen erfolgreichen immunologischen Nachweis zu gewährleisten, ist es notwendig Peptidsequenzen zu wählen, die sich durch eine hohe Bindungsaffinität auszeichnen und bei möglichst niedrigen Antikörperkonzentrationen noch in nachweisbarer Menge Komplexe bilden. Besonders wichtig ist dieses bei der Verwendung kleiner Peptidsequenzen, da die Markierung mit Fluorophoren zu einer merklichen Herabsetzung der Bindungskonstante führen kann. Auch die Spezifität des gewählten Epitopes gegenüber dem zu detektierenden Antikörper muss hoch sein. Nur so können, besonders in komplexen Medien wie Blutserum, ungewünschte Kreuzreaktionen mit anderen Bindungspartnern verhindert werden.

Für die Wahl der verwendeten Epitope wurde eine Studie von Lubin et al. aus dem Jahre 1993 herangezogen [Lubin, Schlichtholz et al. 1993]. In der Studie wurde mittels ELISA eine *Epitopkartierung* der Immunantwort von Patienten mit 11 verschiedenen Krebsarten durchgeführt. Das p53 Protein wurde in 77 15mere mit einer Überschneidung von 10 Aminosäuren geschnitten und die Reaktion der Seren auf diese Epitope aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort auf die beiden hydrophilen, terminalen Domänen generell stärker ist als auf die zentrale DNA-bindende. Zwei Sequenzen der N-terminalen Domäne zeigten eine besonders starke und von der Art der Krebserkrankung unabhängige Reaktion. Sowohl die AS-Sequenzen 11-35 als auch 46-65 enthalten je ein Tryptophan von welchem angenommen wird, dass es eine zentrale Rolle in der Erkennung dieser Epitope durch Antikörper spielt [Neuweiler 2002]. Eine dritte Sequenz, die eine weniger starke Reaktion auslöste, befindet sich C-terminal im Bereich der Aminosäuren AS 365-393 [Lubin, Schlichtholz et al. 1993]. Diese 3 Regionen bildeten die Grundlage für die Epitopwahl.

Zur Entwicklung eines Immunoassays ist die Verwendung monoklonaler Modellsysteme unverzichtbar. In jedem der drei Bereiche wurde eine Sequenz gewählt, für die monoklonale Antikörper erhältlich waren:

Epitop1: SQETFSDLWKLLPEN (AS 15-29)
 Epitop2a: DDLMLSPDDIEQWFT (AS 41-55)
 Epitop3o: SKKGQSTSRH (AS 371-380)

In der Originalsequenz von Epitop 3o (E3o) fehlt ein Tryptophan, welches für Bindungsnachweise über eine Aufhebung der Fluoreszenzlöschung benötigt wird. Es wurde C-terminal angehängt, sodass die verwendete Sequenz von E3 SKKGQSTSRHW ist. Zusätzlich wurde E2a für Oberflächenexperimente in seiner modifizierten Form E2b verwendet. Über (GS)₂-Linker, die den Abstand zur Oberfläche vergrößern und Wechselwirkungen mit ihr verhindern sollen, wurde N-terminal ein Biotin angefügt. Um auch an diesem Peptid eine Farbstoffmarkierung mittels Succinimidylestern zu ermöglichen, wurde über den gleichen Linker C-terminal Lysin angefügt:

Epitop2b: Btn-GSGS-DDLMLSPDDIEQWFT-GSGSK (E2a)

Das Projekt, in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, war ein Kooperationsprojekt mit dem Virchow-Klinikum der Charité in Berlin. In dort durchgeführten Parallelversuchen erzeugte ein weiteres Epitop eine Immunreaktion bei etwa 30% der Krebspatienten [Agaylan, Binder et al. 2007] in einem auf Agglutination beruhenden Nachweis. Im Unterschied zu den anderen verwendeten Peptiden handelt es sich bei Epitop 4a nicht um ein Epitop des unmodifizierten (wildtype) p53, sondern ist an Lysin 320 acetyliert. Diese Acetylierung ist eine posttranslationale Modifikation, wie sie im Körper zur Erhöhung der Bindungsstärke des p53 an die DNA stattfindet [Liu, Scolnick et al. 1999]. Da Epitop 4a nicht fluoreszenzmarkiert verwendet wurde, war das Einfügen eines Tryptophans unnötig:

Epitop4a: SSPQPKKPLDGE, indem K acetyliert ist (AS 314-326) (E4a)

Da seine nicht modifizierte Form E4 in der Epitopkartierung durch Lubin nicht als immunodominant hervortrat, wurde auch diese als Referenz vermessen, um so über die Immunreaktion der Antikörper eventuell Rückschlüsse auf das Vorliegen der acetylierten Form im Körper ziehen zu können.

Epitop4: SSPQPKKKPLDGE (E4)

Ensembleexperimente

Die Epitope 1-3 sollten als Smart Probes mit einer Aufhebung der Löschung der Fluoreszenz des Oxazinfarbstoffs MR121 bei einer Bindung an einen Antikörper reagieren. Um solche Effekte quantifizieren zu können ist es nötig, die Fluoreszenzeigenschaften der farbstoffmarkierten Peptide zu untersuchen.

Tabelle 4.1: Fluoreszenzspektroskopische Ensembleuntersuchung von MR121-markierten p53-Epitopen. λ_{abs} und λ_{em} sind die Absorptions- und Emissionsmaxima, $\Phi_{\text{f,rel}}$, die relative Quantenausbeute und τ_i , die Fluoreszenzlebensdauern mit zugehörigen Amplituden a_i . Die relativen Quantenausbeuten $\Phi_{\text{f,rel}}(\text{mAB})$ und $\Phi_{\text{f,rel}}(\text{kreuz})$ wurden in Gegenwart von vierfachem molarem Überschuss des zugehörigen Antikörpers bzw. eines Kreuzantikörpers (Antikörper ist in Klammern angegeben) gemessen.

	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Phi_{\text{f,rel}}$	τ_1 (ns) (a_1)	τ_2 (ns) (a_2)	$\Phi_{\text{f,rel}}$ mAB	$\Phi_{\text{f,rel}}$ kreuz
MR121	661	673	1,00	--	1,85 (1,00)	---	---
Epitop1	666	683	0,38	0,58 (0,07)	2,09 (0,93)	0,97 (PAb53-12)	0,38 (PAb1801)
Epitop2a	667	683	0,43	0,50 (0,05)	2,04 (0,95)	0,82 (PAb1801)	0,48 (PB53-12)
Epitop2b	666	679	0,26			0,81 (PAb1801)	0,36 (PB53-12)
Epitop3	667	682	0,38	0,38 (0,06)	1,85 (0,94)	0,87 (PAb122)	0,40 (PAb1801)

Die leichte bathochrome Verschiebung der Absorption und der Emission ist auf die unpolare Umgebung des Farbstoffs in Gegenwart der Peptide zurückzuführen. Die Fluoreszenzlebensdauern der markierten Peptide unterscheiden sich im Unterschied zu den stationären Intensitäten kaum von denen des freien Farbstoffes weshalb die verringerte Fluoreszenzquantenausbeute statischer Löschung durch Komplexbildung zugeordnet werden darf. Die Löschung der Fluoreszenz innerhalb der Trp-MR121-Komplexe erfolgt auf einer Pikosekundenzeitskala, sodass diese Komplexe bei der Messung der Lebensdauer mit einer Apparatur mit einer Zeitauflösung von 50 ps als nicht fluoreszierend angesehen werden können [Neuweiler 2002].

Bereits in den Ensembleexperimenten stellte sich heraus, dass ein Teil der verwendeten Peptide ihre Quantenausbeute und ihr Bindungsverhalten im

Zeitraum von Minuten oder Stunden ändern. Dieses wird in Kapitel 4.2 besprochen.

4.1.2. Homogener Bindungsassay mittels FCS

Die Komplexbildungskonstanten der verschiedenen Antikörper-Epitop-Komplexe wurden mittels FCS bestimmt, da die erwarteten hohen Affinitätskonstanten mit Absorptions- und Emissionsmessungen in Küvetten nicht ohne erheblichen Materialeinsatz bestimmbar gewesen wären. Zudem erfolgte die Bestimmung der Bindungskonstanten auf diese Art mit der gleichen Technik, mit der im Anschluss die Serumproben untersucht wurden. Damit konnten mögliche nicht reproduzierbare Einflussgrößen durch eine andere verwendete Messtechnik vermieden werden.

Monoklonale Modellexperimente zur Feststellung von Bindungsstärken und Detektionsgrenzen

Die Bindungskonstanten wurden aus den Diffusionszeiten bestimmt, da eine Bestimmung aus der Löschungskomponente der aufgenommenen Kurve ungenauer ist. Da kurze Korrelationszeiten weniger häufig auftreten als lange sind die in der Kurve aufgetragenen Funktionswerte $G(t)$ grundsätzlich mit einem größeren Fehler behaftet je kürzer der Zeitabstand der korrelierten Signale ist. Daher sind Bewertungen auf Grundlage der Diffusionszeit vorzuziehen (Abb. 4.1).

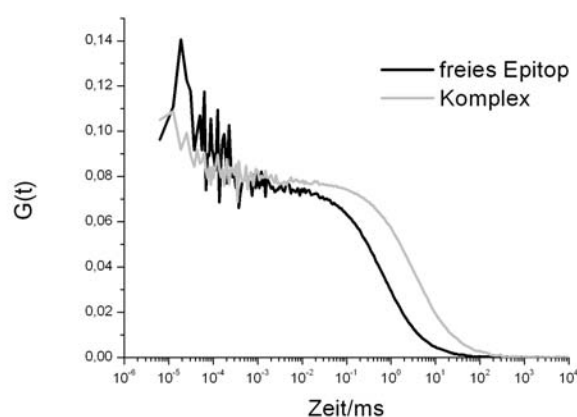


Abb. 4.1: Autokorrelationsgraphen des freien Epitops (schwarz) und des Immunkomplexes (grau). Die Komplexbildung lässt sich über eine Verlängerung der Diffusionszeiten, die im Bereich von Millisekunden liegen, nachweisen. Die Veränderung der Amplitude im Bereich bis einer Mikrosekunde, die Auskunft über den Anteil von im gelöschten Zustand vorliegenden Epitopmolekülen gibt, ist stark verrauscht und für genaue quantitative Aussagen über das System nur bedingt geeignet.

Zunächst wird die Stelle der Korrelationsfunktion ermittelt, an die auf der Nanosekundenzeitskala stattfindende Konformationsänderung des Peptids keinen Beitrag zum Signal mehr liefert. Die Kurve wird an dieser Stelle abgeschnitten und auf eins normiert. Unter der Annahme dass der Antikörper in einer $1 \cdot 10^{-9}$ M Lösung von Farbstoff nicht signifikant zum Signal beiträgt, können die Bindungsverhältnisse auf diese Art ohne Berücksichtigung der absoluten Konzentrationen beschrieben werden. Mit Gleichung 3.3 kann durch Titration des Antikörpers gegen eine $1 \cdot 10^{-9}$ M Lösung des jeweiligen Epitopes der Anteil von gebundenem Epitop bestimmt werden. Eine Auftragung dieser Anteile gegen die vorgelegte Antikörperkonzentration liefert die in Abbildung 4.2 dargestellten Kurven, an deren Wendestellen die Dissoziationskonstante ist. Die beschriebenen Bindungskonstanten sind reziprok zu ihnen.

Auf diesem Weg konnten die Komplexbildungskonstanten als $2,0 \cdot 10^{10} \pm 1,5 \cdot 10^9$ M^{-1} (Epitop 1), $4,2 \cdot 10^9 \pm 5,3 \cdot 10^7$ M^{-1} (Epitop 2a) und $1,4 \cdot 10^9 \pm 5,3 \cdot 10^7$ M^{-1} (Epitop 3) bestimmt werden. Für Epitop 4a entfiel die Bestimmung der Bindungskonstante, da kein entsprechender monoklonaler Modellantikörper existiert.

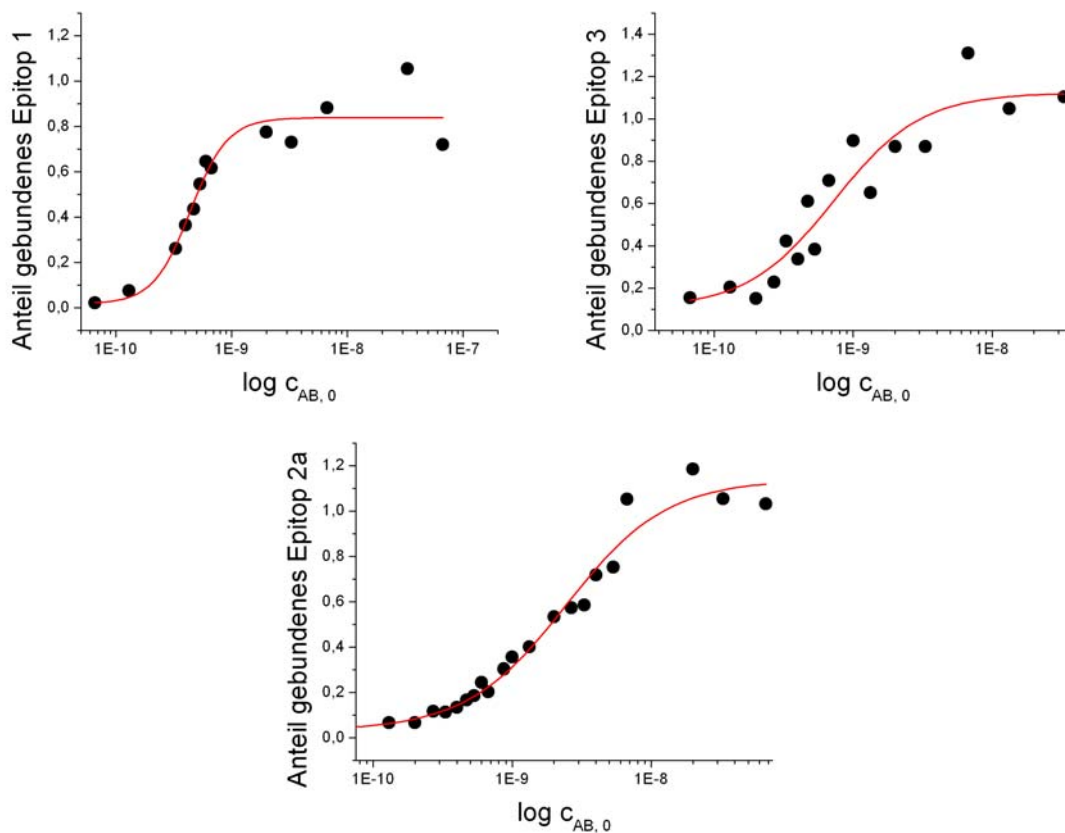


Abb. 4.2: Graphen der Titrations zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten

Als Vorversuch zu heterogenen Immunoassays wurde auch für Epitop 2b eine Titration durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, wie sich die Bindungskonstante von Epitop 2 durch die zusätzlichen Aminosäuren und das Biotin ändert. Selbst bei einem Antikörperüberschuss von 60:1 gegenüber dem Epitop konnte jedoch nur ein zehntel der Epitope als Komplex nachgewiesen werden.

Homogener Nachweis von p53 Autoantikörpern aus menschlichem Blutserum

Lubin konnte mit einem ELISA durch enzymatische Verstärkung des Signals eine positive Reaktion von Krebsseren auf einzelne Epitope des p53-Proteins nachweisen [Lubin, Schlichtholz et al. 1993]. Zielsetzung der Versuche zum Nachweis von Antikörpern gegen die oben beschriebenen Epitope durch FCS war zu zeigen, dass ein solcher Nachweis auch ohne Aufreinigung der Probe, Waschschrirte oder enzymatische Signalverstärkung möglich ist. Des Weiteren sollte der Einfluss der Störung durch Bestandteile des Serums beurteilt werden. Im Folgenden werden Seren, die gesunden Blutspendern entnommen werden als Spenderseren (gekennzeichnet mit „S“), solche von Krebspatienten als Krebsseren („K“) bezeichnet.

Die stärkste Störung des Nachweises aus Blutseren wird von Bilirubin hervorgerufen. Dieses gelbe Abbauprodukt des Häm-Komplexes hat mit einem Extinktionskoeffizienten von $53\,846\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bei 460 nm eine starke Absorption mit einer breiten Bande, die bis weit über 500 nm reicht [Agati und Fusi 1990].

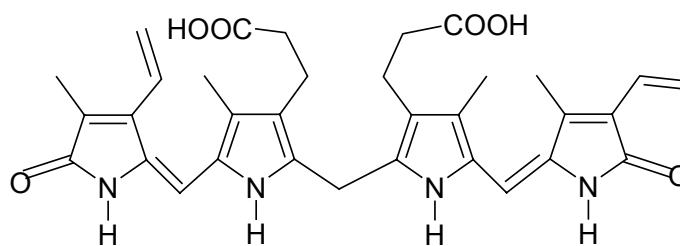


Abb.4.3: Chemische Struktur von Bilirubin

Mit einer Quantenausbeute von 0,1 emittiert es bis in Bereiche jenseits von 640 nm [Cu, Bellah et al. 1975], die jedoch verstärkt ist, da Bilirubin im Serum einen stärker fluoreszierenden Komplex mit Albumin bildet, um das in ungebundenem Zustand wasserunlösliche freie Molekül in Lösung zu halten [Athar, Ahmad et al. 1999]. Mit $21\ \mu\text{M}$ [Löffler, Petrides et al. 2003] liegt seine normale Serumkonzentration bereits um mehrere Größenordnungen über der zur Messung

verwendeten Konzentration des Epitops. Diese Konzentration kann durch Zerstörung von Erythrozyten bei der Serengewinnung weiter ansteigen.

Die residuelle Fluoreszenz von Bilirubin und anderen Komponenten bei 633 nm erwies sich als so ausgeprägt, dass eine Bestimmung der Diffusionszeiten der markierten Peptide nicht ohne eine Verdünnung des Serums möglich war. Zur Bestimmung der optimalen Serumverdünnung wurden die Diffusionszeiten verschiedener Verdünnungen des Spenderserums S33 sowie Verdünnungen des Serums mit Zusatz von $1 \cdot 10^{-10}$ M Epitop 2 aufgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 4.4).

Abbildung 4.4 zeigt, dass erst bei einer Verdünnung des Serums von 1:100 die Fluoreszenz einer $1 \cdot 10^{-10}$ M Epitopkonzentration den überwiegenden Beitrag des Fluoreszenzsignals ausmacht. Diese Konzentrationsverhältnisse sind für die Versuche zum Antikörpernachweis übernommen worden.

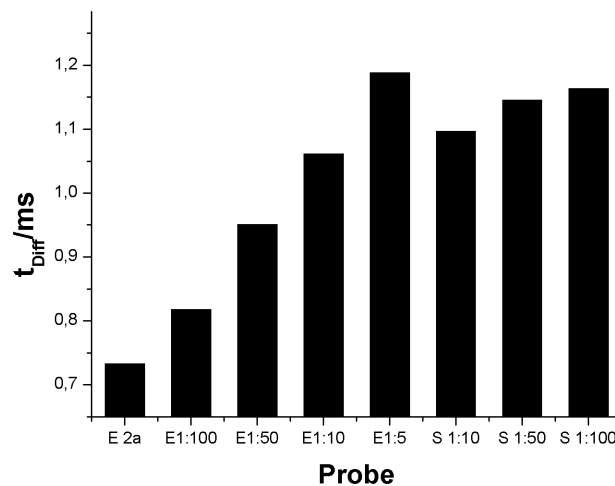


Abb. 4.4: Diffusionszeiten verschiedener Proben. Serumverdünnungen, denen Epitop zugesetzt wurde, sind mit E, reine Serenverdünnungen mit S gekennzeichnet. Im Anschluss ist die Epitopverdünnung angegeben. Von links nach rechts: das reine Epitop (E2a), $1 \cdot 10^{-10}$ M konzentriertes Epitop in verschiedenen Serumverdünnungen (E1:100 bis E1:5) und Verdünnungen des Spenderserums S33 (S1:10 und S1:100)

Die Aufnahme von Korrelationskurven verschiedener 1:100 Verdünnungen von Seren zeigte, dass die mittlere Diffusionszeit ihrer Komponenten stark schwankt. Der Vergleich der Diffusionszeiten der reinen, verdünnten Seren mit den Signalen, die bei Epitopzugabe erhalten werden zeigt, dass diese Schwankungen bei Mischung mit dem Epitop moderat werden:

Tabelle 4.2: Standardabweichungen der Diffusionszeiten für Seren-Epitop-Gemische

	Probengröße	Mittlere Diffusionszeit $\langle \tau_{Diff} \rangle$ in ms	Standardabweichung σ in ms
Serenverdünnung	10	1,105	0,231 (20,9%)
Epitop1	13	0,734	0,033 (0,5%)
Epitop2a	13	0,774	0,063 (0,8%)

Die hierbei erhaltenen Abweichungen sind deutlich größer als die anderen reproduzierbaren Messfehler. Daher wurde die durch den Sereneinfluss erhaltene Standardabweichung als Fehler für die Diffusionszeitbestimmung des Antikörpernachweises mittels FCS angenommen.

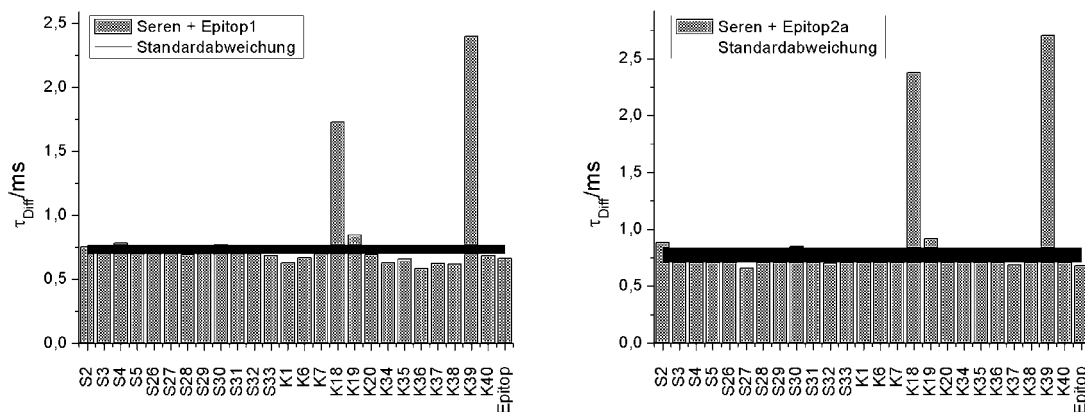


Abb. 4.5: Diffusionszeiten der Epitope 1 (links) und 2a (rechts) nach Inkubation mit 1:100 Verdünnungen verschiedener Spender (S)- und Krebsseren (K)

Abbildung 4.5 zeigt die Diffusionszeiten verschiedener Seren von Blutspendern (S) und Patienten mit diagnostizierter Krebserkrankung (K) gegenüber den Epitopen 1 und 2a sowie den Bereich der einfachen Standardabweichung σ . Für Epitop 3 konnten aufgrund seiner schnellen Zersetzung (s. Kapitel 4.2) keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Die Zugabe der Seren K18 und K39 zu den Epitopen führt zu stark verlängerten Diffusionszeiten. Für Serum K19 ist eine Zuordnung nicht eindeutig möglich. Unter der Annahme, dass die Diffusionszeiten von Seren normalverteilt sind, kann seine Reaktion auf Epitop 1 mit 99,7% (3σ) Wahrscheinlichkeit als positiv bewertet werden, da es mit der Diffusionszeit von 0,848 ms außerhalb des Intervalls $\overline{\tau_{Diff}} + 3\sigma = 0,833$ ms liegt, während sie für Epitop 2a darin liegt. Spenderseren können oberhalb des Intervalls 3σ nicht gefunden werden.

Ein qualitativer Nachweis von Antikörpern aus Blut in einem Reaktionsschritt und ohne enzymatische Signalverstärkung ist demzufolge prinzipiell möglich.

Eine Bestimmung absoluter Antikörpertiter ist mit dieser Methode nicht möglich. Neben der Unsicherheit, die durch den Einfluss des Serums in die Messung getragen wird, wird ausschließlich die Reaktion polyklonaler Antikörper unbekannter Komplexbildungskonstanten auf ein kurzes Segment der Gesamtproteins p53 beobachtet. Das Verhalten eines Serums gegenüber einem Epitop lässt keine Rückschlüsse über das Vorhandensein von Antikörpern gegen andere Regionen des p53 Proteins zu.

Es ist jedoch möglich die Detektionsgrenze des Nachweises abzuschätzen. Bei Betrachtung der in den Modellexperimenten ermittelten Abhängigkeit der Diffusionszeit vom Anteil an gebundenem Epitop, kann mit den ermittelten Fehlern und der bekannten Epitopkonzentration eine untere Detektionsgrenze für optimalen Versuchsverlauf angenähert werden.

Der Anstieg der Diffusionszeit mit steigendem Bindungsanteil bei der Titration des monoklonalen Antikörpers kann für kleine Anteile gebundenen Epitopes linear angenähert werden. Für einen Bindungsanteil von 0 bis 20% ergibt sich für Epitop 2a die Gleichung der Regressionsgerade als $\tau_{Diff} = 5,31 \cdot A + 0,64$. Durch Einsetzen der Summe aus Diffusionszeit des freien Epitopes im monoklonalen Experiment und der dreifachen Standardabweichung in die Diffusionszeit kann der minimale nachweisbare Anteil A an gebundenem Epitop mit 3,6 % angegeben werden, was bei einer $1 \cdot 10^{-10}$ M Epitoplösung einer $3,6 \cdot 10^{-12}$ M Komplexlösung entspricht. Durch Einsetzen der im monoklonalen Experiment bestimmten Bindungskonstanten K_a , der minimal nachweisbaren Komplexkonzentration $[AB]$ und der nach Komplexbildung frei in Lösung verbleibenden Epitopmoleküle $[A] = [A]_0 - [AB]$ in das Massenwirkungsgesetz

$$(4.1) \quad K_a = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

ergeben sich die minimal nachweisbaren Antikörperkonzentrationen $[B/2]_0 = [B/2] + [AB]$ als $6,7 \cdot 10^{-10}$ M (E1), $3,2 \cdot 10^{-9}$ M (E2a) und $9,6 \cdot 10^{-9}$ M (E3).

Die typischen Bindungskonstanten von Antikörpern liegen im Bereich von $1 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$, ihre typischen Konzentrationen bei 10^{-7} bis 10^{-12} M . Somit bleiben bereits Antikörper mittlerer Affinität und mittlerer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Zum sicheren Nachweis von p53-Autoantikörpern aus Blutserum ist die Methode nicht ausreichend empfindlich. Versuche zur Aufreinigung der Seren und der Aufkonzentrierung der in ihnen enthaltenen IgG-Moleküle mittels Immunpräzipitation auf Protein G-Sepharose schlugen fehl. In auf diesem Weg aufgereinigten, bereits als positiv nachgewiesenen Proben konnte die vorher gemessene Diffusionszeitverlängerung nicht mehr festgestellt werden.

Vergleich des Verhaltens von Epitop2a und 2b

Die fehlende Sensitivität sollte durch eine heterogene Versuchsführung erhöht werden. Das Aufbringen der Epitope auf Oberflächen sollte über Streptavidin-Biotin-Bindungen oder kovalent erfolgen. Um Wechselwirkungen der für die Antikörperbindung nötigen Aminosäuren mit den Oberflächen zu vermindern wurde Epitop 2a an beide Termini eine $(\text{GS})_2$ -Sequenz eingefügt. Da das Biotin produktionsbedingt N-terminal angebracht wurde, wurde C-terminal ein zusätzliches Lysin für die Farbstoffmarkierung angebracht werden. Die Eigenschaften von Epitop 2a und seinem verlängerten Derivat Epitop 2b wurden über eine Bestimmung ihrer Diffusionszeiten in Gegenwart gleicher Krebspatientenseren verglichen.

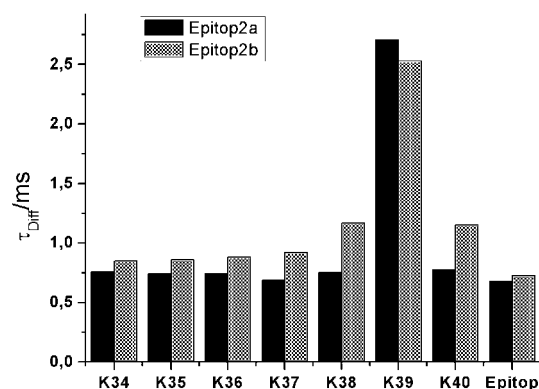


Abb. 4.6: Reaktion verschiedener Krebsseren auf die Epitope 2a und 2b.

Grundsätzlich reagieren die Peptide gleich auf humane Seren. Epitop 2b reagiert auf Serum K39 ähnlich gut wie 2a. Eine bessere Reaktion auf K38 und K40 ist wahrscheinlich, im homogenen Assay jedoch nicht eindeutig nachweisbar.

4.1.3. Heterogener Nachweis an modifizierten Glasoberflächen

Die Nachweisgrenze des homogenen Verfahrens ist limitiert durch das Verhältnis von freien zu gebundenen Epitopen und durch jenes des Hintergrundsignals aus dem Serum zum Fluoreszenzsignal des Farbstoffes. Eine Senkung der Detektorkonzentration zur Erhöhung des Anteils an gebundenem Epitop ist im monoklonalen Experiment nicht möglich, da diese zu einer Verminderung des Signals führen würde. Umgekehrt führt eine stärkere Verdünnung des Serums zu einer Verschiebung des Komplexgleichgewichtes auf die Seite der freien Epitope.

Beides kann durch die Umstellung auf heterogene Nachweisführung umgangen werden. Vorteil dieser Methode ist die starke Einschränkung des Aufenthaltsortes der Epitope. Durch die Fixierung auf Trägermaterialien kann die Detektion des Signals an Stellen erfolgen, an denen die Epitopkonzentration deutlich erhöht gegenüber anderen Stellen der Probe ist. Auch die Empfindlichkeit wird erhöht, da die hohe lokale Konzentration des Epitops das Bindungsgleichgewicht auf Seite des Immunkomplexes verschiebt.

Monoklonale Modellexperimente mittels interner Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie

Die Glasoberflächen wurden mit Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) gegen unspezifische Wechselwirkungen der Epitope mit dem Glas behandelt und die Fixierung der Epitopmoleküle über Streptavidin-Biotin-Bindungen vorgenommen. Es wurde ein zweischichtiger Aufbau des Nachweises unter Verwendung von Smart Probes gewählt. Vorteil dieser Methode gegenüber einem Nachweis über ein zusätzlich angebrachtes Detektormolekül ist die leichte Unterscheidbarkeit zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung. Spezifisch über eine Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung an der Oberfläche gebundene Epitope erhöhen bei Antikörperzugabe ihre Emission während unspezifisch an die Oberfläche gebundene Epitope bereits vor einer Bindung durch Wechselwirkung mit der Oberfläche stark fluoreszieren. Unspezifisch gebundene Antikörper stören daher bei dieser Technik nicht den Nachweis.

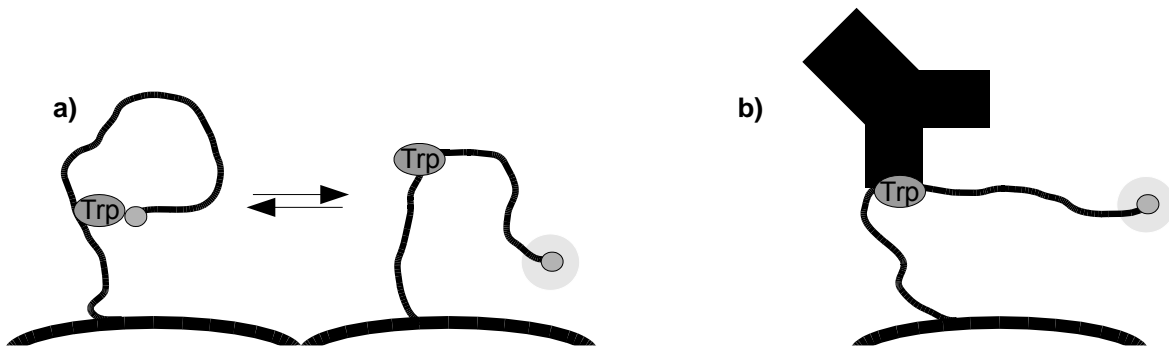


Abb. 4.7: a) Die über Biotin-Streptavidin-Bindung auf der Oberfläche angebrachten Epitope zeigen durch das Gleichgewicht aus gelöschten und nicht gelöschten Epitopen eine verminderte Quantenausbeute. b) Der Antikörper fixiert das Tryptophan in der Bindungstasche, ein Kontakt zwischen diesem und dem Farbstoff ist nicht möglich. Die Probe emittiert mit maximaler Fluoreszenzintensität.

Die modifizierte Glasoberfläche stellt nicht nur den Träger der Epitope, sondern auch die Phasengrenzfläche zur Probe dar. So kann die Anregung in dieser Methode über das evaneszente Feld des totalreflektierten Laserstrahls erfolgen und das Hintergrundsignal deutlich reduziert werden. Die Aufnahme von Bildern vor und nach der Inkubation mit dem Modellantikörper zeigt die Zunahme der Spots mit hoher Signalstärke:

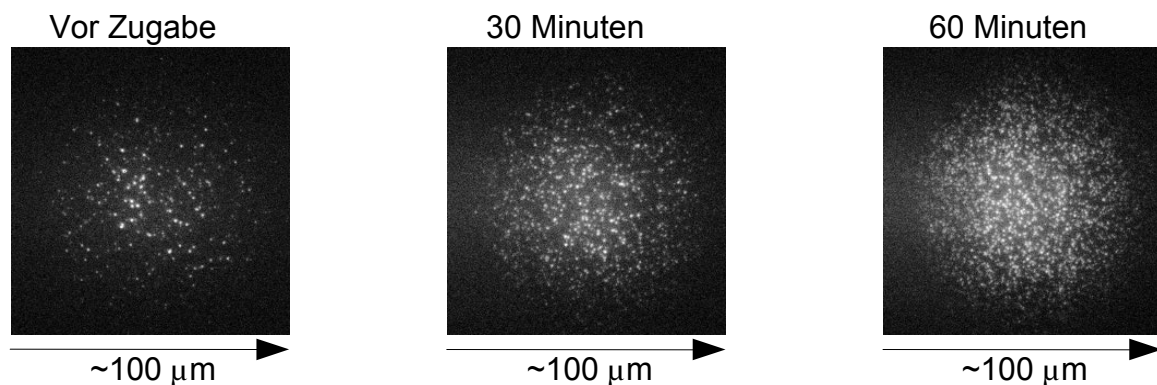


Abb. 4.8: Auf gleiche minimale und maximale Intensitäten normierte Aufnahmen der Oberfläche vor und nach Zugabe einer $1 \cdot 10^{-10}$ M Antikörperlösung zu Epitop 2b.

Die Betrachtung einzelner Intensitätsspuren von Spots während des Bindungsvorgangs bestätigt die Ergebnisse der Ensemblemessungen aus Kapitel 4.1.1.

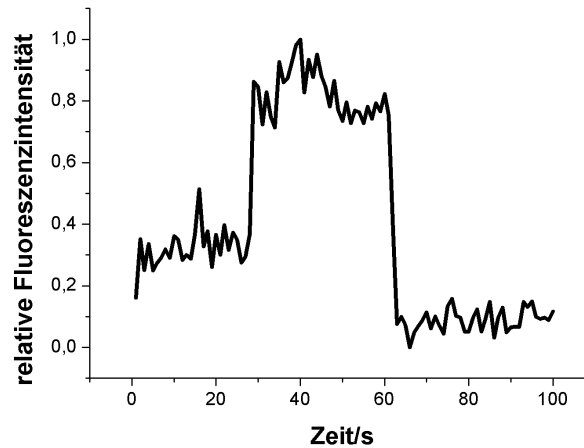


Abb. 4.9: Typischer Intensitätsverlauf eines spezifisch an die Oberfläche gebundenen Moleküls E2a während des Bindungsvorgangs. Vor der Bindung emittiert das Epitop vermindert. Die Bindung des Antikörpers bei etwa 30 s führt zu einem starken Anstieg der Emission, der bis zum Zeitpunkt der Fotozerstörung bei etwa 60 s erhalten bleibt.

Die Betrachtung der Epitopfluoreszenz einzelner Moleküle über den Zeitraum der Antikörperbindung hinweg zeigt die Effizienz dieser Methode. Nach Normierung der maximalen Emission auf 1 kann der typische Verlauf des Fluoreszenzverhaltens Abbildung 4.9 entnommen werden. Vor der Bindung wird eine verminderte Fluoreszenzquantenausbeute im Bereich der im Ensembleausbeuten aufgenommen. Bei Antikörperbindung steigt diese auf ihren Maximalwert, bis der Farbstoff zerstört wird und die Fluoreszenz auf den Hintergrundwert sinkt.

Eine Standardisierung des vorgestellten Verfahrens gestaltet sich schwierig. Kritisch ist die gleichmäßige Besetzung der Glasoberfläche mit Streptavidin. Eine konstante Besetzungsdichte ist schwer zu erreichen und eventuelle Unterschiede zwischen einzelnen Proben sind erst während des Experimentes zu sehen. Daher wurden zur Feststellung der Antikörperbindung nicht die Aufnahmen verschiedener Proben miteinander verglichen. Der Bindungsnachweis erfolgt über den Vergleich derselben Aufnahme vor und nach der Antikörperbindung.

Die bereits in den Experimenten in Lösung beobachtete Zersetzung der Epitope erwies sich im Oberflächenexperiment als deutlich stärker. Da die Auswertung der Aufnahmen über einen Vergleich der Proben vor und nach der Antikörperzugabe voraus setzt, dass die Fluoreszenz der spezifisch gebundenen Epitope gelöscht ist, stellt die Löschungsaufhebung durch die Zerstörung des Tryptophans ein erhebliches Problem dar. Der Anteil unspezifisch gebundener Epitopmoleküle an der Oberfläche verändert sich mit der stark schwankenden Besetzung der Oberflächen. Daher ist es nicht möglich, bereits zerstörte Peptide von unspezifisch

an die Oberfläche gebundenen über die Anzahl der zu Beginn der Messung aufgenommenen Signale zu unterscheiden. Verändert sich die Probe nach Zugabe eines humanen Blutserums unbekanntem Titer nicht, kann eine negative Reaktion nicht von einer bereits vor dem Nachweis zerstörten Probe unterschieden werden.

Da es nicht gelang diesen Vorgang zu kontrollieren (s. Kapitel 4.2) wurde die Versuchsreihe mit dem Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit beendet.

4.1.4. Diskussion der homogenen Experimente und der Versuche auf Glasoberflächen

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass ein Nachweis von p53 Antikörpern durch die ausgewählten Epitope möglich ist. Sowohl die monoklonale Versuchsführung als auch die Untersuchung von Blutseren liefern aussagekräftige Ergebnisse. Die Quantifizierung der Bindungsstärke ist aufgrund der Peptidersetzung jedoch nur eingeschränkt möglich. Während die Messpunkte der Titrationskurven für Epitop 1 und 2a auf den ersten Blick nah an der erwarteten Kurve liegen zeigt Epitop 3 bereits in der Abbildung 4.2 deutliche Abweichungen vom erwarteten Verhalten.

Scatchardauftragungen von Titrationskurven entsprechend Gleichung 2.5 geben die Bindungskonstante ungenauer an, liefern aber deutlichere Aussagen über das Bindungsverhalten der Antikörper. So kann über diese Auftragung eine Aussage über die Genauigkeit der ermittelten Bindungskonstanten gemacht werden. Abbildung 4.10 ist die Scatchardauftragung der Titrationskurven aus Abbildung 4.2. Sie zeigt für Epitop 2a den typischen Titrationsverlauf für einen Antikörper, dessen Bindungsstellen eine über den gesamten Titrationsverlauf konstante Anzahl unabhängiger Bindungsstellen gleicher Bindungskonstante zum Epitop aufweisen. Der Verlauf für Epitop 1 weist jedoch eine deutliche Abweichung vom ideal linearen Verhalten auf. Im Allgemeinen wird ein solcher Kurvenverlauf mit einer Hemmung der zweiten Bindungsstelle des Antikörpers durch Bindung der ersten interpretiert. Davon wird allerdings in diesem Fall nicht ausgegangen. Die Proben wurden gemeinsam vorbereitet und nacheinander vermessen, so dass etwa 2 h zwischen der ersten und der letzten Messung vergingen.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2 kann davon ausgegangen werden, dass sich nicht die Bindungsaffinität des Antikörpers verändert, sondern

die Konzentration der noch zu einer Bindung fähigen Epitopmoleküle gesunken ist. Noch deutlicher ist die Abweichung vom idealen Verhalten bei Epitop 3. Die Streuung der Werte ist erheblich. Absolute Aussagen zur Bindungsstärke der verwendeten monoklonalen Antikörper können daher nicht gemacht werden. Während die Bindungskonstante für Epitop 2a recht genau ist, werden jene für die Epitope 1 und 3 deutlich über dem ermittelten Wert liegen.

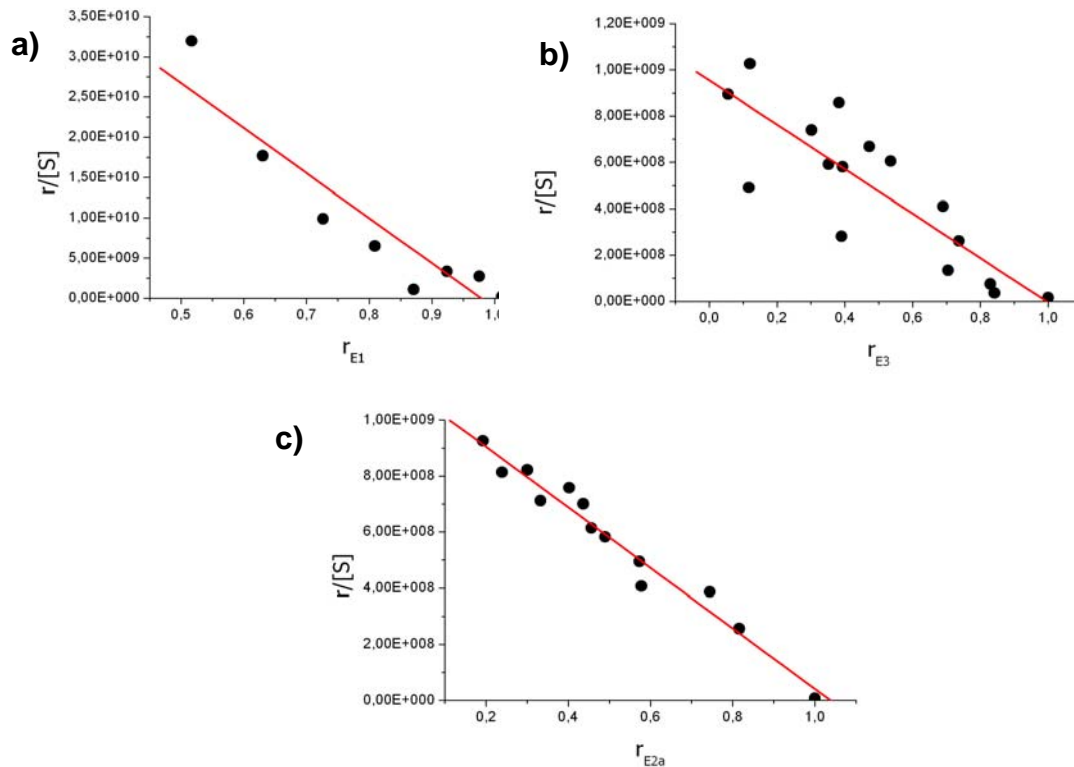


Abb. 4.10: Scatchardauftragungen der Titrationskurven aus Abb. 4.2. a) Epitop 1, b) Epitop 3, c) Epitop 2a. Nur Epitop 2a zeigt einen deutlichen, linearen Funktionsverlauf.

Der durchgeführte homogene Nachweis stellt die einfachste Möglichkeit dar eine Immunreaktion aufzuzeigen. Analytlösung und Detektor werden zusammengebracht, eine eventuell erfolgte Bildung von Immunkomplexen kann nach der Inkubationszeit ohne weitere Arbeitsschritte direkt gemessen werden. So kann eine Aussage über das Vorhandensein eines Antikörpers sehr schnell und sicher gemacht werden.

Durch die fehlende Möglichkeit das Signal an wenigen Stellen der Probe aufzukonzentrieren ist die Sensitivität des Antikörpernachweises immer auf Konzentrationsbereiche bis in die Region der Bindungskonstante beschränkt. Obwohl die Sensitivität des homogenen Assays nicht ausreicht für den Nachweis von p53 Antikörpern, zeigen die Experimente, dass das Verfahren grundsätzlich für immunologische Nachweise geeignet ist.

Deutlich höhere Sensitivitäten sind von dem vorgestellten heterogenen Nachweis zu erwarten, da der Großteil der gebildeten Immunokomplexe an der Oberfläche fixiert und daher detektierbar ist. Problematisch ist neben der Degenerierung der Peptide im Fall des p53 Nachweises vor allem die unter Laborbedingungen schwer kontrollierbare Dichte der Proben. Die Herstellung gleichmäßiger Oberflächen würde den Einsatz hoher Materialmengen erfordern um die Wäge- und Pipettierfehler der benötigten kleinen Mengen zu reduzieren. Wie in Kapitel 4.3 dargestellt werden wird, ist die Belegung von PS-Beads spezifischer und reproduzierbarer, da die kritische Belegung mit Streptavidin bereits industriell vorgenommen wurde. Daher ist ein Nachweis über Beads für die Laboranwendung einem Oberflächenexperiment vorzuziehen.

4.2. Untersuchungen zu Löschungs- und Bindungsverlust der Epitope durch Zersetzung der Peptide

4.2.1. Betrachtung des Einflusses verschiedener Faktoren auf Fluoreszenzlöschungs- und Bindungsverlust

In allen vorgestellten Experimenten wurde ein Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute der Epitope mit der Zeit festgestellt, ohne dass ihnen Reaktionspartner für eine Komplexbildung zugeführt wurden. Um dieses Verhalten besser zu verstehen wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Einfluss der Temperatur auf die Epitoplöschung

Bereits während der Emissionsmessungen relativ hoher Konzentrationen ($\sim 1 \cdot 10^{-7}$ M) der Epitope 1 und 3 konnte festgestellt werden, dass das Fluoreszenzsignal der gelöschten Peptide nicht konstant bleibt. Ohne Veränderungen der Probenzusammensetzung stieg die Fluoreszenzintensität der Proben über die Zeit. Abbildung 4.11 zeigt das Fluoreszenzverhalten von Epitop 2a und Epitop 1 im Verhältnis zur Farbstoffreferenz:

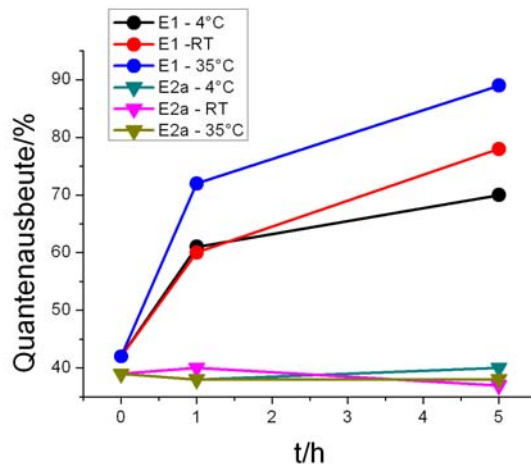


Abb. 4.11: Abhängigkeit von Temperatur und Entlöschung von Epitop 1 und 2a. Während die Fluoreszenzlöschung von Epitop 2a konstant ist, steigt diejenige von Epitop 1 in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur an.

Während die Fluoreszenzlöschung von Epitop 2a über den beobachteten Zeitraum hinweg konstant blieb, kam es für Epitop 1 zu einer zeitabhängigen Aufhebung der Fluoreszenzlöschung. Es wurden Versuche unternommen, eine Geschwindigkeitskonstante für diesen Prozess zu ermitteln. Hierzu durchgeführte Experimente bei verschiedenen Temperaturen konnten qualitativ die Aussage des in Abbildung 4.11 dargestellten Verhaltens bestätigen. Es wurde allerdings festgestellt, dass die Geschwindigkeiten, mit denen diese Prozesse ablaufen unabhängig von der Peptidkonzentration stark schwankten.

Einfluss der Sauerstoffkonzentration der Lösung auf die Peptidlöschung

Da keine direkte Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Peptidkonzentration gefunden wurde, ist es naheliegend, dass Bestandteile von Epitop 1 gegenüber anderen Komponenten der Lösung ein von Epitop 2a abweichendes Verhalten zeigen.

Eine Beteiligung von Sauerstoff an einem solchen Prozess ist wahrscheinlich. Die Wechselwirkung seines reaktiven angeregten Singulettzustandes $^1\text{O}_2$ mit den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Methionin und Cystein ist seit langem bekannt und immer wieder untersucht worden [Holt, Milligan et al. 1977; Michaeli und Feitelson 1994; Michaeli und Feitelson 1995; Simat und Steinhart 1998]. Hierbei wirken die genannten Aminosäuren als Quencher des Singulettzustandes, die als Folge des wahrscheinlich über einen Exciplex verlaufenden Prozesses oxidiert werden [Michaeli und Feitelson 1994]. Da Tryptophan in Epitop 1 als einzige der oben genannten Aminosäuren vorkommt und es gleichzeitig für die

Farbstofflöschung verantwortlich ist, wurde als Arbeitshypothese angenommen, dass es sich bei den beobachteten Vorgängen um eine Oxidation des Tryptophans handelt.

Obwohl sich die Gesamtkonzentration des Sauerstoffs in wässrigen Lösungen leicht berechnen lässt³, ist die Bestimmung des Anteils an Singulett-Sauerstoff schwierig. Eine direkte Anregung über Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen ist spinverboten. Daher muss die Anregung auf den 0,98 eV höher gelegenen Singulettzustand über eine zusätzliche Kollision mit einem Molekül oder direkt über Kollision mit angeregten Molekülen erfolgen [Merkel und Kearns 1972]. Da solche Vorgänge in Makromolekülen wie z.B. die hier betrachteten Peptide komplex sein können, wurde zunächst qualitativ der Einfluss der Gesamtsauerstoffkonzentration auf die Epitopfluoreszenz betrachtet.

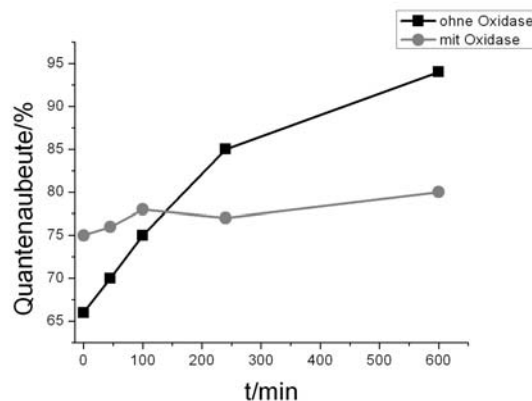


Abb. 4.12: Durch enzymatische Entfernung von Sauerstoff konnte die Zerstörung von Epitop 1 deutlich verlangsamt werden.

Die gemessenen Werte der Kurve liegen mit 65-94% Quantenausbeute ohne Oxidasezugabe und mit 76-80% Quantenausbeute relativ zu freiem MR121 sehr hoch. Der Grund hierfür liegt in der für ein Funktionieren der Oxidase nötigen Pufferzusammensetzung. Um ein reduzierendes Medium zu erhalten wird ihm β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Diese unterdrücken jedoch die Komplexbildung zwischen Tryptophan und Farbstoff, was zu einem Anstieg der Quantenausbeute führt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden die Reagenzien beiden Proben in gleicher Menge zugesetzt.

Es wurden Versuche durchgeführt, in denen der Sauerstoff durch Sättigung der Lösung mit den inerten Gasen Stickstoff und Argon ausgetrieben wurde. Auch in diesen Experimenten wurde eine Verringerung der Entlöschung beobachtet, die

³ mit einem Partialdruck von 0,212 bar kann die Gleichgewichtskonzentration von Sauerstoff in Wasser bei 278 K nach dem Gesetz von Henry mit $4,77 \cdot 10^{-3}$ mol angegeben werden.

jedoch im Vergleich zur enzymatischen Sauerstoffentfernung weniger ausgeprägt war. Der Einfluss des Sauerstoffs auf die Peptidzersetzung ist gut zu verfolgen, obwohl quantitative Aussagen über ihren Verlauf auf diesem Weg nicht erhalten werden konnten.

Bindungsverhalten der Epitope nach dem Lösungsverlust

Die Experimente in Kapitel 4.1 deuten darauf hin, dass mit einem Verlust der Fluoreszenzlöschung ein Verlust der Bindungsfähigkeit der Epitope einhergeht. Bei einer Bindung mit dem Antikörper sind die bindungsrelevanten Aminosäuren vom Antikörper umgeben. Ihr Kontakt zu Farbstoff und Probenlösung wird minimiert, was sich in einer Senkung der von der Peptidlöschung hervorgerufenen Amplitude auf der Mikrosekunden-Zeitskala der FCS-Kurven widerspiegelt (s. Abbildung 4.1). Bei einer Änderung in der chemischen Struktur geht die Löschung hingegen vollständig verloren.

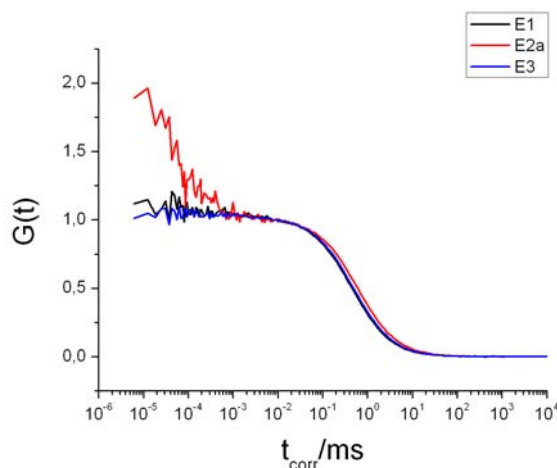


Abb. 4.13: Fluoreszenzverhalten $1 \cdot 10^{-10}$ M Lösungen der Epitope 1, 2a und 3 nach 20stündiger Lagerung bei Raumtemperatur. Während Epitop 2 noch intakt ist, kann bei Epitop 1 und 3 keine Löschung mehr festgestellt werden.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem Lösungsverlust tatsächlich um einen Prozess handelt, an dem neben Sauerstoff und Farbstoff auch die Aminosäuren der Peptide beteiligt sind, wurden Lösungen der freien Epitope (Abb.4.13) und Lösungen mit an Antikörper gebundenen Epitopen nach 20 Stunden Lagerung bei RT untersucht. Während Epitop 2a in dieser Zeit keine messbare Änderung in seinem Fluoreszenzverhalten zeigte, war die Löschung der Epitope 1 und 3 vollständig aufgehoben (Abb. 4.13).

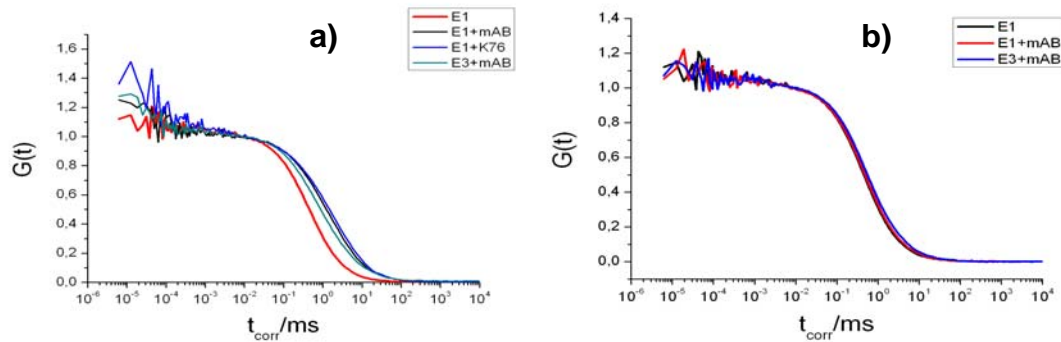


Abb.4.13: a) Zugabe des Antikörpers zu frischem Epitop und anschließende 20stündige Inkubation. Während das freie Epitop zerstört ist, ist der Immunkomplex stabil. b) wird der Antikörper zu bereits fluoreszenzextlöschten Epitopen gegeben, findet keine Bindung mehr statt.

Die Bindungsuntersuchung von Epitop 1 verläuft wie erwartet. Ein an intaktes Epitop koordinierter Antikörper schützt die Aminosäuren. Die Komplexbindung bleibt über einen langen Zeitraum stabil. Noch nach 20 Stunden zeigt das in freiem Zustand empfindliche Peptid sowohl in Anwesenheit des positiven Serums K76 als auch in Gegenwart seines monoklonalen Antikörpers die verlängerte Diffusionszeit des Komplexes und die schwache Restamplitude im Mikro- bis Nanosekundenbereich. Zugabe von Antikörper zu bereits entlöschten Molekülen führt zu keiner Reaktion.

Überraschend und kritisch zu betrachten ist hingegen das Verhalten von Epitop 3. Es zeigt das gleiche Verhalten wie Epitop 1. Zu erwarten war jedoch eine Bindung des entlöschten Peptides an den Antikörper, da das Tryptophan nicht Bestandteil der nativen Sequenz ist und damit keinen Einfluss auf die Bildung des Immunkomplexes haben sollte. Hier hat wahrscheinlich eine weitere, unbekannte Modifikation des Epitops stattgefunden.

Vor diesem Hintergrund wurden auch die FCS-Untersuchungen von Epitop 1 erneut betrachtet und festgestellt, dass bei Zugabe von Seren zu bereits entlöschtem Epitop keine Reaktion mehr gefunden wird. Dieses ist in sofern unerwartet, als das polyklonale Antikörper verschiedene Bereiche des Epitopes angreifen sollten. Die Peptidbindende Grube an der Antigenbindungsstelle des Antikörpers bindet an 6-9 Aminosäuren. Die Sequenz von Epitop 1 betrachtend sollte daher zu erwarten sein, dass der Bindungsanteil abnimmt. Ein völliges Ausbleiben der Reaktion lässt nur zwei Schlüsse zu: entweder enthielten die positiv getesteten Seren ausschließlich Antikörper, in denen das Tryptophan essentiell für die Bildung des Immunkomplexes war, oder es finden weitere, nicht durch die Farbstofffluoreszenz beobachtbare Prozesse statt. Die Ergebnisse des in Abbildung 4.13 dargestellten Versuches legen nahe, weitere Prozesse in Betracht zu ziehen.

Abhängigkeit der Peptidentlöschung von Aminosäuresequenz und Löschungseffizienz

Während Epitop 2a über viele Stunden in hoher Verdünnung bei Raumtemperatur gelagert werden kann, ohne eine Veränderung zu zeigen, ist die Stabilität seiner modifizierten Form 2b so gering, dass eine Bestimmung der Bindungskonstante über FCS-Titration nicht möglich ist (vgl. Kapitel 4.1.2). Direkte Einzelmessungen zur Bestimmung der Serenbindung verliefen erfolgreich (Abb. 4.6). Da die angefügten GS-Einheiten kein Teil der natürlichen Sequenz sind, ist der Bindungsverlust wahrscheinlich auf durch das Anhängen der zusätzlichen Moleküle hervorgerufene Veränderungen zurückzuführen. Nachdem ein Einfluss der dem Puffer zugesetzten Substanzen Rinderserumalbumin und Tween20 experimentell ausgeschlossen werden konnte, blieben als mögliche Erklärungen oxidative Prozesse durch Änderungen in den elektronischen und sterischen Verhältnissen.

Da die Untersuchung solcher Prozesse aufgrund der Größe der Epitope und der Verschiedenartigkeit der chemischen Eigenschaften ihrer Seitenkette komplex sind, konnte die Zielsetzung der Versuche nur eine Eingrenzung der möglichen Prozesse sein. Daher wurde zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit Epitop 2a mit dem ähnlichen Epitop 2b verglichen. Für Vergleiche wurde auch das Verhalten von freiem Tryptophan und verschiedenen langer Peptide von GS-Sequenzen untersucht:

- Epitop2a AS-Sequenz: DDLMLSPDDIEQWFT
- Epitop 2b AS-Sequenz: Btn-GSGSDDLMLSPDDIEQWFTGSGSK
- Freies Tryptophan W
- Dipeptide mit Tryptophan FW, GW
- Verschiedene GS-Peptide (GS)_{1,3,5,7,9}W

Für die in der Arbeit verwendeten Peptide geht die Empfindlichkeit für eine Löschungsaufhebung mit der Löschungseffizienz einher. Wie Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, steigt die Quantenausbeute von E2b (0,26) über Epitop 1 und 3 (je 0,38) zu Epitop 2a (0,42) in der gleichen Reihenfolge wie die beobachtete Stabilität. Zu untersuchen war, ob der Anteil der im Löschungskomplex vorliegenden Tryptophanmoleküle in direktem Zusammenhang zu der Empfindlichkeit des Peptides steht. Zur Untersuchung der Abhängigkeit von Komplexbildung und Oxidation wurden Dipeptide von Phenylalanin und

Tryptophan (FW) und Glycin und Tryptophan (GW) so wie einzelnes Tryptophan (W) an MR121 gebunden und untersucht.

Die geringen Quantenausbeuten von 0,05 (W), 0,11 (GW) und 0,25 (FW) lassen nach der vorangegangenen Beobachtung eine stark erhöhte Empfindlichkeit erwarten. Lagerung bei 4°C und 20°C führte im Zeitraum von 48 h nicht zu einer Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften der Proben. Einzig die bei 50°C inkubierten Proben verloren einen kleinen Teil ihrer Löslichkeit. Die Quantenausbeuten stiegen auf 0,07 (W), 0,15 (GW) und 0,30 (FW). Damit kann die Komplexbildung zwischen Tryptophan und Farbstoff als alleiniges Kriterium für die Peptidzerstörung ausgeschlossen werden.

Die Peptidsequenzen E2a und E2b unterscheiden sich ausschließlich durch die an beiden Termini angebrachten Linker Biotin-GSGS sowie GSGSK. Da die Zersetzung auch in Peptiden ohne Biotin beobachtet wurde und die als reaktive Gruppe mögliche Aminogruppe des Lysins durch den Farbstoff besetzt ist, ist es sinnvoll, das Verhalten von an Tryptophan angebrachten GS-Sequenzen unter gleichen Bedingungen zu untersuchen. Die zu Beginn der Versuche ermittelten Quantenausbeuten von 0,07 (GSW) bis 0,47 ((GS)₉W) blieben jedoch über einen Zeitraum von 48 h unabhängig von Inkubationstemperatur und Peptidkonzentration konstant. Ein alleiniges Zusammenwirken von Serin, Tryptophan und dem Farbstoff ist somit ebenfalls nicht gegeben.

4.2.2. Zusammenfassung und Diskussion der Beobachtungen zur Epitopzerstörung

Die Abhängigkeit der Peptidzerstörung von Temperatur und Sauerstoffgehalt der Lösung weist auf einen oxidativen Prozess als Grund für die Entlösung der markierten Epitope hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass die besonders oxidationsempfindliche Aminosäure Tryptophan zerstört wird.

Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit des Prozesses verliefen ohne Ergebnis. Neben der Sequenz, auch Primärstruktur genannt, bilden Biopolymere in Abhängigkeit von ihrer chemischen Zusammensetzung auch räumliche Strukturen aus. Ladung, Polarität und der sterische Anspruch der Seitenketten können dazu führen, dass Bereiche der Primärstruktur sich bevorzugt in einer bestimmten Konformation befinden, die über Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert sind. In Peptiden sind die

am häufigsten auftretenden sogenannten Sekundärstrukturen α -Helices und β -Faltblätter. Im Gegensatz zu Bereichen, in denen keine definierte Sekundärstruktur vorliegt (sog. Zufallsschleifen oder random coils) zeichnen sich Helices und Faltblätter dadurch aus, dass in ihnen die Drehwinkel des Peptidrückgrates festgelegt sind und sich über die Länge des Sekundärstrukturelementes hindurch periodisch wiederholen. Die α -Helix ist eine rechsgängige Spirale mit im Schnitt 3 bis 4 Aminosäuren pro Umlauf. Sie wird von Wasserstoffbrücken stabilisiert und wird bevorzugt von großen polaren Aminosäuren ausgebildet. Im Gegensatz dazu werden Faltblattstrukturen eher von Aminosäuren mit kleinen, unpolaren Seitenketten bevorzugt, da sich in dieser zieharmonikaartigen Struktur die Seitenketten parallel oder antiparallel zueinander entlang des Peptidrückrades legen. Ladungen und sterisch anspruchsvolle Reste würden diese Ausrichtung erschweren.

Eine Veränderung in der Sekundärstruktur kann dazu führen, dass der Antikörper die von ihm erkennbaren Seitenketten in anderer Stellung zueinander oder überhaupt nicht mehr erreicht. Besonders interessant ist hier der Vergleich zwischen Epitop 2a und 2b, da die Peptide ein deutlich unterschiedliches Oxidationsverhalten zeigen, obwohl die Modifikationen außerhalb des Bereiches, der für Fluoreszenzlöschung und Antikörperbindung verantwortlich ist, liegen.

Die Epitope 1, 2a und 2b liegen in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des p53. Von dieser Region des Proteins ist bekannt, dass ihre Funktion stark durch Änderungen der Konformation der Domäne, jedoch nicht durch den Austausch einzelner Aminosäuren beeinflusst wird [Marston, Crook et al. 1994; Soussi und May 1996]. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen die tatsächliche Struktur der Transaktivierungsdomäne (AS 1-92) aufzuklären. Hier soll eine Voraussage der Sekundärstruktur von Epitop 2a und 2b mithilfe von Datenbanken und entsprechenden Rechnungen durchgeführt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Peptidlänge sich im unteren Bereich der zur Ausbildung von Sekundärstrukturen nötigen bewegt. Die durchgeführte Betrachtung der Strukturen soll keine Aussagen über eventuelle Peptidstrukturen geben. Es soll ausschließlich verglichen werden, ob und wie sich die Peptide untereinander und gegenüber dem p53-Protein verhalten könnten. Die durch eine Struktursimulation erhaltenen Vorschläge für Sekundärstrukturen hängen stark von den verwendeten Methode und der zugrunde liegenden Proteindatenbank ab. Für den durchgeführten Vergleich wurden verschiedene Analysetools auf Basis neuronaler Netzwerke herangezogen.

Obwohl die Aussagen über die absolute Konformation der Epitope in den Methoden voneinander abwichen, lieferte der Vergleich der vorausgesagten

Peptidkonformation der freien Peptide mit ihrer vorausgesagten räumlichen Anordnung im Protein ähnliche Ergebnisse. Hier sollen beispielhaft die Ergebnisse von NNPRELECT University of California in San Francisco [McClelland und Rumelhart 1988; Kneller, Cohen et al. 1990] und von GOR IV des Pôle BioInformatique der Universität Lyon [Combet, Blanchet et al. 2000] dargestellt werden, die beide drei Konformationen (c = Zufallsschleife, e = β -Faltblatt, h = α -Helix) unterscheiden. Die Strukturvorhersagen von NNPRELECT basieren auf den Daten von 105 Proteinen [Bernstein, Koetzle et al. 1977], aufgrund derer die Sekundärstruktur einer Seitenkette eines Peptides unbekannter Tertiärstruktur mit einer Wahrscheinlichkeit von 67% richtig angegeben wird [Kneller, Cohen et al. 1990]. Gor IV greift auf eine aus 267 Proteinen bestehende Datenbank zurück und gibt die Sekundärstruktur in 64,4% der Fälle richtig an [Garnier, Gibrat et al. 1996]. Sie wurde trotz ihrer geringeren Sicherheit gewählt, da mit ihr die komplette Sequenz von p53 berechnet wurde und so Vergleiche mit dem Protein innerhalb einer Methode möglich sind.

Tabelle 4.3: Strukturvorschläge der Epitope im Vergleich zum Strukturvorschlag des p53-Proteins durch GOR IV (- = random coil). Für die p53-Struktur wird die Struktur über die angegebenen Sequenzen wie für die Stelle berechnet fortgeführt.

Epitop 1								
AS-Sequenz:		SQE	TFS	DLW	KLL	PEN		
Vorhergesagte Struktur		---	---	eee	eee	- ee		
Vorherges. Struktur in p53	---	---	- hh	hhh	hh -	---	---	---
Epitop2a								
AS-Sequenz:		DD	LML	SPD	DIE	QWF	T	
Vorhergesagte Struktur		- -	---	---	-- h	h - -	-	
Vorherges. Struktur in p53	- hh	hhh	h - -	---	---	ee -	---	---
Epitop 2b								
AS-Sequenz:	(GSG	S)DD	LML	SPD	DIE	QWF	T(GS	GSK)
Vorhergesagte Struktur	---	---	- ee	---	- ee	eee	eee	ee -
Vorherges. Struktur in p53	- hh	hhh	h - -	---	---	ee -	---	---
Epitop 3								
AS-Sequenz:			SKK	GQS	TSR	H(W)		
Vorhergesagte Struktur			---	-- e	eee	e -		
Vorherges. Struktur in p53	- hh	h - -	- ee	---	- hh	hhh	eee	ee -

Tabelle 4.4: Strukturvorschläge für Epitop 2a und 2b durch NNPRELECT

Epitop2a								
AS-Sequenz:		DD	LML	SPD	DIE	QWF	T	
Vorhergesagte Struktur		- -	---	---	-- h	h - -	-	
Epitop 2b								
AS-Sequenz:	GSG	SDD	LML	SPD	DIE	QWF	TGS	GSK
Vorhergesagte Struktur	---	---	- e -	---	-- e	eee	---	---

Ein Vergleich der Konformations-Vorhersagen durch GORIV für die verschiedenen Peptide mit den Vorhersagen ihrer Konformation im Gesamtprotein zeigt, dass nur die Strukturvorhersage für das freie Epitop 2a ähnlich der seiner Struktur im Protein ist. In beiden Fällen wird die Sequenz hauptsächlich als random coil vorausgesagt. Anders ist die Situation für Epitop 1 und 3. In beiden wird für die Region um das bindungsessentielle Tryptophan im freien Peptid eine Faltblattstruktur vorgeschlagen, während für diese Stellen innerhalb des Proteins eine helicale Struktur vorgeschlagen wird. Besonders ins Auge fallen die unterschiedlichen Prognosen der beiden homologen Epitope 2a und 2b. Die Verlängerung der Sequenz führt dazu, dass das für Epitop 2a vorhergesagte random coil mit leicht helicaler Tendenz einem β -Faltblatt im Bereich des Tryptophans weicht.

Die Bewertung dieser Ergebnisse muss unter dem Gesichtspunkt erfolgen, dass die untersuchten Peptide, vor allem Epitop 3, sehr kurz für die Ausbildung von Sekundärstrukturen sind. Weiterhin ist zu beachten, dass weder der Einfluss des Farbstoffmoleküls, noch der des Biotins in der Rechnung berücksichtigt werden können. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die motivischen Verhältnisse in den Peptiden sich teilweise deutlich von den Verhältnissen im Protein unterscheiden.

Den Daten können zwei Aussagen entnommen werden. Epitop 2a scheint sich deutlich anders zu verhalten als die anderen betrachteten Peptide. Sein Strukturvorschlag aus Tabelle 4.3 ähnelt der im Protein vorgeschlagenen Struktur am stärksten und es kann von allen Peptiden am ehesten als random coil - Peptid beschrieben werden. Während in allen anderen Peptiden das Tryptophan in einem Faltblatt vorgeschlagen wird, wird für Epitop 2a sowohl durch GORIV als auch durch NNPRELECT, welches als Vergleich herangezogen wurde, eine helicale Tendenz gezeigt. Auffällig ist weiterhin, dass alle instabilen Epitope im Bereich des für die Löschung verantwortlichen Tryptophans jeweils eine recht lange Sequenz von Peptiden zeigen, für die das β -Faltblatt vorgeschlagen wird. Ohne Aussagen über etwaige Sekundärstrukturen zu machen ist eine Strukturabhängigkeit der Oxidationsempfindlichkeit des Tryptophans wahrscheinlich.

Zur weiteren Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den sterischen und elektrostatischen Verhältnissen in kurzen Polypeptiden und der Reaktivität ihrer Seitengruppen sind Berechnungen der tatsächlichen räumlichen Anordnungen unter Versuchsbedingungen interessant. Weiterhin wären Versuche nötig, um den Übergang zwischen stabilen und instabilen Sequenzen zu untersuchen. Hierzu böte es sich an, Epitop vom C-Terminus her zu verkürzen und mit den daraus entstehenden neuen Peptiden die Kinetik der Tryptophanoxidation zu betrachten.

4.3. Qualitativer und Quantitativer Nachweis von Proteinen aus humanem Blutserum durch Nachweise auf Mikrobeads

Die Miniaturisierung immunologischer Nachweise auf Chips und die Verwendung von Kunststoff- oder Silicabeads ist in der letzten Zeit zu Standardmethoden avanciert. Auf der Suche nach sichereren Assays, die mit weniger Material- und Kostenaufwand in kürzerer Zeit durchgeführt werden können, zeichnen sich deutliche Fortschritte ab. In dieser Arbeit wurden zwei grundsätzliche Typen von Nachweisen vor dem Hintergrund unterschiedlicher Fragestellungen entwickelt.

Während der Assay-Entwicklungen im Rahmen dieser Arbeit konnten auch andere Arbeitsgruppen Erfolge in der Entwicklung von Mehrschichtassays wie den hier vorgestellten erzielen [Yan, Xing et al. 2004; Koskinen, Vaarno et al. 2006]. Diese guten Ergebnisse wurden jedoch unter aufwendigen Techniken wie der Anreicherung von Antikörpern über Protein G erzielt [Koskinen, Vaarno et al. 2006] oder erforderten einen komplizierten Aufbau der Messzelle für den verwendeten elektrochemilumineszenten (ECL) Nachweis [Blackburn, Shah et al. 1991; Koskinen, Vaarno et al. 2006]. Obwohl der Nachweis über die elektrochemische Anregung von Rutheniumkomplexen ausgezeichnete Ergebnisse liefert und seit kurzer Zeit kommerziell erhältlich ist, kam er für den in dieser Arbeit zu entwickelnden Assay nicht in Frage. Dieser sollte in Mikrotiterplatten oder Mikrochips durchführbar sein, was aufgrund der für ECL benötigten Elektroden mit dieser Technik nicht möglich ist.

4.3.1. Kompetitiver, quantitativer Nachweis von Wachstumsfaktoren

Der Nachweis von Wachstumshormonen aus menschlichem Blut ist mit den derzeit existenten käuflichen Methoden problemlos möglich. So liegt die normale Serumkonzentration des IGF-I, an dem der vorliegende Nachweis entwickelt wurde, mit durchschnittlichen Konzentrationen von 10-30 nmol/L [D'Ercole, Stiles et al. 1984] im nachweisbaren Konzentrationsbereich der meisten immunologischen Nachweismethoden. Der zu entwickelnde Assay sollte jedoch zusätzliche Kriterien erfüllen. Da er für einen Nachweis in Mikroliterkavitäten in immunologischen Chips geplant ist, sollten Waschschrte so weit wie möglich vermieden werden. Die Nachweise mit dem fertigen Assay sollen von Laien

durchführbar sein. Daher wurden die Versuche so gestaltet, dass eine Maschine in der Lage ist, Inkubation, fluoreszenzspektroskopische Vermessung und Auswertung des Nachweises eigenständig durchzuführen.

Aufbau eines Nachweises ohne Waschschrte

Mehrschichtassays unter Verwendung von Waschschrten enthalten im Allgemeinen zwei Schritte. Im ersten wird ein monoklonaler Fängerantikörper (capture Antibody cAB) dafür verwendet Analyte möglichst quantitativ aus der Lösung zu fangen und so die Sensitivität des Assays bestimmt. Der Dektionsantikörper (detection antibody dAB) ist ein polyklonaler Antikörper, der hochselektiv an die Analytmoleküle bindet. Er trägt im ELISA ein Biotin an dem das zum enzymatischen Nachweis nötige Molekül, meist eine Peroxidase oder Phosphatase, angebracht wird.

Die erste Modifikation zu dem beschriebenen „klassischen“ Aufbau liegt bei Nachweisen auf Beads darin, dass die Bindung an die detektierte Oberfläche nicht adsorptiv, sondern gerichtet erfolgen muss. Dieses wurde im entwickelten Assay durch eine Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin realisiert. Weiterhin liegen im Unterschied zum ELISA alle Bestandteile des Assays nebeneinander in Lösung vor, da in einem geplanten Chip-Assay eine nachträgliche Zugabe von Komponenten nicht zu realisieren ist. Bei Verwendung polyklonaler und monoklonaler Antikörper in der oben beschriebenen Art und Weise würde dies zu einer Herabsetzung der Sensitivität führen, da Bindungsstellen des monoklonalen Antikörpers auch von polyklonalen Antikörpern besetzt werden können. Daher wurde der in Abbildung 4.14 schematisch dargestellte Aufbau mit zwei identischen, polyklonalen Antikörpern gewählt.

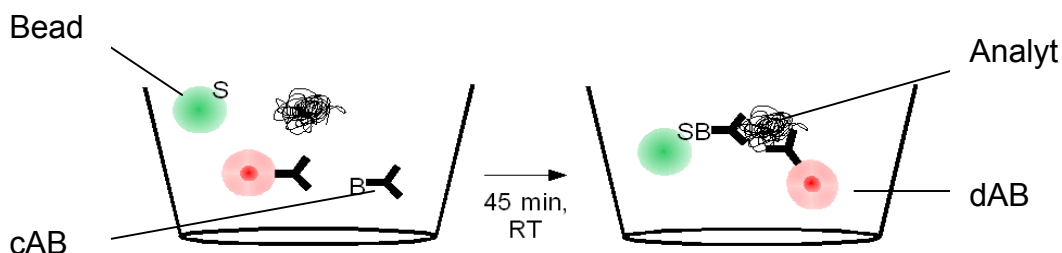


Abb. 4.14: Schematischer Aufbau des Assays zur quantitativen Bestimmung von Proteinen aus humanem Serum. S steht hierin für Streptavidin, B für Biotin.

Unter der Annahme, dass Farbstoffmarkierung und Biotinylierung des verwendeten polyklonalen Antikörpers keinen entscheidenden Einfluss auf das Bindungsverhalten haben, stehen die Detektions- und Fängerantikörper in direkter

Konkurrenz um die Bindungsstellen des Analytmoleküls, der Assay ist also der Gruppe der kompetitiven Nachweise zuzuordnen.

Drei-Komponenten-Gleichgewichte in einem Immunoassay ohne Waschschrift

Innerhalb der Inkubationszelle kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Analytmolekül (IGF-I), Fängerantikörper und Detektorantikörper. Für den entwickelten Nachweis wurde der charakteristische, ungewöhnliche Verlauf der Titrationskurve durch Auftragung der Intensitätsverteilung rom (Gl. 3.6) gegen die IGF-Konzentration genutzt (Abb. 4.15).

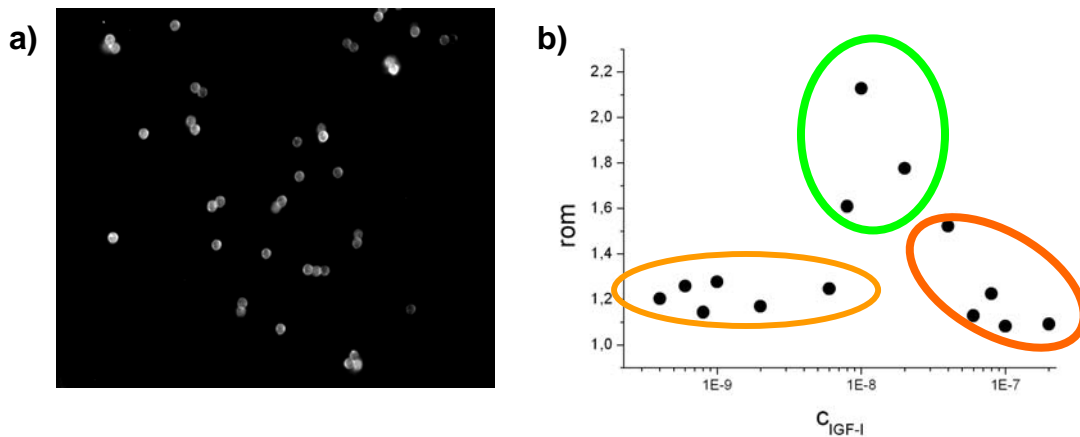


Abb.4.15: a) Digitale Aufnahme stark fluoreszierender Beads entsprechend dem Maximalbereich von b). b) Typischer Verlauf des rom - Wertes für eine Titration mittels einschrittigem Nachweis, hier am Beispiel der Optimierung auf eine $1 \cdot 10^{-8}$ molare IGF-Lösung. Weitere Erklärungen siehe Text.

Alle bestimmten Titrationskurven zeigen einen maximalen rom -Wert für den Fall gleicher Analyt und Detektorantikörperkonzentration. Im abgebildeten Beispiel ist die Dreiteilung der Titrationskurve des auf eine $1 \cdot 10^{-8}$ molare Lösung optimierten Versuches dargestellt. Die Abbildung kann in drei Bereiche unterteilt werden, in denen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse sich deutlich in den ermittelten Helligkeitsverteilungen widerspiegeln.

Die Konzentration des Fängerantikörpers wird in jeder Titration so gewählt, dass sie niedriger ist als jene des Detektorantikörpers. In dem in Abbildung 4.15 gelb markierten Bereich kleiner IGF-Konzentrationen steigt mit abnehmender IGF-Konzentration die Wahrscheinlichkeit, dass alle Bindungsstellen auf dem Molekül von den im Überschuss vorliegenden farbstofftragenden, nicht biotinylierten IGF-Molekülen besetzt werden. So sind sie IGF-Moleküle zwar stark markiert, können jedoch nicht mehr an die Beads gekoppelt werden. Im grün markierten

hochsensitiven Bereich der Titrationskurve liegt das Konzentrationsverhältnis zwischen dem Wachstumsfaktor und dem Detektionsantikörper im Bereich von eins. Im Mittel trägt also jedes IGF-Molekül einen Detektionsantikörper und hat so noch Bindungsstellen zur Fixierung auf dem Bead frei. Steigt die IGF-Konzentration weiter, ist eine Farbstoffmarkierung nicht mehr für jedes Analytmolekül möglich (Abb. 4.15, orange markiert). Zusätzlich nimmt der Anteil farbstoffmarkierter IGF-Moleküle auf der Oberfläche der Beads dadurch ab, dass an den auf dem Bead befindlichen Fängerantikörper bereits nichtmarkierte Analytmoleküle gebunden sein können, die dann die Bindungsstellen für farbstoffmarkiertes IGF blockieren können.

Der beschriebene Kurvenverlauf ist charakteristisch und ähnlich für alle immunologischen Nachweise. Erstmals wurde dieser Zusammenhang zwischen Bindungsstellen und Antigen von dem amerikanischen Mediziner und Mitbegründer der quantitativen Immunanalyse Michael Heidelberger festgestellt und wird bis heute in der Immunpräzipitation als „Heidelberger Kurve“ verwendet [Heidelberger und Kendall 1929]. In allen mehrschrittigen Nachweismethoden (auch ELISA) wird der Detektor jedoch immer im Überschuss zugegeben und auf einen Konzentrationsnachweis über das Bindungsoptimum verzichtet.

Für die Einstellung dieses Gleichgewichtes ist die eingesetzte Menge an Beads unkritisch. Die Experimente wurden in 96 well-Titerplatten durchgeführt. Um eine für die Aufnahme repräsentativer Bilder nötige Menge von Beads sicherzustellen, wurden ca. 400000 Beads pro Well verwendet. Dieses entspricht nach Herstellerangaben $6,2 \cdot 10^{-8}$ mol Antikörperbindungsstellen pro Well. Eine Herabsetzung der Beadmenge würde eine Erhöhung der Sensitivität zur Folge haben, wurde aber nicht weiter verfolgt, da die verwendeten Bedingungen eine Detektion im physiologischen Bereich der IGF-Konzentration erlauben.

Verwendung des Verfahrens für einen Nachweis in Immuno-chips

Die verwendeten Immuno-chips sind so aufgebaut, dass mit einer Injektion von Probenmaterial mehrere Messzellen befüllt werden. Diese parallele Vermessung mehrerer Messzellen zur Analyse einer Probe ermöglicht die Herstellung eines Assays, der nach einmaliger Justierung die IGF-Serumkonzentration ohne die Vermessung von Referenzen bestimmt.

In Abbildung 4.16 wurden die Helligkeitsverteilungen verschiedener Titrationsreihen gegen die IGF-Konzentration aufgetragen. Die Funktionswerte der verschiedenen Titrationsreihen für eine gesuchte IGF-Konzentration lassen ihre genaue Bestimmung zu.

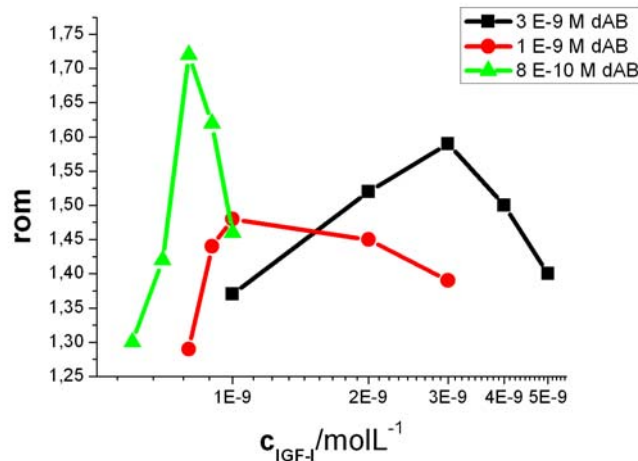


Abb. 4.16: Auf verschiedene IGF-Konzentrationen optimierte Titrationsreihen im Bereich von $3 \cdot 10^{-9}$ bis $8 \cdot 10^{-10}$ M IGF.

In Abbildung 4.16 sind der Übersichtlichkeit halber Konzentrationen im Bereich von $8 \cdot 10^{-10}$ bis $3 \cdot 10^{-9}$ mol/L aufgetragen. Gleiche Ergebnisse wurden für verschiedene Konzentrationsreihen bis zu einer Maximalkonzentration im Optimum von $1 \cdot 10^{-8}$ M IGF erhalten. Obwohl $1 \cdot 10^{-8}$ M bereits die untere physiologische Grenze der IGF-Konzentration darstellt, wurde vom Nachweis höherer Konzentrationen abgesehen.

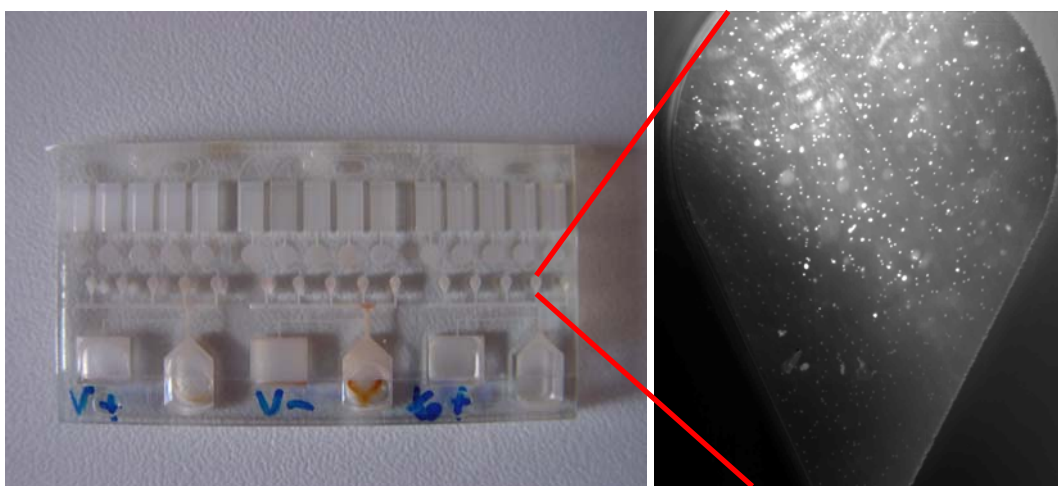


Abb. 4.17: Links: Immunochip bestehend aus drei Messeinheiten mit je fünf tropfenförmigen Messzellen. Rechts: fluoreszenzspektroskopische Aufnahme von $2,8 \mu\text{m}$ Beads in einer Messzelle. Die IGF-Konzentration beträgt $1 \cdot 10^{-8}$ M.

Eine Versuchsdurchführung im vorgesehenen ImmunoChip (Abb. 4.17) verringert das Reaktionsvolumen von 200 μL in den vorgestellten Experimenten auf etwa 5 μL ⁴. Das entspricht einer Volumenreduktion auf ein Vierzigstel. Unter der Annahme, dass das Signal von den absoluten Mengen der IGF-Molekülkomplexe auf den Beads abhängt, sind die verwendeten molaren Mengen für einen Nachweis im Chip optimal.

Eine weitere Optimierung des Versuches wurde nicht vorgenommen. Nachdem gezeigt worden ist, dass der entwickelte Assay prinzipiell die Bestimmung der IGF-Konzentration ohne Verwendung einer Referenz erlaubt, müssen weitere Optimierungsschritte direkt im Chip erfolgen. Diese umfassen eine erneute Optimierung bezüglich Beadmenge und Antikörperkonzentrationen und eine Anpassung der Eichkurven an den Detektor, in dem Chip der verwendet werden soll. Um derart kleine Messzellen mit der nötigen Genauigkeit zu befüllen, ist die Verwendung von Automaten nötig, die bei Durchführung der Experimente nicht zur Verfügung standen.

Grenzen des kompetitiven, quantitativen Assays

Die Grenzen der Bildauswertung und der Ermittlung des rom -Wertes, der die Breite der Helligkeitsverteilung beschreibt wurden bereits im Methodenteil besprochen. Die Maximalwerte der Titrationskurven werden hauptsächlich durch die Menge der eingesetzten Beads bestimmt. Grundsätzlich werden für Bilder, die mehr Beads enthalten, geringere rom -Werte erhalten.

Der Assay funktioniert, die Maximalwerte der Titrationskurven sowie ihre Steigungen streuen jedoch. Die Schwankungen im absoluten Kurvenverlauf sind auf verschiedene Einstellungen des mikroskopischen Aufbaus, verschiedene Beadmenge und verschiedene Beadverteilungen in den einzelnen Aufnahmen und Reihen zurückzuführen. Es wurde nicht versucht, den Assay auf reproduzierbare, absolute Kurvenverläufe zu optimieren, da dieses durch die vielen beeinflussenden Faktoren mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden wäre und mit den veränderten Parametern im Chip erneut durchgeführt werden müsste.

⁴ Hierbei wird die Fläche der 3mm hohen und an Ihrer breitesten Stelle 1mm breiten tropfenförmigen Messzelle durch einen Halbkreis und ein gleichseitigen Dreieck angenähert.

Wichtiger als die Höhe des Maximalwertes ist die Verschiebung des Maximums auf der Konzentrationsachse der Titrationskurve. Im Verhältnis zu den üblichen halbquantitativen Verfahren wie ELISA oder ECL-basierten Methoden würde eine Abweichung von 10% des erwarteten Wertes bereits einen großen Fortschritt darstellen. Um eine Aussage über die Genauigkeit machen zu können, wurden zwei Kurven miteinander verglichen. An zwei verschiedenen Tagen, also verschiedenen Justagen des mikroskopischen Aufbaus, wurden aus verschiedenen Puffern und Verdünnungsreihen eine Titrationsreihe mit $1 \cdot 10^{-8}$ M dAB und eine Titrationsreihe mit $8 \cdot 10^{-9}$ M dAB vermessen (Abb. 4.18).

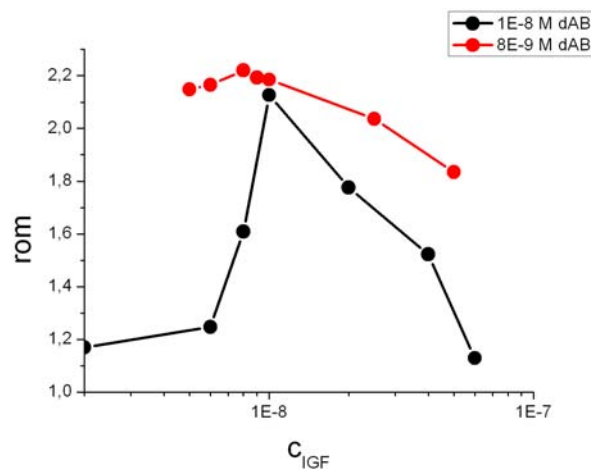


Abb. 4.18: Unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Titrationskurven für $1 \cdot 10^{-8}$ M und $8 \cdot 10^{-9}$ M dAB. Trotz deutlich verschiedenem Kurvenverlauf wird das rom-Maximum für die richtige IGF-Konzentration gefunden.

Trotz der abweichenden Steigungen in der Titrationskurve der $8 \cdot 10^{-9}$ molaren Detektionsantikörperlösung wird das Maximum in beiden Kurven an der Stelle gleicher Detektorantikörper- und Analytkonzentration gefunden. Die Genauigkeit des Nachweises liegt deutlich über der bisher erhältlicher Assays. Erste Versuche zeigen, dass die Wachstumsfaktoren Interleukin 1β und $TNF-\alpha$ ähnliche Ergebnisse liefern, der Assay also allgemein mit hoher Genauigkeit zur quantitativen Analyse von Proteinen genutzt werden kann.

4.3.2. Qualitativer Nachweis von p53-Autoantikörpern aus humanem Blutserum

Die Anforderungen an einen Nachweis von Autoantikörpern unterscheiden sich deutlich von denen, die für den Nachweis der Wachstumsfaktoren beschrieben

wurden. Während die relativ hohen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren möglichst einfach quantitativ bestimmt werden sollten, liegt der Schwerpunkt eines Assays zur Bestimmung von Antikörpern im sicheren Nachweis ihres Vorliegens in der Probe. Eine quantitative Analyse ist nicht sinnvoll, da vom Körper eine Vielzahl verschiedener Antikörper gegen ein Antigen gebildet wird, die mit verschiedenen Bindungskonstanten an das Antigen binden. Seit der Entdeckung einer Autoimmunantwort des Körpers gegen sein p53-Protein werden der diagnostische Nutzen des Antikörpernachweises, seine Bedeutung für die Therapie und die Zuverlässigkeit der Verfahren diskutiert (s. Kapitel 1.1) Ziel war es, einen möglichst empfindlichen Assay zu entwickeln, ihn für Seren gesunder Spender und Patienten mit diagnostizierter Krebserkrankung zu testen und die Ergebnisse mit vorherigen Arbeiten zu vergleichen.

Aufbau des Nachweises zur Detektion von p53-Autoantikörpern

Während die Versuche in Lösung nicht die gewünschte Sensitivität aufwiesen und Versuche durch adsorptives Aufbringen auf Glasoberflächen an der Zersetzung der Epitope scheiterten, sollte der Nachweis über eine kovalent modifizierte Oberfläche erfolgen. Hierfür boten sich an der Oberfläche Carboxylgruppen tragende, superparamagnetische Polystyrol-Beads an.

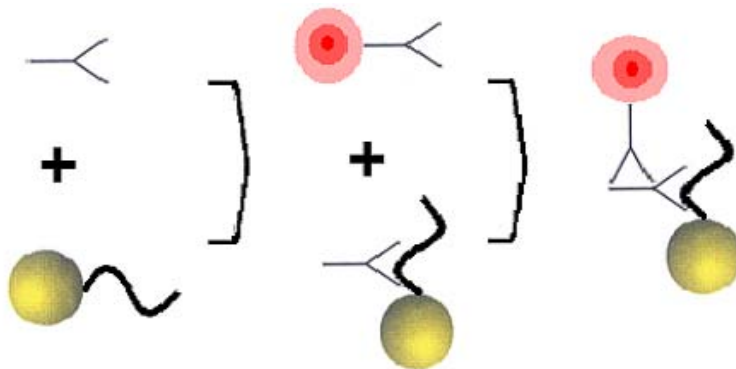


Abb. 4.19: Schematischer Aufbau des Assays zum Nachweis von p53 Autoantikörpern. Die Arbeitsschritte sind von links nach rechts abgebildet: 1) Inkubation mit Serum, Waschschrift (Dargestellt durch Klammer), 2) Inkubation mit farbstoffmarkiertem polyklonalem anti-human IgG-Antikörper und 3) der Immunkomplex nach dem finalen Waschschrift.

Für diesen Nachweis wurden p53-Epitope kovalent auf PS-Beads aufgebracht, da jede zusätzliche Gleichgewichtsreaktion die Sensitivität des Nachweises negativ beeinflusst. Die Besetzung der Beads wurde durch Referenzmessung der Proteinabsorption vor und nach der Umsetzung mit etwa 700 bis 1000 Peptidmolekülen pro Bead bestimmt. Die Belegung erfolgte N-terminal für die Epitope 2a, 4 und 4a. Von Versuchen mit Epitop 1, 2b und 3 wurde abgesehen, da die hier vorgestellte Methode keine Möglichkeit bietet, die Funktionsfähigkeit der

Peptide zu überprüfen. Für die Detektion wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die konstante Region des humanen IgG gewählt, um so über eine mögliche Mehrfachmarkierung der p53-Antikörper die Sensitivität weiter zu erhöhen.

Als essentiell für ein Funktionieren des Assays erwies sich die passende Inkubationstemperatur. Während in dem in Kapitel 4.3.2 vorgestellten Nachweis eine Inkubation bei Raumtemperatur ausreichend war, konnten im Antikörpernachweis nur nach Inkubation bei 37° C gute Ergebnisse erzielt werden.

Reaktion verschiedener Blutseren auf den beadbasierten Antikörpernachweis

Verschiedene Seren gesunder Blutspender (S) und Seren von Patienten mit diagnostiziertem Lungenkarzinom (K) wurden mit Beads inkubiert, die die Epitope 2, 4 und 4a trugen. Abbildung 4.20 stellt einige typische Aufnahmen positiver und negativer Seren dar, Abbildung 4.21 die rom-Werte verschiedener Seren nach Inkubation mit den verschieden belegten Beads.

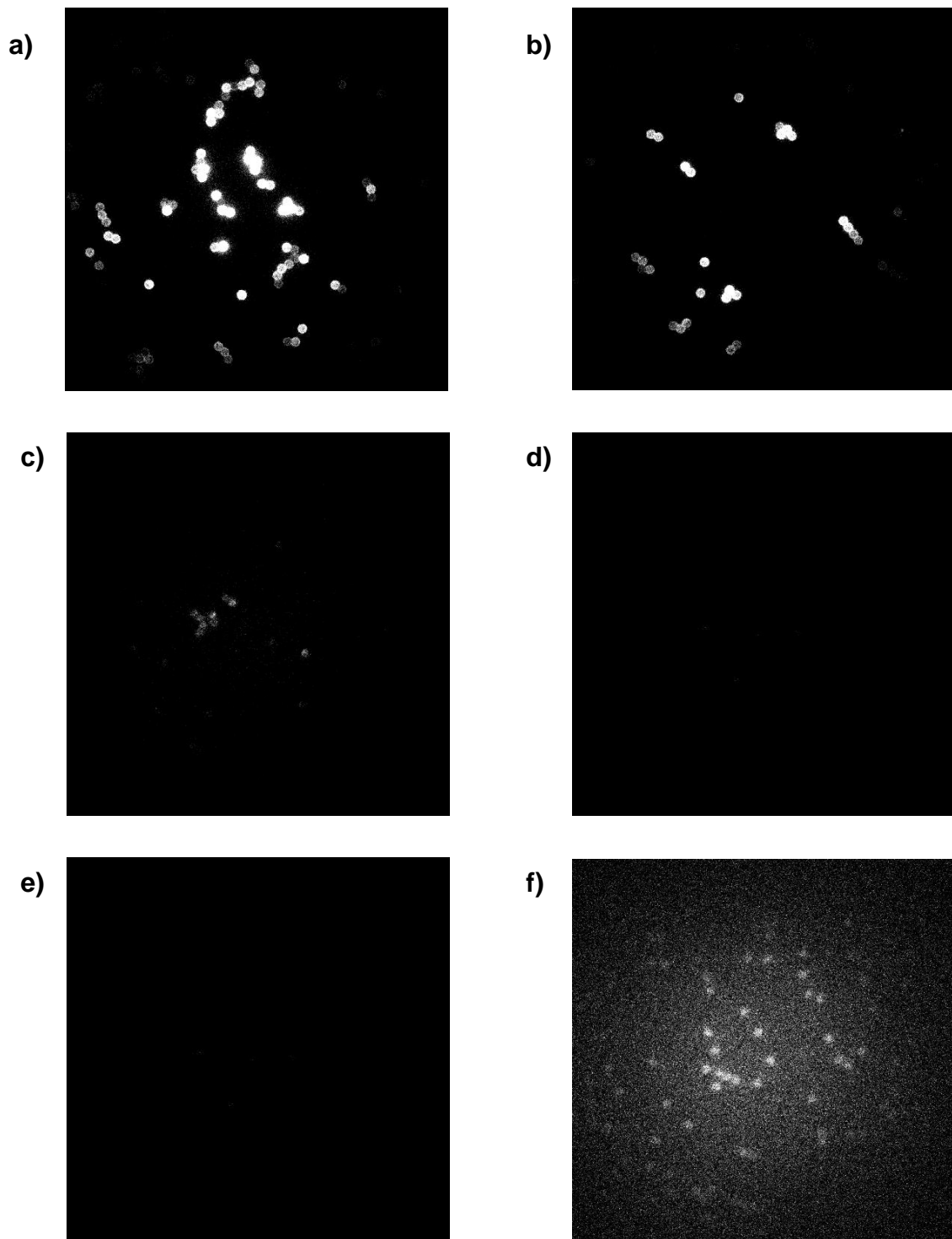


Abb. 4.20: a)-d) Abbildung im Bereich zwischen 1500 und 2200 counts/pixel der Aufnahmen von E4a gecoateten Beads, die mit verschiedenen Seren inkubiert wurden. a) K17 (stark positiv), b) K1 (positiv), c) K7 (schwach positiv), d) S3 (negativ). e) und f) sind Aufnahmen der Referenzbeads, e) Abbildung im Bereich zwischen 1500 und 2200 counts/pixel, f) gleiche Abbildung im Bereich zwischen 1300 und 1500 counts/pixel.

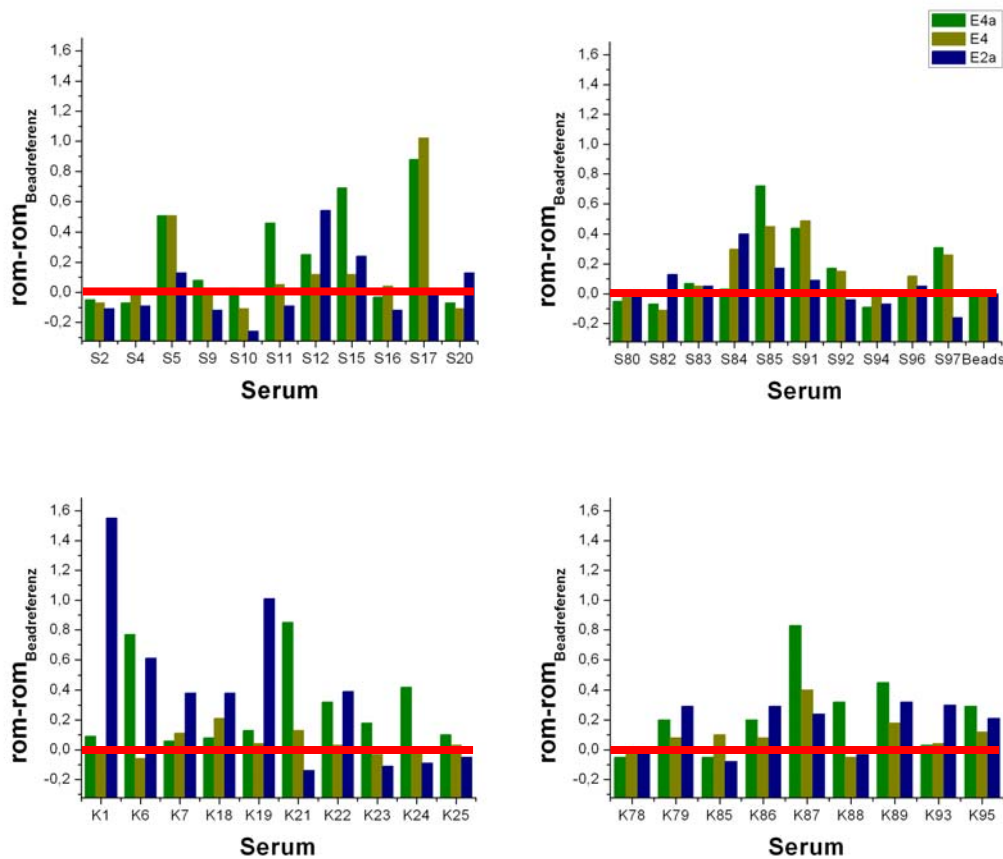


Abb. 4.21: Reaktion verschiedener Seren auf die Epitope 2a, 4 und 4a. Die rom-Werte der Beadreferenz wurde jeweils von den für die Proben erhaltenen abgezogen. Oben: Spenderseren (S), unten: Lungenkarzinomseren (K).

Allgemein fallen in Abbildung 4.21 die Reaktionen der Spenderseren schwächer aus, als jene der Krebsseren. Auch die starke Reaktion der Krebsseren gegenüber den mit Epitop 2a gecoateten Beads ist auffällig.

Auch bei diesem Nachweis sind Vergleiche nur innerhalb einer Messreihe möglich, da variierende Beadanzahl sowie verschiedene Inkubationsbedingungen und Mikroskopeinstellungen einen Vergleich verschiedener Messreihen untereinander unsicher machen (s. Diskussion im Anschluss). In Abbildung 4.22 wird die Ausprägung der Serenreaktionen des in Abbildung 4.21 dargestellten Versuchs betrachtet. Hierzu wurde eine Einteilung der Seren in keine (-), schwache (+), starke (++) und sehr starke (+++) Reaktion vorgenommen.

Die Reaktion der Seren S10, S97, K21 und K85 sind typische Reaktionen negativer Seren auf peptidgecoatete Beads. Es konnte immer wieder beobachtet werden, dass negative Seren einen rom-Wert deutlich unterhalb der Beadreferenz aufweisen. Dieses wird darauf zurückgeführt, dass als Referenz die carboxyltragenden Beads verwendet wurden, die aufgrund ihrer Ladung zu stärkeren unspezifischen Wechselwirkungen neigen. So wurde der rom-Wert der leeren Beads als Grenzwert für eine positive Reaktion festgesetzt. Für Epitop 2a

wurden keine Werte knapp oberhalb dieses Grenzwertes festgestellt, sie waren eindeutig positiv oder eindeutig negativ. Alle Seren, die Werte im Bereich zwischen der Beadreferenz und dem schwächsten positiven Signal im E2a-Nachweis lagen, wurden als schwach positiv bewertet. Die Unterscheidung zwischen positiven und stark positiven Reaktionen wurden willkürlich festgesetzt. Sie haben keine analytische Bedeutung und sollen ausschließlich dazu dienen, die Ausprägung der Immunantwort auf die verschiedenen Epitope zu kategorisieren und die Betrachtung der Versuchsergebnisse aus Abbildung 4.21 übersichtlicher zu machen.

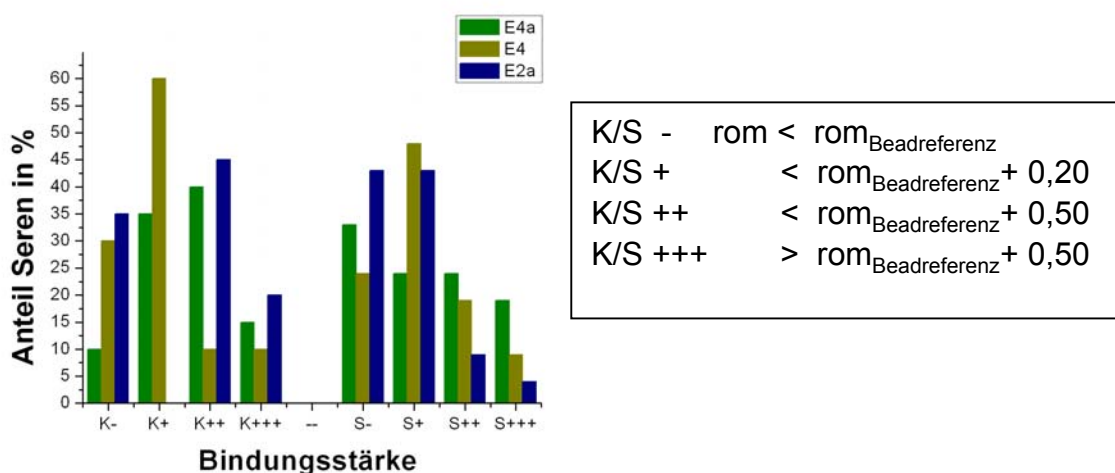


Abb. 4.22: Stärke der Immunreaktion der Seren auf die verschiedenen Epitope

Epitop 4 ist das einzige Epitop, welches besser auf gesunde als auf die Seren kranker Spender anspricht, während Epitop 2a und 4 deutlich stärkere Reaktion mit Krebsseren zeigen.

Ziel des Nachweises ist eine Unterscheidung des Verhaltens von Patienten einer Tumorerkrankung gegenüber gesunden Menschen. Wird davon ausgegangen, dass auch eine schwach positive Reaktion auf die betrachteten Seren in einem gesunden Körper auftreten kann, zeichnet sich ein noch deutlicheres Bild ab:

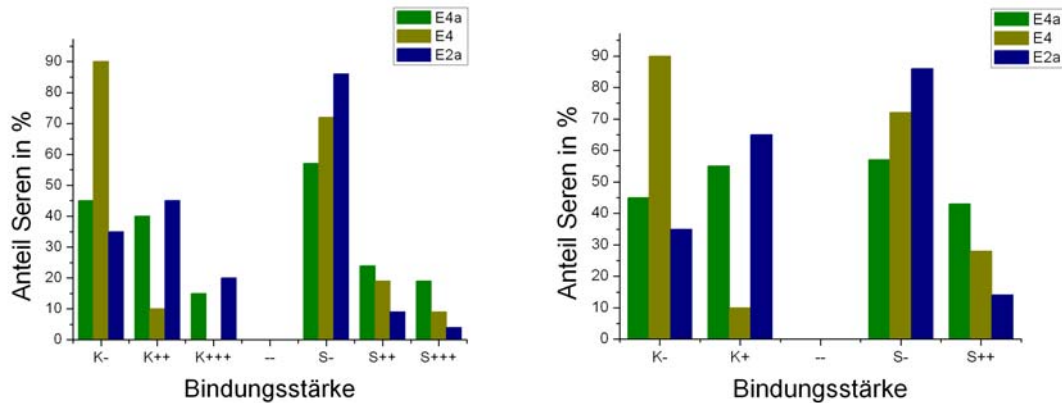


Abb. 4.23: Verteilung der positiven und negativen Reaktionen auf die verschiedenen Epitope. Links: positive Signale nach Intensität verteilt, rechts nur positiv/negativ-Vergleich.

Die im Epitopmapping von Lubin et al. [Lubin, Schlichtholz et al. 1993] festgestellte Immunodominanz der Region, die in dieser Arbeit Epitop 2a genannt wird, kann bestätigt werden. Während 13 von 21 getesteten Krebsseren positiv auf Epitop 2a reagieren, werden nur 3 von 21 Spenderseren als positiv nachgewiesen.

4.3.3. Bewertung und Diskussion der Experimente auf PS-Beads

Bewertung der Nachweismethoden

Die Titrationsreihen des quantitativen Nachweises belegen die Empfindlichkeit der entwickelten Methoden. Mit einer deutlichen Unterscheidbarkeit einer $1 \cdot 10^{-8}$ molaren von einer $8 \cdot 10^{-9}$ molaren Lösung liegt die Genauigkeit deutlich über der anderer Methoden. Durch den Verzicht auf eine enzymatische Reaktion werden auf diesem Wege auch quantitative Ergebnisse möglich.

Die sicheren Ergebnisse des quantitativen Nachweises lassen Rückschlüsse auf den p53-Assay zu. Wie bei der Analyse von Wachstumsfaktoren können auch beim Antikörpernachweis aus den bereits genannten Gründen nur Ergebnisse einer Messreihe sicher miteinander verglichen werden, was eine Bestimmung der Detektionsgrenze erschwert.

Mit dem System Epitop 2a / pAB1801 wurden monoklonale Modellexperimente durchgeführt. Diese zeigten je nach Versuchsreihe und Bedingungen eine Grenze des Nachweises zwischen $1 \cdot 10^{-14}$ und 10^{-16} mol/L Antikörper. Ähnliche Ergebnisse liefert der Nachweis von Yan über ECL [Yan, Xing et al. 2004] und Waschschritte

beinhaltende Versuche zu Wachstumsfaktoren. Diese deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber dem ELISA im monoklonalen Experiment erklärt die besseren Ergebnisse, ist aber nicht ohne weiteres auf die Bindungsstudie in den Krebsseren übertragbar.

Die Messungen wurden in Blutserum durchgeführt. Die Gesamtproteinmenge kann zwar im monoklonalen Experiment durch Zugabe entsprechender Mengen Rinderserumalbumin simuliert werden, die Zusammensetzung der Lösung unterscheidet sich jedoch deutlich von einer Blutprobe. Gerade das Vorhandensein verschiedenster Antikörper stellt einen deutlichen Unterschied dar, weil diese möglicherweise den Nachweis stören. Da in einem Serum polyklonale Antikörper gegen die untersuchten Aminosäuresequenzen vorliegen, kann aufgrund variierender Bindungskonstanten keine Aussage über die Konzentration der im Serum vorhandenen Antikörper getroffen werden. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die detektierten Konzentrationen für viele der Proben unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA liegen, mit denen die meisten anderen Studien durchgeführt wurden.

Zusammenfassend liegen die Vorteile der Methoden darin, dass über einfache Modifikationen im Aufbau festgelegt werden kann, ob der Nachweis besonders empfindlich oder genau sein soll. Beide Arten der Reaktionsführung führen zu guten Ergebnissen. Nachdem das prinzipielle Funktionieren gezeigt ist, müssen in einem nächsten Schritt experimentelle Bedingungen geschaffen werden, die eine Vergleichbarkeit verschiedener Experimente ermöglichen.

Der quantitative Nachweis

Der Nachweis erreicht reproduzierbar eine hohe Genauigkeit in der Ermittlung des Kurvenmaximums. Es ist daher zu erwarten, dass unter konstanten Bedingungen die Kurvenform ebenso einheitlich wird. Diese konstanten Bedingungen konnten jedoch unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nicht geschaffen werden. Eine abschließende Fehlerbetrachtung ist daher erst nach Vermessung der Chips in dem zugehörigen Gerät sinnvoll. Im Chipreader erfolgen Laser- und Chippositionierung sowie Ausleuchtungsoptimierung einmalig und werden anschließend konstant gehalten. Abbildung 4.17 zeigt die Aufnahme einer im geplanten Gerät vermessenen Messzelle. Die Messzelle wird als ganzes ausgeleuchtet. Dieses hat eine weitere Verringerung des Fehlers zu Folge, da bei automatischer Befüllung der Zellen die Anzahl der Beads in jeder Aufnahme bekannt und konstant ist. Durch mikroskopische Aufnahmen von Hand

angefertigter Proben kann keine realistische Abschätzung des Fehlers im geplanten Versuchsaufbau gemacht werden.

Der qualitative Nachweis

Der Nachweis von p53-Autoantikörpern ist nicht für einen Chipassay geplant. Um eine für einen Fluoreszenznachweis ausreichende Menge von Antikörpern auf den Beads zu binden wird mit 200µL einen für einen Immunoassay recht große Menge von Serum benötigt. Dieses spricht gemeinsam mit dem geringeren Anteil positiv reagierender Lungenkrebsseren in früheren ELISA-Versuche [Lubin, Schlichtholz et al. 1993; Schlichtholz, Tredaniel et al. 1994; Portefaix, Fanutti et al. 2002] dafür, dass die Antikörperkonzentration vieler Seren unterhalb der Nachweisgrenze des p53-ELISA bei etwa 10^{-12} mol/L liegt.

Der Anteil von 65% erkannten Seren für Epitop 2a liegt im gleichen Bereich, wie die Anteile an Lungenkrebspatienten, in deren nicht-entartetem Gewebe verändertes p53-Protein nachgewiesen wurde [Fouquet, Antoine et al. 2004].

Die mit Epitop2a gecoateten Beads liefern nicht nur das eindeutigste Ergebnis, ihr Verhalten unterscheidet sich generell von dem der anderen beiden Epitope. Während Epitop 4 und 4a in allen Experimenten bei Kontakt mit entsprechendem Antikörper gleichmäßige Signale lieferten, gab es in Versuchen mit E 2a tragenden Beads immer zwei Populationen. Neben den erwarteten hellen Beads lag ein Teil der Beads in jedem Serum dunkel vor. Dieses wird auf eine Unregelmäßigkeit im Coating-Vorgang zurückgeführt, die jedoch auch in mehreren Ansätzen nicht behoben werden konnte. Denkbar ist, dass die deutlicheren Signale im Nachweis der Antikörper gegen E2a auch darauf zurückzuführen sind, dass im Vergleich weniger bindungsfähige Beads in der Lösung vorlagen. Weitere Versuche müssen klären, ob die Ergebnisse mit einer geringeren Anzahl von Beads generell eindeutiger werden.

4.4. Bewertung und Vergleich der Versuche an p53-Antikörpern

4.4.1. Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden

Vergleich der verschiedenen Methoden

Der Nachweis von Antikörpern gegen p53 erfolgte über Diffusionszeitbestimmung mittels Fluoreszenzkorelationsspektroskopie und über den Bead-Assay. Während die Versuche in Lösung nicht empfindlich genug für den Nachweis der niedrigen Antikörperkonzentrationen waren, lieferten sie doch wertvolle Hinweise auf das Verhalten der Peptide.

Bei der Durchführung von Oberflächenexperimenten werden im Allgemeinen Abstandshalter aus 4-6 Aminosäuren an die Reaktionssequenz angefügt, um Wechselwirkungen mit der Oberfläche herabzusetzen. Die Beobachtungen, die für das auf diese Weise verlängerte Epitop 2b gemacht wurden, deuten aber auf ein deutlich unterschiedliches Verhalten der beiden Peptide hin. Obwohl sich die Bindungssequenz nicht verändert hat, ist seine Oxidationsempfindlichkeit erheblich verändert. Daher wurde in den Experimenten auf die Linker verzichtet. Frühere Studien zeigen, dass der tryptophanhaltige N-terminale Bereich des Peptides verantwortlich für die Erkennung durch Antikörper ist [Portefaix, Fanutti et al. 2002]. Daher war das Risiko einer deutlich verminderten Reaktion der Antikörper gegenüber p53 gering.

Mögliche Rückschlüsse auf Vorgänge im Körper durch den Nachweis von Antikörpern

Aufgrund seiner geringen Lebensdauer und seiner Instabilität sind Untersuchungen am p53-Protein aus Gewebe schwierig. Weiterhin ist eine Biopsie der Patienten nötig, da im menschlichen Blut bisher kein p53 nachgewiesen werden konnte. Eine elegante Lösung Aussagen über das Protein zu machen ist die Untersuchung des Reaktionsverhaltens von IgG-Molekülen. Noch nach Jahren können sie Informationen über Antigene, mit denen der Körper in Berührung kam geben. So stellen die in den Beadexperimenten erhaltenen Ergebnisse nicht nur eine Möglichkeit zum Nachweis von p53-Autoantikörpern dar, sondern bieten Ansatzpunkte zum Verständnis der p53-Regulation.

Die durch das Anhängen zusätzlicher Aminosäuren vorausgesagte Veränderung in der Struktur von Epitop 2a ist eine naheliegende Erklärung für eine veränderte Umgebung des Tryptophans. Umgekehrt kann die Stabilität des Tryptophans jedoch als Indiz für das Ausbilden einer Sekundärstruktur in diesem Bereich des p53-Proteins, für den es bisher keine bewiesene Struktur gibt, gesehen werden. Dieses ist besonders auffällig, da bekannt ist, dass die Funktionsfähigkeit der Transaktivierungsdomäne (TAD) des p53 stärker von ihrer Sekundärstruktur als von ihrer Aminosäuresequenz abhängen. [Lin, Chen et al. 1994; Marston, Crook et al. 1994]. Die Tatsache, dass Antikörper gegen Epitop 2a selektiv von Lungenkrebspatienten entwickelt werden, lässt drei mögliche Schlussfolgerungen für das p53-Protein in Krebspatienten zu:

Es ist denkbar, dass in gesunden Menschen der N-terminale Bereich der TAD eine andere Sekundärstruktur aufweist als in Krebspatienten. Dieses entspricht jedoch nicht der allgemeinen Annahme, dass die p53-Antikörper lineare Epitope erkennen [Schlichtholz, Legros et al. 1992]. Die Modifikation der TAD von p53 erfolgt hauptsächlich posttranslational über Phosphorylierung. Eine weitere mögliche Erklärung für das beobachtete Verhalten wäre eine fehlende Phosphorylierung an Ser⁴⁶ im p53 Krebskranker. Sie ist zuständig für die Hochregulierung der Apoptoseaktivität von p53 [D'Orazi, Cecchinelli et al. 2002]. Ein völliges Ausbleiben dieser Regulation würde in Einklang mit fehlender Apoptose stehen. Auch ein Vorliegen verschiedener Isoformen des p53 in Gesunden und Kranken ist eine mögliche Erklärung. Auch wenn ihre Funktionen noch nicht vollständig geklärt ist, konnte nachgewiesen werden, dass ein Körper bereits 4 Stunden nach einem massiven Eingriff wie z.B. einer Chemotherapie eine andere Isoform des Proteins exprimiert als vor der Störung [Bourdon 2007]. Da nicht alle acht bisher bekannten Isoformen ihre TAD verloren haben, muss auch hier die Erkennung dreidimensionaler Strukturen durch die Antikörper in Betracht gezogen werden.

Auch wenn die Tendenz nur schwach ausgeprägt ist, lässt sich in Abbildung 4.17 erkennen, dass die Tendenz auf Epitop 4a zu reagieren bei Krebspatienten deutlicher ausgeprägt ist, wohingegen gesunde Patienten eher auf Epitop 4 (AS 314-326) reagieren. Auch hier ergeben sich interessante Ansatzpunkte für Rückschlüsse auf das Vorliegen von p53 im Körper. Das Epitop, das in weiten Teilen mit dem Kernlokalisierungssignal I (AS 316-324) identisch ist, wird vom Transkriptionscoaktivator PCAF (P300/CBP-associated factor) acetyliert, um die Transkriptionsaktivität zu erhöhen [Sakaguchi, Herrera et al. 1998; Liu, Scolnick et al. 1999]. Da PCAF durch Phosphorylierungen in der Transaktivierungsdomäne im Bereich der Epitope 1 und 2a aktiviert wird, ist es der gleichen Kaskade zuzuordnen, die für die oben beschriebene Phosphorylierung verantwortlich ist.

Eine Information über verstärkte Acetylierung von Lysin³²⁰ würde weiter zum Verständnis der p53-Aktivierung beitragen.

4.4.2. Vergleich der Ergebnisse des Beadassays mit den Resultaten ähnlicher Arbeiten

Fouquet ermittelte für Gewebeproben von Lungenkrebspatienten in 62% bis 64% signifikante Veränderungen [Fouquet, Antoine et al. 2004] des das p53-Proteins codierenden Erbguts. Die mit dem Beadassay ermittelten 65% positive Reaktionen auf die Antigene der immunodominanten Region (AS 41-55) liegen in guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen. Die Methode ist also in der Lage, ohne Biopsie Veränderungen des p53-Proteins sicher nachzuweisen.

Für die Epitope 4 und 4a wurden mit einem ähnlich aufgebauten, auf Agglutination beruhenden Verfahren 33% der Krebsseren positiv auf Epitop 4 und 35% der Krebsseren positiv auf Epitop 4a getestet [Agaylan, Binder et al. 2007]. Die Ergebnisse für E4a sind in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. Die vielen positiven Reaktionen auf E4 sind schwer zu begründen. Zu einer genaueren Diskussion wäre ein Vergleich mit Serenproben gesunder Spender mittels der Methode nach Agaylan et al. nötig, die jedoch nicht vorliegen.

Auch konnte in der dieser sehr ähnlichen Arbeit keine Reaktion gegenüber Beads festgestellt werden, deren Oberfläche mit Epitop 2a besetzt war. Hierfür gibt es eine Erklärung. Der nach Agaylan erarbeitete Nachweis beruht auf Agglutination der Beads. Für Epitop 2a konnte auch in mehreren Ansätzen keine regelmäßige Besetzung der Beads erreicht werden, die für eine Agglutination notwendig ist. Da für beide Nachweise das selbe Peptid nach dem gleichen Protokoll auf die Beads aufgebracht wurde, ist davon auszugehen, dass die Seren negativ reagierten, weil die verwendeten Beads ungleichmäßig besetzt waren.

Ein weiterer Test auf superparamagnetischen PS-Beads zum Nachweis von p53-Autoantikörpern wurde 2004 von Yan et al. vorgestellt [Yan, Xing et al. 2004]. Mit 28% positiver Reaktionen von Lungenkrebsseren liegt die Empfindlichkeit dieses Nachweises mit ECL-Detektion deutlich unter dem in dieser Arbeit vorgestellten. Gründe hierfür sind im Aufbau des Assays zu suchen. Während der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweis mit kovalent auf der Oberfläche verankerten Peptiden durchgeführt wird, wird in dem ECL-Assay rekombinantes p53 als

Antigen über einen Antikörper aufgebracht, der seinerseits über Streptavidin-Biotin-Bindung am Bead angebracht ist. Auch wenn von hohen Bindungskonstanten ausgegangen wird, muss durch die entstehenden vielen Waschschriffe von einem Sensitivitätsverlust ausgegangen werden.

5. Zusammenfassung

2002 erkrankten in Deutschland etwa 45.000 Menschen an Lungenkrebs, rund 39.000 starben daran. Damit haben Patienten, die an dieser Krebsart erkrankt sind, nach solchen mit Bauchspeicheldrüsenkrebs und Speiseröhrenkrebs die schlechteste Heilungsprognose [Robert-Koch-Institut 2006]. Einer der Gründe hierfür ist, dass die Diagnose ausschließlich über bildgebende Diagnostik möglich ist. Da die Krankheit im frühen Stadium keine Beschwerden hervorruft, werden bösartige Veränderungen häufig erst gefunden, wenn die Tumorbildung schon weit fortgeschritten ist und sich Metastasen gebildet haben.

Seit den neunziger Jahren werden Antikörper gegen den Tumorsuppressor p53 auf eine Funktion als globale Tumormarker hin untersucht, da bereits früh eine Korrelation zwischen vielen Krebserkrankungen und der Bildung dieser Antikörper nachgewiesen wurde. Veränderungen im Protein selber können in 67% der Lungenkrebspatienten nachgewiesen werden. Über den p53-ELISA, die derzeitige Standardmethode zum Nachweis seiner Antikörper, können jedoch nur in etwa 20% der Patienten Antikörper gegen das p53-Protein nachgewiesen werden. Eine Erhöhung dieses Anteils würde einen Nachweis zur Detektion von p53-Autoantikörpern im Rahmen der Krebsvorsorge sinnvoll machen.

In dieser Arbeit wurde ein hochempfindlicher, beadbasierter Assay zum Nachweis von p53-Antikörpern entwickelt. Dieser ist mit 2 Stunden deutlich schneller als der ELISA, vermeidet unspezifische, adsorptive Reaktionsschritte sowie enzymatische Verstärkung des Signals und ist nicht auf einen Vergleich mit Standardproben angewiesen.

Unter der Annahme, dass minimale Konzentrationen von p53-Antikörpern auch in gesunden Spendern zu finden sind, wurde auf die Verwendung des Gesamtproteins als Antigen verzichtet. Es wurden verschiedene immunodominante Epitope daraufhin untersucht, ob gesunde und Krebsseren unterschiedliche Reaktionen auf sie zeigen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass verschiedene Epitope unterschiedlich auf gesunde Seren und solche von Spender mit einer diagnostizierten Krebserkrankung reagieren. Besonders ausgeprägt war der Unterschied in der Reaktivität bei einem, bereits als immunodominant bekannten, N-terminalen Epitop. Gegen dieses konnten in 65% der Krebsseren Antikörper nachgewiesen werden, während nur 10% der gesunden Spender positiv reagierten.

Auch wenn eine genaue Bestimmung der Detektionsgrenze nicht möglich ist, konnte festgestellt werden, dass der in dieser Arbeit entwickelte Nachweis deutlich empfindlicher als ein ELISA ist. Während dieser die niedrigen Antikörperkonzentrationen in Seren gesunder Spender nicht nachweisen kann, konnten mit dem entwickelten Assay je nach Epitop in bis zu 45% der Spender Antikörper nachgewiesen werden. Es gibt zwei Gründe für die erhöhte Sensitivität des neuen, fluoreszenzbasierten Nachweises. Durch den Verzicht auf einen adsorptiven Reaktionsschritt kann das Blutserum unverdünnt eingesetzt werden ohne das Hintergrundsignal signifikant zu beeinflussen. Zu einer erhöhten Sensitivität trägt außerdem bei, dass der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweis nur zwei Inkubationsschritte mit den zugehörigen Waschschritten benötigt, während es im p53-ELISA vier sind.

Die Vielfältigkeit des entwickelten Nachweises zeigt sich daran, dass einfache Modifikationen in der Versuchsführung eine genaue quantitative Bestimmung von Plasmaproteinen erlaubt. Das Ziel dieses zweiten Assays war es, einen quantitativen Nachweis zu entwickeln, der empfindlich genug für die Bestimmung von Plasmaproteinen wie IGF-I ist und ohne Waschschriffe durchgeführt werden kann. In monoklonalen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Assay mit großer Genauigkeit die Konzentration von IGF angibt und bei einer Nachweisdauer von einer Stunde um ein vielfaches schneller als die derzeit im Laboralltag zum IGF-Nachweis verwendeten semiquantitativen ELISAs ist.

6. Ausblick

6.1. Quantitativer Nachweis von Serumproteinen

Der am Beispiel von IGF-I entwickelte Nachweis unterscheidet sich von anderen Nachweisverfahren durch den einfachen und effizienten Aufbau. Wie Immunpräzipitationsnachweise erfolgt die Analyse in einem einzigen Reaktionsschritt innerhalb einer Stunde. Im Unterschied zu diesen ist es mit ihm jedoch nicht nur möglich die Existenz von Proteinen aufzuzeigen. Im Gegenteil ist er aufgrund der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswertungsmethode in der Lage, genaue Aussagen über die in der Probe befindliche Proteinmenge zu machen. Der Nachweis kommt ohne die als kritisch zu betrachtende Setzung von Grenzwerten aus. Weder der experimentelle Aufbau, noch die Auswertungsmethode fordern eine Bewertung des Resultats in Abhängigkeit extrinsischer Parameter.

Der nächste Schritt auf dem Weg zum fertigen Assay wird die automatische Befüllung der Immunochips sein. Diese ist nötig, um die einzelnen Messkammern so befüllen zu können, dass die für den Nachweis eingesetzte Beadmenge konstant ist. Nur so kann die Helligkeit der Beads in Abhängigkeit von der IGF-Konzentration mit höchster Genauigkeit bestimmt werden. In einem letzten Schritt müssen die Messungen unter den im Gerät gegebenen Bedingungen im monoklonalen Experiment und in Seren erneut durchgeführt werden.

6.2. Qualitativer Nachweis von p53-Autoantikörpern

Für einen Nachweis von IgG-Molekülen in Lösung erwies sich der homogene Assay als nicht sensitiv genug. Aufgrund seiner einfachen und schnellen Durchführung ist er jedoch grundsätzlich für ein Hochdurchsatz-Verfahren von Interesse. Ein denkbares Anwendungsgebiet ist hier die Diagnostik akuter Infektionen durch IgM-Moleküle.

Die Empfindlichkeit eines Nachweises von IgM mit einem homogenen Verfahren auf Basis einer Diffusionszeitbestimmung wird deutlich über der des IgG-Nachweises liegen, da IgM pentamer vorliegt, was den für FCS-Messungen kritischen Massenunterschied deutlich erhöht. In der Praxis wird für den Nachweis einer akuten Infektion mit Krankheiten wie Masern, Röteln oder echter Grippe (Influenza) unter anderem ein IgM-ELISA herangezogen. Da solche Nachweise schnell in großer Zahl durchführbar sein müssen, ist ein einstufiger Assay, der in weniger als einer Stunde auf eine große Menge Proben testen kann, wünschenswert.

Die Entwicklung eines Assays, mit dem kleinste Mengen an Antikörpern nachgewiesen werden können, ist das Kernstück dieser Arbeit. Der Nachweis auf PS-Beads erwies sich als erfolgreiche Realisierung der Aufgabenstellung. Es gelang erstmals nachzuweisen, dass Antikörper gegen den Tumorsuppressor nicht nur in Patienten mit Tumorerkrankungen gebildet werden, sondern, in geringerer Konzentration, auch in den Seren von Gesunden nachweisbar sind.

In einem nächsten Schritt wird die Empfindlichkeit des Nachweises über monoklonale Modellexperimente genauer abgeschätzt werden. Weiterhin sollen, wie für den quantitativen Nachweis, Schritte in Richtung eines reproduzierbaren, automatisierbaren Assays erfolgen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie legen nahe, Patienten mit und ohne Veränderungen im p53-Protein auf die Antikörper in ihrem Blut zu untersuchen, um die vermutete Korrelation zwischen p53-Mutation und einem Ansprechen der Antikörper auf Epitop 2a zu bestätigen oder zu widerlegen. Durch eine weitere Untersuchung der Konformationen der Epitope 2a und 2b könnten neue Informationen über das Verhalten der Transaktivierungsdomäne in Gesunden und Tumorkranken erhalten werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Untersuchung von Lungenkrebsseren. Die in der Arbeit angesprochenen früheren Studien geben jedoch gute Hinweise darauf, dass ein solcher Nachweis auch für andere

Krebsarten, in deren Verlauf p53 im Blut nachgewiesen wurde, funktionieren sollte. Weiterführende Studien mit Blutseren von Spendern verschiedener Krebserkrankungen sollen durchgeführt werden, um die Bedeutung verschiedener p53-Epitope als globale oder Krebstyp-abhängige Tumormarker festzustellen.

7. Anhänge

7.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APD	Lawinen-Photodiode
AS	Aminosäure
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSA	Rinderserumalbumin
cAB	Fängerantikörper
dAB	Detektionsantikörper
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	Fragment, antigene binding
Fc	Fragment, crystalizable
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin
IGF-I	Insulin-like growth factor 1, somatomedin C
IMS	Immunomagnetische Separation
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
MDM2	Transformed 3T3 cell double minute 2
m-RNA	Boten-Ribonucleinsäure
NHS	N-Hydroxy-succinimidyl-Rest
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RNA	Ribonucleinsäure
rom	Ratio of means
SV40	Simianes Virus 40
TAD	Transaktivierungsdomäne
TIR	interne Totalreflexion
TIRFM	interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie

7.2. Ein- und Dreibuchstaben-Code der Standardaminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Bustaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3. Verzeichnis der biologischen Ausdrücke

A gglutination	Verklumpung antigentragender Partikel in Gegenwart von Antikörpern
Anabolisch	Den aufbauenden Stoffwechsel betreffend
Antikörpertiter	Minimale Verdünnung, bei der ein Antikörper noch nachweisbar ist. Qualitative Konzentrationsangabe in der Medizin
Autokrin	Botenstoffwirkung innerhalb einer Zelle
B iopsie	Entnahme und Untersuchung von lebendem Gewebe
Blotting	Transfer von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Membran
B-Zelle	Weißer Blutkörperchen, die einzigen Zellen, die Antikörper produzieren, jede B-Zelle produziert einen anderen Antikörper
C hemotherapie	Behandlung von Krebs mit Medikamenten
C-Terminus	Carboxyl-Terminus, das Ende einer Peptidkette, welches eine freie Carboxyl-Funktion hat
E ffektor	Molekül, das eine Reaktion fördert oder behindert
Endokrin	Botenstoffwirkung an entfernter Stelle des Körpers vom Ausschüttungsort (Hormon)

Epitop	Bereich des Antigens, der vom Antikörper erkannt wird
Expression	Gesamter Weg vom Gen zum Protein
G 1-Phase	↑Zellzyklus
G2-Phase	↑Zellzyklus
H ämolyse	Freiwerden von Hämoglobin durch Zerstörung der roten Blutkörperchen
Humorale Immunantwort	Immunantwort über Antikörper
I mmunodominanz	Stark auf viele Antikörper ansprechend
Immunogenität	Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen
Intermembranraum	Raum zwischen äußerer und innerer ↑Mitochondrienmembran. Ort der ATP-Synthese
K inase	Enzymklasse, die Phosphatreste überträgt
L ymph	Hellgelbe Flüssigkeit, Zwischenglied zwischen Gewebeflüssigkeit und ↑Serum
M akrophage	Weißes Blutkörperchen, Fresszelle
Mammakarzinom	Synonym für Brustkrebs
Metabolisch	Den umwandelnden Stoffwechsel betreffend

Mitochondrium	Zellorganelle, Energieproduzent des Körpers
Mitose-Phase	↑Zellzyklus
Monoklonal (Antikörper)	Die Antikörper einer ↑B-Zelle, identisch, greifen ein Epitop an, werden in großen Mengen gentechnisch produziert
m-RNA	Boten- (messenger-)RNA, RNA-Transkript der DNA , codiert Proteine
N -Terminus	Amin-Terminus, das Ende einer Peptidkette, welches ein freies Amin trägt
Nucleolus	Unterbereich des Zellkerns ohne eigene Membran
Nucleusprotein	Protein, dessen Wirkungsort im Zellkern liegt
O nkogen	Teil des normalen Erbguts der Zelle, die den Übergang von normalem zu Tumorwachstum fördern
Oxidasen	Enzymklasse, die als folge von Oxidationsreaktionen elementaren Sauerstoff reduziert
P arakrin	Botenstoffwirkung auf Nachbarzellen
Pathogen	Krankheitserreger
Plasma (Blut-)	Von den Zellbestandteilen befreites Vollblut. Enthält im Gegensatz zu ↑Serum noch Gerinnungsfaktoren
Plasma (Zell-)	Flüssigkeit innerhalb der Zelle

Polyklonal (Antikörper)	Die Antikörper verschiedener \uparrow B-Zellen, werden aus geimpften Individuen gewonnen
Posttranslationale Modifikation	Änderungen am Protein, die nach der eigentlichen Proteinsynthese im \uparrow Zellplasma passiert
Präzipitation	Immunologischer Nachweis über Fällung \uparrow agglutiniierter Immunkomplexe
Protein G (Sephrose)	Protein mit großer Affinität zur konstanten Region von IgGs, zur Antikörperaufreinigung häufig auf Sepharose (ein unlösliches Agarosepolymer) aufgebracht
Punktmutation	Genveränderung, von der nur eine Nucleinbase betroffen ist
R ekombinant (Protein)	Mit Hilfe von gentechnisch veränderten (Mikro-) Organismen hergestellt
Rekombination	Wie verwendet: die Organisation von Chromosomen aus DNA und Proteinen, s.a. \uparrow Segregation
S egregation	Wie verwendet: Auflösung von Chromosomen nach der \uparrow Mitose-Phase, s.a. \uparrow Rekombination
Semiquantitativ	Relative quantitative Aussagen über Vergleich mit Standards
Serum	Von allen Zellbestandteilen und Gerinnungsfaktoren befreites Blut, \uparrow Plasma
Sezernierung	Ausschüttung
S-Phase	\uparrow Zellzyklus
T ransaktivierungsdomäne	Zuständig für transkriptionelle Aktivierung der DNA, schalten Gene an und aus

Transkription	„Übersetzung“ von DNA in RNA
Tumorgenese	Tumorentwicklung, hoch komplexer, noch unverstandener Prozess, der zur Tumorbildung führt
Tumormarker	Biomoleküle, deren Anwesenheit auf Vorhandensein einer Tumorerkrankung hindeutet
Tumorsuppressor	Protein, das ↑Zellzyklus und Apoptose kontrolliert und so unkontrolliertes Wachstum verhindert
Ubiquitinligase	Enzym, das Ubiquitin (Protein, 8,5 kDa) an Proteine anbringt und so für den Abbau markiert
Wachstumsfaktor	Proteine, die Zellteilung und Zelldifferenzierung beeinflussen können
Wildtyp	Der evolutionär natürliche Zustand, das Gegenteil einer Mutante
Zellplasma	↑ Plasma (Zell-)
zellulärer Stress	Bedingungen, auf die Zellen mit Umstellung des Metabolismus reagieren müssen, um zu überleben
Zellzyklus	Zyklus zwischen zwei Zellteilungen. Nacheinander durchläuft die Zelle G0-, ↑G1-, ↑S-, und G2-Phase, (alle Teile der Interphase, in der die Zelle ihre Funktion erfüllt) und die ↑Mitosephase, in der die Zelle sich teilt.
Zytokine	Zuckerhaltige Proteine der Gruppe der ↑Wachstumsfaktoren

7.4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Antikörpers [aus: Janeway 2003]. ...	10
Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines heterogenen Sandwichassays.	13
Abb.2.3: chemische Umsetzung im Detektionsschritt eines ELISAs.....	15
Abb. 2.4: lineare und logarithmische Darstellung einer Titrationskurve	18
Abb. 2.5: a) Scatchard Plot für den Fall, dass alle Bindungsstellen gleich und unabhängig sind. b) Scatchard Plots in denen vorherigen Bindung des Antigens an den Antikörper aktivierend bzw. hemmend auf andere wirkt. ...	19
Abb. 2.6: vereinfachte Darstellung der möglichen Übergänge in einem Farbstoffmolekül (Jablonski Diagramm).	23
Abb.2.7: Chemische Strukturen von a) Hämoglobin und b) Bilirubin	26
Abb. 2.8: dynamische Löschung eines Farbstoffes in Anwesenheit eines Löschmoleküls Q.....	28
Abb. 2.9: Statischer Löschprozess. Der Fluorophor F und das Löschmolekül Q bilden einen nicht oder schwach fluoreszierenden angeregten Komplex, der die Menge an freiem Farbstoff in Abhängigkeit der Komplexbildungskonstante K_S reduziert.	29
Abb. 2.10: Prinzip der Smart Probes für die Detektion von Antikörpern [aus: Neuweiler 2002].	33
Abb. 2.11: Aufbau eines Weitfeldmikroskops.....	35
Abb. 2.12: Aufbau eines konfokalen Mikroskops	37
Abb. 3.1: Reaktionsschema einer Farbstoffmarkierung mittels NHS-Ester am Beispiel MR121.	44
Tabelle 3.1: Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen.....	46
Abb. 3.2: a) Aufnahme einer Farbstofflösung. Zu sehen ist sowohl ein helles Zentrum, als auch Interferenzringe. b) Histogramm der Aufnahme.....	50

Abb. 3.3: Die gleiche Aufnahme einer Probe stark fluoreszierender 2,8µm großer Beads vor und nach der Ausleuchtungskorrektur.....	50
Abb. 3.4: a) Abbildung schwach fluoreszierender Beads vor einer Korrektur der Ausleuchtung. b) Die gleiche Probe nach der Korrektur.	51
Abb. 3.5: fluoreszierende Beads, links komplette Aufnahme, rechts Ausschnitt. Deutlich erkennbar sind die hellen Ränder der Beads.	52
Abb. 3.6: etwa 40 x 30 µm große Ausschnitte einer positiven Probe (a) und einer negativen Probe (b). Der Unterschied zwischen hellstem und dunkelsten abgebildeten Pixel beträgt 2600 (a) bzw. 150 (b) counts.	52
Abb. 3.7: Helligkeitsverteilung in fluoreszierenden (a) und nichtfluoreszierenden (b) Beads.	53
Abb. 3.8: Histogramme der Aufnahmen aus Abbildung 3.6. Die Verteilung des Hintergrundes ist bei Häufigkeiten von 1500 bzw. 200 Pixel abgeschnitten.	54
Abb. 3.9: Intensitätsverteilung der hellsten Pixel in verschiedenen Proben. Die Verteilung der Beadreferenz (schwarz) ist deutlich schmaler als die anderen Verteilungen.....	55
Abb.3.10: Vergleich der Formen der Verteilungen von leeren und schwach fluoreszierenden Beads.....	57
Tabelle 4.1: Fluoreszenzspektroskopische Ensembleuntersuchung von MR121-markierten p53-Epitopen.....	61
Abb. 4.1: Autokorrelationsgraphen des freien Epitops (schwarz) und des Immunkomplexes (grau). Die Komplexbildung lässt sich über eine Verlängerung der Diffusionszeiten, die im Bereich von Millisekunden liegen, nachweisen.	62
Abb. 4.2: Graphen der Titrations zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten	63
Abb.4.3: Chemische Struktur von Bilirubin.....	64
Abb. 4.4: Diffusionszeiten verschiedener Proben	65
Tabelle 4.2: Standardabweichungen der Diffusionszeiten für Seren-Epitop-Gemische	66

-
- Abb. 4.5:** Diffusionszeiten der Epitope 1 (links) und 2a (rechts) nach Inkubation mit 1:100 Verdünnungen verschiedener Spender- und Krebsseren..... 66
- Abb. 4.6:** Reaktion verschiedener Krebsseren auf die Epitope 2a und 2b..... 68
- Abb. 4.7:** a) Die über Biotin-Streptavidin-Bindung auf der Oberfläche angebrachten Epitope zeigen durch das Gleichgewicht aus gelöschten und nicht gelöschten Epitopen eine verminderte Quantenausbeute. b) Der Antikörper fixiert das Tryptophan in der Bindungstasche, ein Kontakt zwischen diesem und dem Farbstoff ist nicht möglich. Die Probe emittiert mit maximaler Fluoreszenzintensität..... 70
- Abb. 4.8:** Auf gleiche minimale und maximale Intensitäten normierte Aufnahmen der Oberfläche vor und nach Zugabe einer $1 \cdot 10^{-10}$ M Antikörperlösung zu Epitop 2b. 70
- Abb. 4.9:** Typischer Intensitätsverlauf eines spezifisch an die Oberfläche gebundenen Moleküls E2a während des Bindungsvorgangs..... 71
- Abb. 4.10:** Scatchardauftragungen der Titrationskurven aus Abb. 4.2. a) Epitop 1, b) Epitop 3, c) Epitop 2a. Nur Epitop 2a zeigt einen deutlichen, linearen Funktionsverlauf. 73
- Abb. 4.11:** Abhängigkeit von Temperatur und Entlöschung von Epitop 1 und 2a 75
- Abb. 4.12:** Durch enzymatische Entfernung von Sauerstoff konnte die Zerstörung von Epitop 1 deutlich verlangsamt werden. 76
- Abb. 4.13:** Fluoreszenzverhalten $1 \cdot 10^{-10}$ M Lösungen der Epitope 1, 2a und 3 nach 20stündiger Lagerung bei Raumtemperatur. 77
- Abb.4.13:** a) Zugabe des Antikörpers zu frischem Epitop und anschließende 20stündige Inkubation. Während das freie Epitop zerstört ist, ist der Immunkomplex stabil. b) wird der Antikörper zu bereits fluoreszenzextingierten Epitopen gegeben, findet keine Bindung mehr statt. 78
- Tabelle 4.3:** Strukturvorschläge der Epitope im Vergleich durch GOR IV..... 83
- Tabelle 4.4:** Strukturvorschläge für Epitop 2a und 2b durch NNPREICT 83
- Abb. 4.14:** Schematischer Aufbau des Assays zur quantitativen Bestimmung von Proteinen aus humanem Serum..... 86

- Abb.4.15:** a) Digitale Aufnahme stark fluoreszierender Beads entsprechend dem Maximalbereich von b). b) Typischer Verlauf des rom- Wertes für eine Titration mittels einschrittigem Nachweis, hier am Beispiel der Optimierung auf eine $1 \cdot 10^{-8}$ molare IGF-Lösung..... 87
- Abb. 4.16:** Auf verschiedene IGF-Konzentrationen optimierte Titrationsreihen im Bereich von $3 \cdot 10^{-9}$ bis $8 \cdot 10^{-10}$ M IGF. 89
- Abb. 4.17:** Links: Immunochip bestehend aus drei Messeinheiten mit je fünf tropfenförmigen Messzellen. Rechts: fluoreszenzspektroskopische Aufnahme von $2,8 \mu\text{m}$ Beads in einer Messzelle..... 89
- Abb. 4.18:** Unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Titrationskurven für $1 \cdot 10^{-8}$ M und $8 \cdot 10^{-9}$ M dAB..... 91
- Abb. 4.19:** Schematischer Aufbau des Assays zum Nachweis von p53 Autoantikörpern. Die Arbeitsschritte sind von links nach rechts abgebildet... 92
- Abb. 4.20:** a)-d) Abbildung im Bereich zwischen 1500 und 2200 counts/pixel der Aufnahmen von E4a gecoateten Beads, die mit verschiedenen Seren inkubiert wurden..... 94
- Abb. 4.21:** Reaktion verschiedener Seren auf die Epitope 2a, 4 und 4a. Die rom- Werte der Beadreferenz wurde jeweils von den für die Proben erhaltenen abgezogen 95
- Abb. 4.22:** Stärke der Immunreaktion der Seren auf die verschiedenen Epitope. 96
- Abb. 4.23:** Verteilung der positiven und negativen Reaktionen auf die verschiedenen Epitope. Links: positive Signale nach Intensität verteilt, rechts nur positiv/negativ-Vergleich. 97

7.5. Literaturverzeichnis

Agati, G. und F. Fusi, "New trends in photobiology (invited review). Recent advances in bilirubin photophysics." *J Photochem Photobiol B* **7** (1990) 1: 1-14.

Agaylan, A., et al., "A highly sensitive particle agglutination assay for the detection of P53 autoantibodies in patients with lung cancer." *Cancer* **110** (2007) 11: 2502-2506.

Athar, H., et al., "Use of fluorescence enhancement technique to study bilirubin-albumin interaction." *Int J Biol Macromol* **25** (1999) 4: 353-8.

Axelrod, D., et al., "Total internal reflection fluorescent microscopy." *J Microsc* **129** (1983) Pt 1: 19-28.

Baker, K. N., et al., "Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies." *Trends in Biotechnology* **20** (2002) 4: 149-156.

Bangs Laboratories, I., "Data Sheet #644 Rev. #004." (2004).

Bernstein, F. C., et al., "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." *J Mol Biol* **112** (1977) 3: 535-42.

Blackburn, G. F., et al., "Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics." *Clin Chem* **37** (1991) 9: 1534-9.

Bourdon, J. C., "p53 and its isoforms in cancer." *Br J Cancer* **97** (2007) 3: 277-82.

Clark, R. G., "Recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I): risks and benefits of normalizing blood IGF-I concentrations." *Horm Res* **62 Suppl 1** (2004): 93-100.

Clemmons, D. R., "Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer." *Nat Rev Drug Discov* **6** (2007) 10: 821-33.

Colletti, R. B., et al., "Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor I in patients with breast cancer." *Cancer Res* **49** (1989) 7: 1882-4.

Combet, C., et al., "NPS@: network protein sequence analysis." *Trends Biochem Sci* **25** (2000) 3: 147-50.

Cory, S. und J. M. Adams, "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* **2** (2002) 9: 647-56.

Cu, A., et al., "Letter: On the fluorescence of bilirubin." *J Am Chem Soc* **97** (1975) 9: 2579-80.

D'Ercole, A. J., et al., "Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (1984) 3: 935-9.

D'Orazi, G., et al., "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis." *Nat Cell Biol* **4** (2002) 1: 11-9.

Dowell, S. P., et al., "Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens." *Cancer Res* **54** (1994) 11: 2914-8.

Drexhage, K. H., in: F. Schäfer: *Topics in Applied Physics Vol. 1*, 144-179, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1977.

el-Deiry, W. S., "Regulation of p53 downstream genes." *Semin Cancer Biol* **8** (1998) 5: 345-57.

Engvall, E., et al., "Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes." *Biochim Biophys Acta* **251** (1971) 3: 427-34.

Evans, D. F., "Perturbation of Singlet-Triplet Transitions of Aromatic Molecules by Oxygen under Pressure." *Journal of the Chemical Society* (1957) Mar: 1351-1357.

Förster, T., "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Ann. Physik.* **55** (1948) 2: 21.

Fouquet, C., et al., "Rapid and sensitive p53 alteration analysis in biopsies from lung cancer patients using a functional assay and a universal oligonucleotide array: a prospective study." *Clin Cancer Res* **10** (2004) 10: 3479-89.

Frankel, S., et al., "Childhood energy intake and adult mortality from cancer: the Boyd Orr Cohort Study." *Bmj* **316** (1998) 7130: 499-504.

Garnier, J., et al., "GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence." *Methods Enzymol* **266** (1996): 540-53.

Hankinson, S. E., et al., "Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer." *Lancet* **351** (1998) 9113: 1393-6.

Harris, C. C., "p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment." *Science* **262** (1993) 5142: 1980-1.

Heidelberger, M. und F. E. Kendall, "A Quantitative Study of the Precipitin Reaction between Type III Pneumococcus Polysaccharide and Purified Homologous Antibody." *J Exp Med* **50** (1929) 6.

Hemmila, I., "Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays." *Clin Chem* **31** (1985) 3: 359-70.

Hendrix, M. J., "De-mystifying the mechanism(s) of maspin." *Nat Med* **6** (2000) 4: 374-6.

Holly, J. M. und J. A. Wass, "Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments." *J Endocrinol* **122** (1989) 3: 611-8.

Holt, L. A., et al., "The photodecomposition of tryptophan peptides." *Biochim Biophys Acta* **499** (1977) 1: 131-8.

Invitrogen und Dynal, "Product Information Dynabead(R) M280- Streptavidine." (2006).

Johnson, I. D., Davidson Michael W. (2007), from <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>.

Jones, G., et al., "Photoinduced Electron-Transfer for Pyrenesulfonamide Conjugates of Tryptophan-Containing Peptides - Mitigation of Fluoroprobe Behavior in N-Terminal Labeling Experiments." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5** (1995) 20: 2385-2390.

Karasik, A., et al., "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-2 are increased in cyst fluids of epithelial ovarian cancer." *J Clin Endocrinol Metab* **78** (1994) 2: 271-6.

Kikuchi, K., et al., "New Aspects on Fluorescence Quenching by Molecular-Oxygen." *Journal of the American Chemical Society* **115** (1993) 12: 5180-5184.

Kneller, D. G., et al., "Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network." *J Mol Biol* **214** (1990) 1: 171-82.

Knemeyer, J. P., et al., "Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level." *Anal Chem* **72** (2000) 16: 3717-24.

Koskinen, J. O., et al., "Anovel separation-free assay technique for serum antibodies using antibody bridging assay principle and two-photon excitation fluorometry." *Journal of Immunological Methods* **309** (2006) 1-2: 11-24.

Krasner, J. und S. J. Yaffe, "The automatic titration of bilirubin." *Biochem Med* **7** (1973) 1: 128-34.

Kress, M., et al., "Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum." *J Virol* **31** (1979) 2: 472-83.

Krichevsky, O. und G. Bonnet, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications." *Reports on Progress in Physics* **65** (2002) 2: 251-297.

Lai, C. L., et al., "Presence of serum anti-p53 antibodies is associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients." *Clin Cancer Res* **4** (1998) 12: 3025-30.

Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.

Lane, D. P., "Cancer. p53, guardian of the genome." *Nature* **358** (1992) 6381: 15-6.

Lane, D. P. und L. V. Crawford, "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278** (1979) 5701: 261-3.

Laudanski, J., et al., "Prognostic value of serum p53 antibodies in patients with resected non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **22** (1998) 3: 191-200.

Lin, J., et al., "Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein." *Genes Dev* **8** (1994) 10: 1235-46.

Linzer, D. I. und A. J. Levine, "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* **17** (1979) 1: 43-52.

Liu, L., et al., "p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage." *Mol Cell Biol* **19** (1999) 2: 1202-9.

Löffler, G., et al., *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin, 2003.

Lubin, R., et al., "Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface." *Cancer Res* **53** (1993) 24: 5872-6.

Lubin, R., et al., "Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer." *Nat Med* **1** (1995) 7: 701-2.

Magde, D., et al., "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization." *Biopolymers* **13** (1974) 1: 29-61.

Marston, N. J., et al., "Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function." *Oncogene* **9** (1994) 9: 2707-16.

McClelland, J. L. und D. E. Rumelhart, *Explorations in Parallel Distributed Processing*, MIT Press, Cambridge, 1988.

Merkel, P. B. und D. R. Kearns, "Radiationless Decay of Singlet Molecular Oxygen in Solution. An Experimental and Theoretical Study of Electronic-to-Vibrational Energy Transfer." *J Am Chem Soc* **94** (1972) 21.

Michaeli, A. und J. Feitelson, "Reactivity of singlet oxygen toward large peptides." *Photochem Photobiol* **61** (1995) 3: 255-60.

Moerner, W. E. und L. Kador, "Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid." *Phys Rev Lett* **62** (1989) 21: 2535-2538.

Moll, U. M. und L. M. Schramm, "p53--an acrobat in tumorigenesis." *Crit Rev Oral Biol Med* **9** (1998) 1: 23-37.

Moll, U. M., et al., "Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53." *Curr Opin Cell Biol* **17** (2005) 6: 631-6.

Morgan, E. L. und W. O. Weigle, "Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin." *Adv Immunol* **40** (1987): 61-134.

Moschos, S. J. und C. S. Mantzoros, "The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications." *Oncology* **63** (2002) 4: 317-32.

Murray, P. V., et al., "Serum p53 antibodies: predictors of survival in small-cell lung cancer?" *Br J Cancer* **83** (2000) 11: 1418-24.

Neuweiler, H., "Synthesis, Spectroscopic Characterization, and Molecular Dynamics Simulation of Fluorescently Labeled Peptides for Single-Molecule Detection of p53 Antibodies", Inaugural Dissertation, Heidelberg (2002).

Neuweiler, H., et al., "Detection of individual p53-autoantibodies by using quenched peptide-based molecular probes." *Angew Chem Int Ed Engl* **41** (2002) 24: 4769-73.

Newcomer, H. S., "Absorption spectra of acid hematin, oxyhemoglobin and carbon monoxide hemoglobin. A new hemoglobinometer." *J Biol Chem* **37** (1919) 3.

Nilsson, R., et al., "Unambiguous evidence for the participation of singlet oxygen (1O_2) in photodynamic oxidation of amino acids." *Photochem Photobiol* **16** (1972) 2: 117-24.

O'Connor, T. und J. P. Gosling, "Antibody affinity and the detection limit of solid-phase enzyme immunoassay." *Biochem Soc Trans* **26** (1998) 1: S42.

Oellerich, M., "Enzyme-immunoassay: a review." *J Clin Chem Clin Biochem* **22** (1984) 12: 895-904.

Ohki, R., et al., "Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase." *J Biol Chem* **275** (2000) 30: 22627-30.

Pietsch, E. C., et al., "Polymorphisms in the p53 pathway." *Oncogene* **25** (2006) 11: 1602-11.

Portefaix, J. M., et al., "Detection of anti-p53 antibodies by ELISA using p53 synthetic or phage-displayed peptides." *J Immunol Methods* **259** (2002) 1-2: 65-75.

Renehan, A. G., et al., "High-risk colorectal adenomas and serum insulin-like growth factors." *Br J Surg* **88** (2001) 1: 107-13.

Rigler, R. und M. Ehrenberg, "Fluorescence relaxation spectroscopy in the analysis of macromolecular structure and motion." *Q Rev Biophys* **9** (1976) 1: 1-19.

Robert-Koch-Institut (2006). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. RKI. Saarbrücken.

Rosenfeld, M. R., et al., "Serum anti-p53 antibodies and prognosis of patients with small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **89** (1997) 5: 381-5.

Sakaguchi, K., et al., "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." *Genes Dev* **12** (1998) 18: 2831-41.

Scatchard, G., "The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions." *Annals of the New York Academy of Sciences* **51** (1949) 4: 660-672.

Scheffler, Silvia; Sauer, Markus; Neuweiler, Hannes, "Monitoring antibody binding events in homogeneous solution by single-molecule fluorescence spectroscopy." *Z phys Chem* **219** (2005) 5: 19.

Schlichtholz, B., et al., "The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot." *Cancer Res* **52** (1992) 22: 6380-4.

Schlichtholz, B., et al., "Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein." *Br J Cancer* **69** (1994) 5: 809-16.

Shaneyfelt, T., et al., "Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis." *J Clin Oncol* **18** (2000) 4: 847-53.

Sharpless, N. E. und R. A. DePinho, "p53: good cop/bad cop." *Cell* **110** (2002) 1: 9-12.

Shera, E. B., et al., "Detection of Single Fluorescent Molecules." *Chemical Physics Letters* **174** (1990) 6: 553-557.

Simat, T. J. und H. Steinhart, "Oxidation of Free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins." *J Agric Food Chem* **46** (1998) 2: 490-498.

Soussi, T., "p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review." *Cancer Res* **60** (2000) 7: 1777-88.

Soussi, T. und P. May, "Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look." *J Mol Biol* **260** (1996) 5: 623-37.

Stryer, L. und R. P. Haugland, "Energy transfer: a spectroscopic ruler." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58** (1967) 2: 719-26.

Tlsty, T. D., "Genomic instability and its role in neoplasia." *Curr Top Microbiol Immunol* **221** (1997): 37-46.

Tonegawa, S., "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302** (1983) 5909: 575-81.

Tyagi, S. und F. R. Kramer, "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." *Nat Biotechnol* **14** (1996) 3: 303-8.

Van Weemen, B. K. und A. H. Schuurs, "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." *FEBS Lett* **15** (1971) 3: 232-236.

Vennegoor, C. J., et al., "Autoantibodies to p53 in ovarian cancer patients and healthy women: a comparison between whole p53 protein and 18-mer peptides for screening purposes." *Cancer Lett* **116** (1997) 1: 93-101.

Vogelstein, B., et al., "Surfing the p53 network." *Nature* **408** (2000) 6810: 307-10.

Vousden, K. H., "p53: death star." *Cell* **103** (2000) 5: 691-4.

Vousden, K. H. und D. P. Lane, "p53 in health and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8** (2007) 4: 275-83.

Wahl, G. M., et al., "Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control." *Cancer Surv* **29** (1997): 183-219.

Williamson, M. P., "The structure and function of proline-rich regions in proteins." *Biochem J* **297** (Pt 2) (1994): 249-60.

Yalow, R. S. und S. A. Berson, "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *J Clin Invest* **39** (1960): 1157-75.

Yan, G., et al., "Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of p53 antibodies in human serum." *J Immunol Methods* **288** (2004) 1-2: 47-54.

Yang, H., et al., "Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool. ECL detection technology promises scientists new "yardsticks" for quantification." *Biotechnology (N Y)* **12** (1994) 2: 193-4.

Yee, D., et al., "Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer." *Mol Endocrinol* **3** (1989) 3: 509-17.

Yu, J. und L. Zhang, "No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis." *Cancer Cell* **4** (2003) 4: 248-9.

Zalcman, G., et al., "Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment." *Clin Cancer Res* **4** (1998) 6: 1359-66.

Zalcman, G., et al., "Prognostic significance of serum p53 antibodies in patients with limited-stage small cell lung cancer." *Int J Cancer* **89** (2000) 1: 81-6.

Zhang, J. R., et al., "Laser-induced multiphoton fluorescence of hemoglobin." *J Photochem Photobiol B* **1** (1988) 3: 329-35.

7.6. Verzeichnis der Veröffentlichungen

S. Scheffler, M. Sauer, H. Neuweiler, Monitoring antibody binding events in homogeneous solution by single molecule fluorescence spectroscopy, *Z. Phys. Chem.* 219 (5), 665-678 (2005).

H. Neuweiler, S. Scheffler, M. Sauer, Development of a Homogeneous Assay Format for p53 Antibodies Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Proceedings of SPIE* 5862, 2005.

S. Scheffler, D. Strauß, M. Sauer, Highly sensitive detection of target molecules using a new fluorescence-based bead assay, *Proceedings of SPIE* 6633, 2007.

Research described in this article was supported by Philip Morris USA Inc. and Philip Morris International.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Markus Sauer für die Vergabe des spannenden Themas und seine stetige Unterstützung bedanken, die die Arbeit der letzten drei Jahre sehr angenehm gemacht haben.

Diese Arbeit konnte nur mit Hilfe vieler produktiver Gespräche und Diskussionen mit den Kollegen des Arbeitsbereichs „Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie“ entstehen, bei denen ich mich an dieser Stelle nicht nur für den fachlichen Austausch, sondern auch für das gute Arbeitsklima bedanken möchte. Sowohl Dr. Sören Doose und Dr. Hannes Neuweiler, ohne den ich diese Arbeit nie angefertigt hätte, gilt mein besonderer Dank. Beide standen mit Rat zur Seite und beantworteten geduldig sogar Fragen, deren Antwort ich eigentlich kannte.

Mein Dank gilt auch Reinhild Pätzmann, Dr. Gerd Wiebusch, Stefan Wörmer und Dr. Rudolf Böttner für technische Hilfe und organisatorische Unterstützung.

Wilko Greschner und Denis Strauß danke ich für ihre experimentellen Arbeiten zur IGF-Assay-Entwicklung.

Für die Bereitstellung von Geräten und guten Ratschläge bei biochemischen Fragen bedanke ich mich bei Dr. Herbert Wenzel und Rainer Beckmann des Arbeitskreises Biochemie III der Universität Bielefeld. Carola Eck danke ich für die massenspektrometrische Vermessung von Proben und wertvolle Hinweise zur Durchführung von ELISAs.

Danke an Dr. Klaus Wojczykowski und Dr. Diana Nakunst, die in den letzten Wochen ihre Freizeit für die Korrektur dieser Arbeit geopfert haben und an Silvia Bühlmeier, die mir seit Jahrzehnten in jeder Lebenslage zur Seite steht.

Vielen Dank allen, die an dieser Stelle nicht namentlich erwähnt sind, die mich aber fachlich und persönlich in den letzten Jahren unterstützt und begleitet haben. Vielen Dank Euch allen, für viele Kaffees mit und ohne fachlichen Small Talk, für ehrliche Worte, für aufbauende Worte, für gute Ideen, für...

Mein größter und uneingeschränkter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie.