

Eine neue fluoreszenzbasierte Methode
zur Detektion von Antikörperdimeren
in aus Antikörpermonomeren
bestehenden Proben

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Thomas Sorkalla
aus
Wesseling

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Häberlein

2. Gutachter: Prof. Dr. G.M. König

Tag der Promotion: 27. September 2012

Erscheinungsjahr 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Antikörper	2
1.1.1 Immunglobulinklassen	3
1.1.1.1 Immunglobulin A (IgA)	3
1.1.1.2 Immunglobulin D (IgD)	3
1.1.1.3 Immunglobulin E (IgE)	3
1.1.1.4 Immunglobulin M (IgM)	3
1.1.1.5 Immunglobulin G (IgG)	4
1.1.2 Immunglobulinpräparate	5
1.1.2.1 ABT-325	10
1.1.3 Antikörperaggregation	11
1.2 Fluoreszenz	12
1.2.1 Helligkeit	13
1.2.2 Fotostabilität	13
1.2.3 Alexa Fluor® 532	14

1.2.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	15
1.2.4.1	Prinzip	16
1.2.4.2	Versuchsaufbau	17
1.2.4.3	Mathematischer Hintergrund	19
1.2.5	Photonenzählhistogramm (PCH)	20
1.2.5.1	Mathematischer Hintergrund	21
1.2.5.2	Anpassung für reale Messungen	22
1.2.6	Einzelereigniserkennung	24
2	Zielsetzung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Chemikalien, Matrices, Puffer	28
3.2	Geräte	31
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopischer Versuchsaufbau	31
3.2.2	Absorptionsspektroskopie	32
3.2.3	Emissionsspektroskopie	32
3.2.4	Größenausschlusschromatographie	33
3.2.5	Massenspektrometrie	33
3.3	Antikörper	34
3.3.1	ABT-325	34
3.3.1.1	Identität	34
3.3.2	ABT-325-BS ³ Dimer	34
3.3.2.1	Synthese	34
3.3.2.2	Aufreinigung	35
3.3.2.3	Identität	35
3.3.3	Alexa-ABT-325	35
3.3.3.1	Synthese	35
3.3.3.2	Aufreinigung	36

3.3.3.3	Identität	37
3.3.3.4	Labeleffizienz	37
3.3.3.5	Verteilung der Fluoreszenzlabel	37
3.3.3.6	Fotostabilität von Alexa Fluor® 532	38
3.3.4	Alexa-ABT-325-BS ³ Dimer	39
3.3.4.1	Synthese	39
3.3.4.2	Aufreinigung	40
3.3.4.3	Identität	40
3.4	FCS-Untersuchungen	41
3.4.1	Justage	41
3.4.2	Auswahl der Laserleistung	42
3.4.3	Adsorption von Alexa-ABT-325	42
3.4.4	Alexa-ABT-325	42
3.4.5	Alexa-ABT-325-BS ³ Dimer	43
3.4.6	Alexa-ABT-325 nach Lagerung	43
3.5	PCH-Untersuchungen	45
3.5.1	Alexa-ABT-325	45
3.5.2	Simulation von PCH-Daten	45
3.6	Einzelereigniserkennung von Alexa-ABT-325	46
3.7	Eine neue Methode für die Auswertung von Autokorrelationskurven (ACC)	47
3.7.1	Simulation der Kalibrierdaten	47
3.7.2	Erstellung der Kalibrierkurve	48
3.7.3	Überprüfung der Richtigkeit der neuen Auswertungsmethode mit Antikörperkontrollproben	49
3.7.3.1	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Alexa-ABT-325	51
4.1.1	Synthese und Aufreinigung	51

4.1.2	Labeleffizienz und -verteilung	54
4.1.3	Identität	56
4.2	ABT-325-BS ³ Dimere	57
4.2.1	Synthese und Aufreinigung	57
4.2.2	Identität	58
4.3	Alexa-ABT-325-BS ³ Dimere	59
4.3.1	Synthese und Aufreinigung	59
4.3.2	Identität	60
4.3.3	Theoretische Betrachtung zur Labelverteilung	61
4.4	Fotophysikalische Eigenschaften von Alexa-ABT-325	64
4.4.1	Absorption	64
4.4.2	Emission	64
4.4.3	Fotostabilität	65
4.4.3.1	Laserleistung	66
4.4.3.2	Stabilität	68
4.5	Fluoreszenzmikroskopische Messungen von Alexa-ABT-325	69
4.5.1	Adsorption	69
4.5.2	Intensitätsspuren	71
4.5.3	FCS	72
4.5.4	PCH	73
4.5.4.1	Auswertung gemessener Daten	74
4.5.4.2	Auswertung simulierter Daten	76
4.5.5	Einzelereigniserkennung	78
4.6	Eine neue Methode für die Auswertung von ACCs	80
4.6.1	Prinzip der neuen Auswertungsmethode	80
4.6.2	Kontrollversuche zum Nachweis von IgG Dimeren	85
4.6.3	Messergebnisse der eingelagerten Proben	87

5	Diskussion	91
5.1	Methoden der Antikörperaggregatdetektion	92
5.1.1	Nicht-fluoreszenzbasierte Methoden	92
5.1.2	Fluoreszenzbasierte Methoden	93
5.1.2.1	FCS	96
5.1.2.2	PCH	97
5.1.2.3	Einzelereigniserkennung	98
5.1.2.4	Weitere fluoreszenzbasierte Methoden	99
5.2	Eine neue Methode für die ACC Auswertung	101
5.3	Ausblick	104
	 Abbildungsverzeichnis	 105
	 Tabellenverzeichnis	 112
	 Literaturverzeichnis	 114
6	Anhang	123
6.1	Weitere Formeln, die den Verlauf des zweiten Anteils beschreiben	124
6.2	Publikationen	125
6.3	Eidesstattliche Erklärung	126
6.4	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absorption
ACC	Autokorrelationskurve
ACF	Autokorrelationsfunktion
ACN	Acetonitril
Alexa	Alexa Fluor [®] 532
Alexa-ABT-325	Alexa Fluor [®] 532 markierter ABT-325
APD	Lawinenphotodiode
BS³	Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat
bzw.	beziehungsweise
c	Stoffmengenkonzentration
C_H	konstante Domäne der schweren Antikörperkette
C_L	konstante Domäne der leichten Antikörperkette
Da	Dalton $1 Da = 1,66 \times 10^{-24} g$
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
ε	Extinktionskoeffizient
et al.	und andere
Fab	antigenbindendes Antikörperfragment
F(ab')₂	bivalentes antigenbindendes Antikörperfragment
Fc	kristallisierbares Antikörperfragment
FCA	Fluorescence Cumulant Analysis

FCCS	Kreuzkorrelationsspektroskopie
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FIDA	Fluorescence Intensity Distribution Analysis
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin
k	Boltzmann-Konstante ($1,38 \times 10^{-23} J/K$)
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante in <i>M</i>
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation in s^{-1}
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante der Bindung in $M^{-1}s^{-1}$
κ	Labeleffizienz
λ	Wellenlänge
M	molar, (<i>mol/L</i>)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	matrixunterstützte Laser-Desorption/-Ionisation
MDE	molekulare Detektionseffizienz
Met	Methionin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Massenspektrometrie
N_A	Avogadrokonstante $6,02214179 \times 10^{23} mol^{-1}$
n.a.	nicht auswertbar
¹O₂	Singuletsauerstoff
³O₂	Triplettsauerstoff
ω₀	Radius des Laserfokus
OD	Graufilter
PAID	Photon Arrival-Time Interval Distribution

PBS	phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
PCH	Photonenzählhistogramm
PDB	RCSB Protein Data Bank
Q	Fluoreszenzquantenausbeute
R	universelle Gaskonstante $\left(8,314472 \frac{J}{molK}\right)$
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
σ	Absorptionsquerschnitt
S_n	Singulettzustand
T₁	Tripletzustand
TFA	Trifluoressigsäure
TMR	Tetramethylrhodamin
TOF	Flugzeitanalyse
TTTR	zeitmarkiert, zeitaufgelöst
u.a.	unter anderem
V_H	variable Domäne der schweren Antikörperkette
V_L	variable Domäne der leichten Antikörperkette
z.B.	zum Beispiel

Es wurden außerdem die gesetzlichen Einheiten nach DIN 1301, DIN 5493, ISO 1000: 11.92 und ISO 31-0 bis ISO 31-XIII verwendet.

Zusammenfassung

Antikörper haben die Eigenschaft, mit der Zeit zu aggregieren, was zu einem Aktivitätsverlust und einer immunologischen Reaktion beim Patienten führen kann. Steuerbare Faktoren, die eine Aggregatbildung wesentlich beeinflussen, sind z.B. Lagertemperatur, Primärpackmittel und Matrixzusammensetzung. Das Ziel der Stabilitätsprüfung ist eine möglichst frühe Erkennung von Antikörperaggregaten idealerweise im Bereich der Dimerbildung von kleiner 5%. Dies erfordert besonders sensitive und nicht invasive Untersuchungsmethoden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein fluoreszenzmikroskopischer Ansatz verfolgt mit der Aufzeichnung von zeitmarkierten, zeitaufgelösten (TTTR) Daten und Auswertungen mittels Photonenzählhistogramm (PCH), Einzelereigniserkennung sowie über die Erstellung von Autokorrelationskurven (ACC) und Anwendung von Autokorrelationsfunktionen (ACF). Als Probe wurde das IgG ABT-325 verwendet, welches mit Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester fluoreszenzmarkiert wurde (Alexa-ABT-325). TTTR-Daten können in Bezug auf unterschiedliche Helligkeiten oder Diffusionsgeschwindigkeiten der beteiligten Partikel ausgewertet werden. Für die Diskriminierung zwischen Monomeren und Dimeren ergaben sich folgende Probleme. Die mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bestimmten Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Monomer}} = 3,20 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ für das Monomer und $D_{\text{Dimer}} = 2,30 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ für das Dimer ermöglichten keine hinreichende Differenzierung im Gemisch, da für diese mindestens der Faktor 1,6 zwischen den Diffusionskoeffizienten notwendig ist. Die Anzahl der Label von Alexa-

ABT-325 ist poissonverteilt. Die theoretischen Berechnung für Alexa-ABT-325 Dimere zeigt, dass sich die Verteilungen der Anzahl von Labeln pro Partikel für Monomere und Dimere überschneiden. Wegen dieser Überschneidung der Verteilungen können auch die PCH und die Einzelereigniserkennung nicht zwischen Alexa-ABT-325 Monomer- und Dimeranteilen in einer Probe unterscheiden.

Daher wurde eine neue Methode für die Auswertung der TTTR-Daten entwickelt. Mit dieser werden TTTR-Daten autokorreliert und mittels einer ACF mit zwei festgesetzten Wendepunkten gefittet. Der erste Wendepunkt stellt die Diffusionszeitkonstante des Alexa-ABT-325 Monomers dar. Der zweite Wendepunkt ging mit 100 logarithmisch verteilten Werten zwischen 0,1 s und 1 s in die Auswertung ein. Die sich ergebenden Anteile für die zweite Fraktion werden über den zweiten Wendepunkten aufgetragen und mit einer einfachen Potenzfunktion gefittet. Der Wert des Faktors der Potenzfunktion (c Wert) wird mit einer Kalibrierkurve aus simulierten Daten mit bekannten Dimeranteilen verglichen. Die neue Auswertungsmethode benötigt die bestmöglichen Fluoreszenzfluktuationsdaten, die durch die Verwendung kleiner Konzentrationen, langer Messdauern und einer Laserleistung, die nicht zu Sättigungseffekten bei Alexa Fluor[®] 532 führte, erzeugt wurden.

Die Überprüfung der neuen Auswertungsmethode erfolgte durch die Vermessung von Proben, in denen definierte Mengen an Antikörperdimeren erzeugt wurden. Abschließend wurden bei 4°C und 50°C gelagerte Alexa-ABT-325 Proben vermessen. Die bei 50°C gelagerten Proben wiesen schon in der Intensitätsspur sichtbare Aggregate auf, die allerdings zu zahlreich und groß waren, um die Proben mit der neuen Auswertungsmethode untersuchen zu können. Für die bei 4°C gelagerten Proben konnte eine signifikante Zunahme des Aggregatanteils nach sieben Tagen gezeigt werden, während er bei den ein, zwei und vier Tage gelagerten Proben annähernd gleich war.

1 Einleitung

1.1 Antikörper

Antikörper sind Glykoproteine mit einer konservierten, vierkettigen Struktur, bestehend aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. In der Klasse der Mammalia gibt es zwei Typen von leichten Ketten (κ und λ) und fünf Typen von schweren Ketten (α , δ , ϵ , γ und μ) [1], anhand derer die Antikörper in unterschiedliche Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) eingeteilt werden (Abbildung 1.1) [2]. Antikörper fungieren als spezifische Komponente der humoralen Immunantwort. Sie markieren Antigene durch spezifische Bindung für die Phagozytose oder cytotoxische und lytische Reaktionen durch Immunzellen [3].

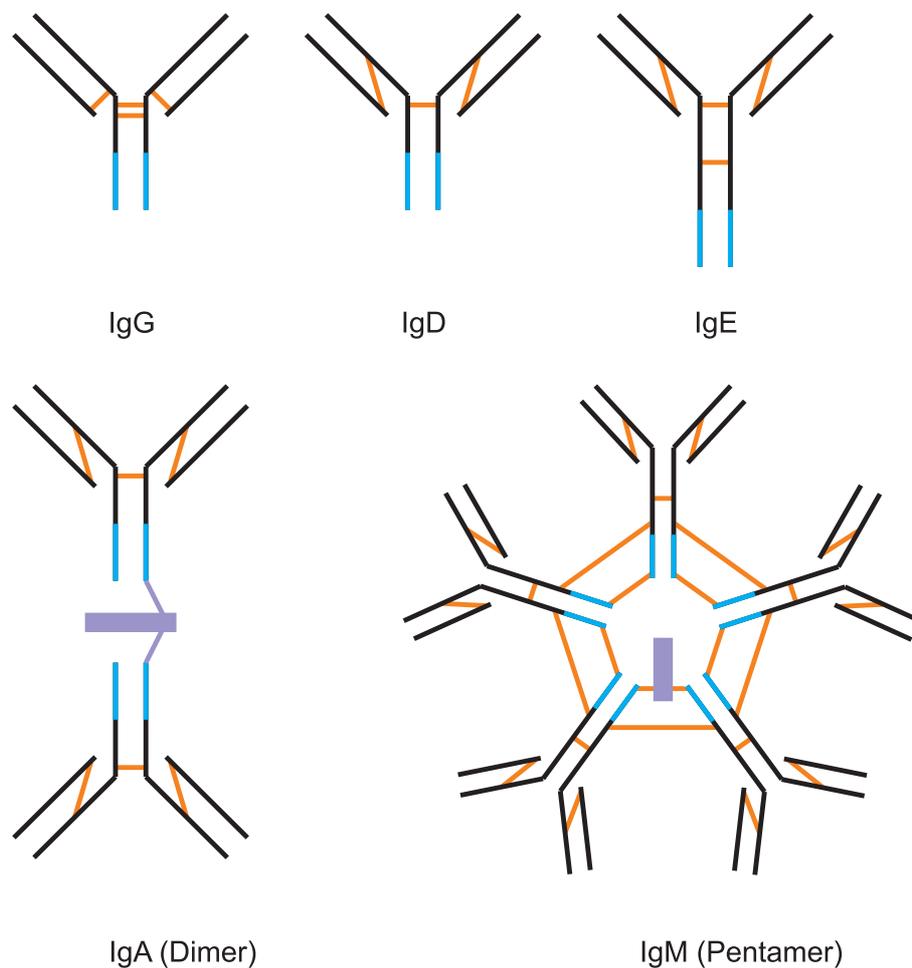


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen humanen Immunglobulin-Klassen mit der letzten Domäne des Fc-Teiles (blau), den Disulfidbrücken (orange) und den J-Ketten (lila), in Anlehnung an [4].

1.1.1 Immunglobulinklassen

1.1.1.1 Immunglobulin A (IgA)

IgA kommt u.a. im Serum, im Verdauungstrakt sowie in Körperflüssigkeiten wie Speichel und Schweiß vor. Es bildet die erste Abwehrlinie bei der lokalen Infektionsabwehr. IgA verhindert u.a. die Anheftung von Viren und Bakterien an die Oberflächen von Epithelien. Es gibt zwei IgA Subklassen IgA1 mit $\alpha 1$ und IgA2 mit $\alpha 2$ schweren Ketten. IgA1 und IgA2 haben beide ein Molekulargewicht von 160kDa . Annähernd 60% aller Immunglobuline sind IgAs, wobei der größere Anteil des IgAs sekretiert wird. IgA gibt es in einer monomeren und in einer dimeren Form. Die sekretorische, dimere Form hat ein Molekulargewicht von 400kDa [2, 5].

1.1.1.2 Immunglobulin D (IgD)

IgD kommt hauptsächlich als membrangebundener Antigenrezeptor in B-Lymphozyten vor. Es ist notwendig für die Differenzierung von B-Zellen in Plasma- und B-Gedächtniszellen. Das Molekulargewicht von IgD beträgt 180kDa [2, 6].

1.1.1.3 Immunglobulin E (IgE)

IgE kommt hauptsächlich auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten vor und hat eine Schutzfunktion gegen Parasiten. Es ist für die Auslösung allergischer Reaktionen verantwortlich. IgE hat ein Molekulargewicht von 190kDa [2, 7].

1.1.1.4 Immunglobulin M (IgM)

IgM kommt in einer monomeren Form mit einem Molekulargewicht von 180kDa als Antigenrezeptor auf B-Zellen vor. In einer pentameren Form mit einem Molekulargewicht von 900kDa kommt es fast ausschließlich im Blut vor [2, 8]. IgM ist besonders aktiv gegen Mikroorganismen.

1.1.1.5 Immunglobulin G (IgG)

IgG ist der wichtigste Antikörper in der sekundären Immunantwort. Er kann das Komplementsystem zur Abwehr von Mikroorganismen aktivieren. Seine Fab-Teile sind die antigenbindenden Arme des Antikörpers, der Fc-Teil bindet an Rezeptoren auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten. Die IgGs werden in vier Subklassen mit den schweren Ketten $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ oder $\gamma 4$ eingeteilt [9]. Ihre schweren Ketten werden in drei konstante (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) und eine variable (V_H) Domäne, ihre leichten Ketten in eine konstante (C_L) und eine variable (V_L) Domäne eingeteilt. Die Primärstruktur der vier Subklassen ist zu über 95 % identisch. In den Gelenkregionen gleicht sich die Aminosäuresequenz zu 60-70 % [10]. IgG hat ein Molekulargewicht von 150kDa [1]. Bei einer limitierten Proteolyse von IgG mit Papain entstehen ein kristallisierbares (Fc) und zwei antigenbindende (Fab) Antikörperfragmente (Abbildung 1.2). Ein bivalentes antigenbindendes Antikörperfragment ($F(ab')_2$) und ein kleineres kristallisierbares Antikörperfragment entstehen bei einer limitierten Proteolyse von IgG mit Pepsin.

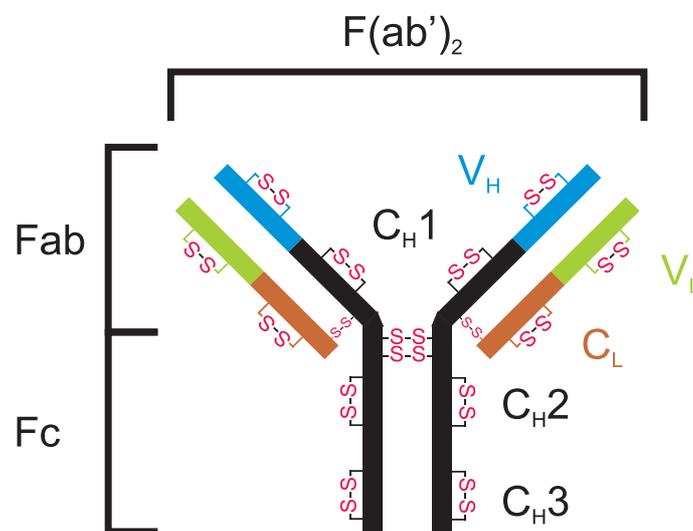


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines IgG1 mit Fc-, Fab- und $F(ab')_2$ -Fragmenten und den Domänen V_H (blau), V_L (grün), C_L (braun) und C_H (schwarz), in Anlehnung an [9].

Die Reihenfolge der Flexibilität zwischen den Fab-Armen der humanen IgG Subklassen ist $IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2$ [11], mit einem mittlerem Winkel zwischen den Fab-Armen von 136° (IgG3), 128° (IgG4), 127° (IgG2) und 117° (IgG1) [11]. Bei einem

IgG1 beträgt der Abstand zwischen den beiden Fab-Segmenten 118 Å und zwischen dem Ende des Fc-Teils und den hypervariablen Regionen 108 Å bzw. 126 Å [12].

1.1.2 Immunglobulinpräparate

Die therapeutische Verwendung von Antikörpern hat mit der Neutralisation von Bakterientoxinen begonnen [13]. Heute werden Antikörper für eine wachsende Anzahl an Indikationen eingesetzt. Zu nennen sind hier beispielsweise rheumatoide Arthritis (Adalimumab) [14], Morbus Crohn (Infliximab) [14–18], Psoriasis (Ustekinumab) [19] und die immunsuppressive Behandlung (Basiliximab) [20]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Neutralisation von Antikörpern gegen rote Blutkörperchen der Blutgruppe Rhesus positiv durch anti-D IgG [21]. Monoklonale Antikörperpräparate, die eine Zulassung erhalten haben, sind in der Tabelle 1.1 nach Paul-Ehrlich-Institut (Stand vom 7.7.2011 [22]) dargestellt.

Tabelle 1.1: Monoklonale Antikörperpräparate mit einer Zulassung nach Paul-Ehrlich-Institut.

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
Arzerra [®]	Ofatumumab, chronische lymphatische Leukämie	Glaxo Group Ltd.	EU/1/10/625/-001-002
Avastin [®]	Bevacizumab, Zytostatikum	Roche Registration Ltd.	EU/1/04/300/-001-002
Cimzia [®]	Certolizumab, Antirheumatikum	UCB Pharma S.A., Brüssel, Belgien	EU/1/09/544/-001-002
Erbix [®]	Cetuximab, Anti-EGFR	Merck	EU/1/04/-281/001
Herceptin [®]	Trastuzumab, Anti-HER2	Roche Registration Ltd.	EU/1/00/-145/001
Humira [®]	Adalimumab, Anti-TNF- α	Abbott Laboratories, UK Ltd.	EU/1/03/256/-001-010

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
Ilaris [®]	Canakinumab, Anti-IL-1 β	Novartis Europharm Limited, UK	EU/1/09/564/- 001-002
Leukoscan	Sulesomab, Anti-Glykoprotein NCA90	IMMUNO- MEDICS Europe	EU/1/97/- 032/001
Lucentis [®]	Ranibizumab, Anti-VEGF	Novartis Europharm Ltd.	EU/1/06/- 374/001
MabCampath [®]	Alemtuzumab, Anti-CD52	Genzyme Europe BV	EU/1/01/193/- 001-002
MabThera [®]	Rituximab, Anti-CD20	Roche Registration Ltd.	EU/1/98/067/- 001-002
Orthoclone OKT3 [®]	Muromonab, Anti-CD3	Janssen-Cilag GmbH	18a/88
Prolia [®]	Denosumab, Anti-RANKL	Amgen Europe B.V.	EU/1/10/618/- 001-004
REMICADE [®]	Infliximab, Anti-TNF- α	Centocor B.V., NL	EU/1/99/- 116/001
Removab [®]	Catumaxonab, Bispezifisch: anti-CD 3, anti-EpCAM	Fresenius Biotech GmbH	EU/1/09/512/- 001-002
ReoPro [®]	Abciximab, Anti-GPIIb/IIIa	Centocor B.V., NL	100a/94
ReoPro [®]	Abciximab, Anti-GPIIb/IIIa	MPA Pharma GmbH	PEI.H. 01051.01.1
Riloncept Regeneron	Anti-IL-1	Regeneron UK Limited	EU/1/09/- 582/001
RoActemra [®]	Tocilizumab, Anti-IL-6 Rezeptor	Roche Reg. Ltd.	EU/1/08/492/- 001-006
Scintimun [®]	Besilesomab, Anti-Granulozyten-Antikörper	CIS bio international, FR	EU/1/09/602/- 001-002
Simponi [®]	Golimumab, Anti-TNF- α	Centocor B.V., NL	EU/1/09/546/- 001-004
Simulect [®]	Basiliximab, Anti-CD25	Novartis Europharm Ltd.	EU/1/98/- 084/001
Soliris	Eculizumab, Anti-Komplement C5	Alexion Europe SAS	EU/1/07/- 393/001

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
STELARA [®]	Ustekinumab, IgG1K-Antikörper	Janssen-Cilag International NV	EU/1/08/494/- 001-004
Synagis [®]	Palivizumab, Anti-RS-Virus	Abbott Laboratories, UK Ltd.	EU/1/99/117/- 001-002
TYSABRI [®]	Natalizumab, Anti- α 4-Integrin	Elan Pharma International Ltd.	EU/1/06/- 346/001
Vectibix [®]	Panitumumab, Anti-EGFR	Amgen Europa B.V.	EU/1/07/423/- 001-003
Xolair [®]	Omalizumab, Anti-IgE	Novartis Europharm Ltd.	EU/1/05/319/- 001 - 010
Zevalin [®]	Ibritumomab-Tiuxetan, Anti-CD20	Schering AG	EU/1/03/- 264/001

Immunglobulinpräparate, die eine Zulassung besitzen, sind in der Tabelle 1.2 nach Paul-Ehrlich-Institut (Stand vom 7.7.2011 [22]) dargestellt.

Tabelle 1.2: Immunglobulinpräparate nach Paul-Ehrlich-Institut, die eine Zulassung besitzen.

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
Beriglobin [®]	Normales Ig vom Menschen	CSL Behring GmbH	176a/92
Berirab [®]	Tollwut-Ig	CSL Behring GmbH	107a/89
Biseko [®]	Humanes Normalserumpräparat	Biotest Pharma GmbH	32a/78
Cytotect [®] Biotest	Cytomegalie-Ig	Biotest Pharma GmbH	17a/93
Cytotect [®] CP Biotest	Cytomegalie-Ig	Biotest Pharma GmbH	6a/96

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
Flebogamma [®] 5 %	Normales Ig vom Menschen	Grifols Deutschland GmbH	526a/91
Flebogamma [®] dif	Normales Ig vom Menschen	Instituto Grifols, S.A.	EU/1/07/404/ 001-005
Gammagard [®] S/D	Normales Ig vom Menschen	Baxter Deutschland GmbH	186a/92
Gammanorm [®]	Normales Ig vom Menschen	Octapharma GmbH	PEI.H. 03070.01.1
Gamunex [®] 10 %	Normales Ig vom Menschen	Talecris Biotherapeutics GmbH	PEI.H. 02726.01.1
Hepatect [®] CP	Hepatitis-B-Ig	Biotest Pharma GmbH	72a/96
Hepatitis-B-Ig Behring	Hepatitis-B-Ig	CSL Behring GmbH	105a/89
Ig Vena 50 g/L Infusionslö- sung	Normales Ig vom Menschen	Kedrion S.p.A.	PEI.H. 03409.01.1
Intraglobin F [®]	Normales Ig vom Menschen	Biotest Pharma GmbH	198a/95
Intratect [®]	Normales Ig vom Menschen	Biotest Pharma GmbH	PEI.H. 02901.01.1
Intratect [®]	Normales Ig vom Menschen	CC Pharma GmbH	PEI.H. 07961.01.1
Intratect [®]	Normales Ig vom Menschen	EMRA-MED Arzneimittel GmbH	PEI.H. 03621.01.1
KIOVIG	Normales Ig vom Menschen	Baxter Deutschland GmbH	EU/1/05/329/ 001-005
Octagam [®] 10 %	Normales Ig vom Menschen (IVIg)	Octapharma GmbH	PEI.H. 03627.01.1
Octagam [®] 5 %	Normales Ig vom Menschen	Octapharma GmbH	PEI.H. 00187.01.1
Octagam [®] 50 mg/mL	Normales Ig vom Menschen	Octapharma GmbH	485a/93

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer
PARTOBULIN SDF	Anti-D-Ig	Baxter Deutschland GmbH	20a/88
Pentaglobin [®]	Ig vom Menschen	Biotest Pharma GmbH	170a/90
Privigen [®]	Normales Ig vom Menschen (IVig)	CSL Behring GmbH	EU/1/08/446/001-004
Rhesonativ [®]	Anti-D-Ig	Octapharma GmbH	PEI.H. 03287.01.1
Rhophylac [®] 200	Anti-D Ig vom Menschen	CSL Behring GmbH	PEI.H. 00399.03.1
Rhophylac [®] 300	Anti-D-Ig	CSL Behring GmbH	PEI.H. 00399.02.1
Sandoglobulin	Normales Ig vom Menschen	CSL Behring GmbH	124a/84
SUBCUVIA 160 g/L Injektionslösung	Normales Ig vom Menschen	Baxter Deutschland GmbH	16a/88
Tetagam [®] P	Tetanus-Ig	CSL Behring GmbH	108a/89
TETANOBULIN S/D	Tetanus-Ig	Baxter Deutschland GmbH	440/74
Tollwutglobulin Mérieux [®] P	Tollwut-Ig	Sanofi Pasteur MSD GmbH	13a/97
Varicellon [®]	Varicella Zoster-Ig	CSL Behring GmbH	101a/89
Varitect [®]	Varicella Zoster-Ig	Biotest Pharma GmbH	16a/93
Varitect [®] CP	Varicella Zoster-Ig	Biotest Pharma GmbH	203a/95
Vivaglobin [®]	Normales Ig vom Menschen	CSL Behring GmbH	PEI.H. 03095.01.1

1.1.2.1 ABT-325

ABT-325, der in dieser Arbeit exemplarisch untersuchte Antikörper, ist ein IgG1 mit einer κ leichten Kette [23], der für die IL-18 Neutralisation z.B. bei rheumatoider Arthritis eingesetzt wird [14]. ABT-325 zeigt Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung (k_{on}) und die Dissoziation (k_{off}) von $3,67 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ und $5,03 \times 10^{-5} s^{-1}$ und eine thermodynamische Dissoziationskonstante (K_D) von $140 pM$ [23].

Die in Abbildung 1.3 gezeigte Röntgenkristallstruktur des Fab-Fragments von ABT-325 ist mit einer Auflösung von $1,49 \text{ \AA}$ in der „RCSB Protein Data Bank“ (PDB) unter der Kennnummer 2VXV enthalten [24].

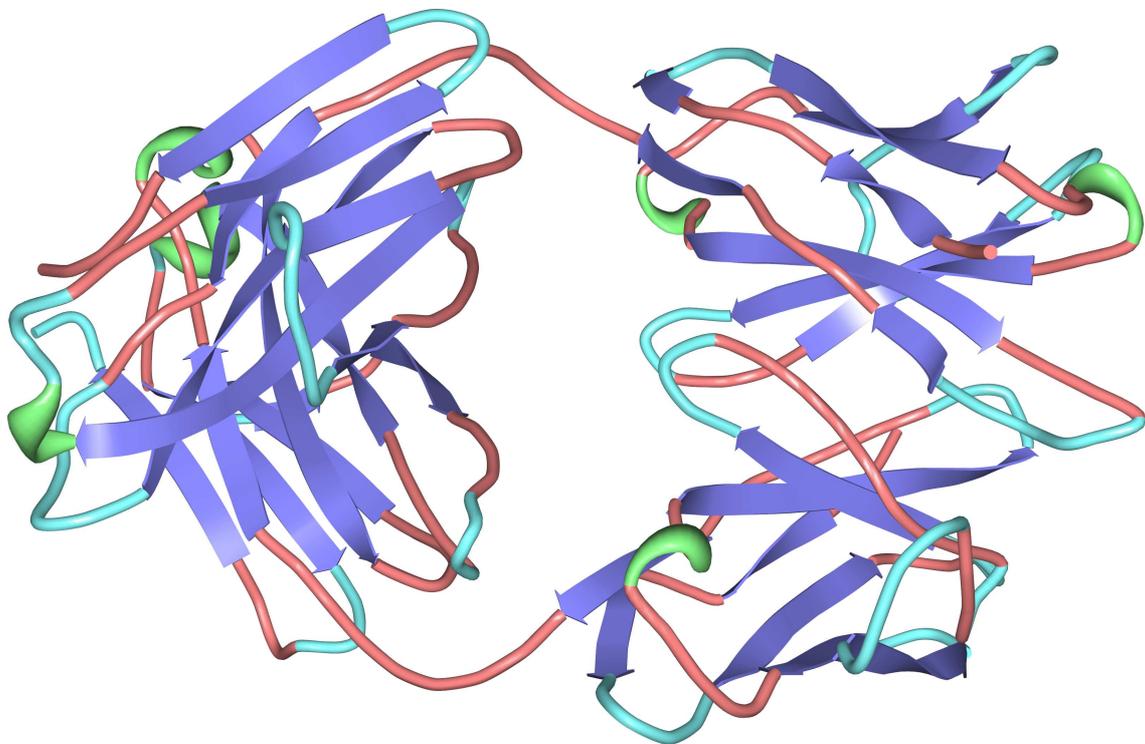


Abbildung 1.3: Röntgenkristallstruktur des Fab-Fragments von ABT-325. Die Abbildung wurde mit dem RCSB PDB Protein Workshop 3.9 und den Daten mit der PDB Kennnummer 2VXV erstellt.

Die schwere Kette von ABT-325 enthält elf und die leichte Kette fünf Cysteine [25], die alle als Cystine vorliegen und daher für eine Markierung nicht zugänglich sind. Darüber hinaus enthält der Antikörper 88 Lysine und 36 Arginine [25], die für eine Markierung genutzt werden können (siehe Kapitel 3.3.3.1).

1.1.3 Antikörperaggregation

Die Aggregation von Antikörpern, das heißt die Bildung von Dimeren bis hin zu Oligomeren, geht in der Regel mit einem Verlust der Aktivität einher [26]. Außerdem legen klinische Studien mit Antikörpermedikamenten nahe [27, 28], dass Antikörperaggregate ein möglicher Auslöser von Immunreaktionen sind [29, 30]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Antikörpermedikamente auf ihren Aggregatgehalt hin zu untersuchen. Für die Entstehung von Aggregaten gibt es verschiedene Ursachen und Faktoren, die diesen Prozess fördern. Als mögliche Ursachen für eine forcierte Aggregatbildung sind Einfrieren, Auftauen [31–33], Erhitzen [34], Oberflächen von Probenbehältern oder Eisoberflächen [35, 36], Schütteln oder Rühren [37] und niedrige pH-Werte [38, 39] bekannt. Dabei können kovalente und nicht-kovalente Aggregate entstehen [40]. Es ist beschrieben, dass die Aggregatmenge mit der Proteinkonzentration in wässriger Lösung [35] und der Lagerzeit zunimmt [31]. Bekannt sind Fc-Fc [41] und Idiotyp-Antiidiotyp [11, 42] Interaktionen, die zur Antikörperaggregation führen können. Auch wurde eine Hyperoxid-Anion (O_2^-) induzierte, nicht-kovalente Aggregation bei humanem IgG1 beobachtet [43].

1.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, bei der die Anregung des emittierenden Systems durch die Absorption von Photonen erfolgt. Bei der Fluoreszenz findet eine Desaktivierung von angeregten Elektronenzuständen ($S_1, S_2 \dots$) durch die Reemission der Anregungsenergie als Strahlung statt. Der Grundzustand (S_0) wird hierbei durch Emission innerhalb von 10^{-9} - 10^{-6} s nach der Anregung wieder erreicht. Dabei hat die emittierte Strahlung entweder die gleiche Energie wie die absorbierte Strahlung (Resonanzfluoreszenz) oder eine geringere. In Abbildung 1.4 sind die Energieübergänge der Elektronen bei Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowie die Energieniveaus für den Singulett- (S_0 bis S_2) und Tripletzustand (T_1) mit ihren verschiedenen Schwingungsniveaus ($v = 0$ bis 3) schematisch gezeigt. Die Phosphoreszenz ist eine Form der Emission mit Spinumkehr aus dem Tripletzustand (T_1) und hat eine deutlich längere Lebensdauer als die Fluoreszenz.

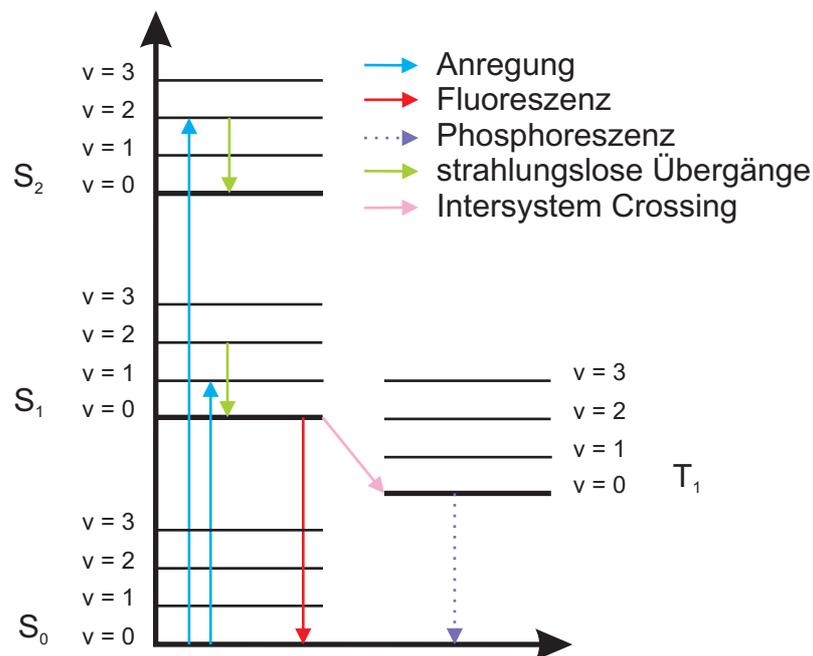


Abbildung 1.4: Schema der Energieniveaus bei Fluoreszenz und Phosphoreszenz nach Jablonski. Gezeigt sind Singulett- (S_0 bis S_2) und Tripletzustand (T_1) mit verschiedenen Schwingungsniveaus ($v = 0$ bis 3) in Anlehnung an [44].

1.2.1 Helligkeit

Die Helligkeit eines fluoreszierenden Moleküls hängt im Wesentlichen von zwei Parametern ab. Der erste Parameter ist der Absorptionsquerschnitt (σ), der die Wahrscheinlichkeit für die Absorption von Strahlung bei dem Übergang von S_0 nach S_1 wiedergibt. Der Absorptionsquerschnitt kann nach Formel 1.1 über den Extinktionskoeffizienten (ϵ) bestimmt werden [45]. Dabei ist N_A die Avogadrokonstante mit $6,02214179 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

$$\sigma = \ln(10) \cdot \frac{\epsilon}{N_A} \quad (1.1)$$

Der zweite Parameter, der die Helligkeit von fluoreszierenden Molekülen bestimmt, ist die Fluoreszenzquantenausbeute (Q), die das Verhältnis von absorbierten (n_{abs}) zu emittierten (n_{em}) Photonen wiedergibt.

$$Q = \frac{n_{\text{abs}}}{n_{\text{em}}} \quad (1.2)$$

1.2.2 Fotostabilität

Eine wichtige Ursache des Fotobleichens von Farbstoffen ist die Fotooxidation, an der hoch reaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) beteiligt ist [46, 47]. Dabei folgt die Entstehung von $^1\text{O}_2$ dem Reaktionsschema in Abbildung 1.5 [47, 48]. Dort ist eine Triplettlöschung gezeigt. Bei dieser geht ein sich im Triplettzustand befindliches Farbstoffmolekül (T) in den Grundzustand (S_0) über, wobei aus Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) reaktiver $^1\text{O}_2$ entsteht.



Abbildung 1.5: Triplettlöschung eines Farbstoffes unter Entstehung von $^1\text{O}_2$ nach [48].

Bei $^3\text{O}_2$ sind die antibindenden π^* Molekülorbitale mit zwei Elektronen mit parallelem Spin besetzt (Abbildung 1.6 A). Durch Wechselwirkungen mit angeregten Molekülen,

sogenannten Sensibilisatoren, kann der Spin eines der Elektronen umklappen und es bildet sich der sehr instabile $^1\text{O}_2$ (Abbildung 1.6 B).

„ $^1\text{O}_2$ ist sehr instabil. Er reagiert daher rasch mit anderen Verbindungen, die dabei oxidiert werden. Es gibt praktisch kein organisches Moleküle, das in Gegenwart von $^1\text{O}_2$ längere Zeit stabil ist“ [49].

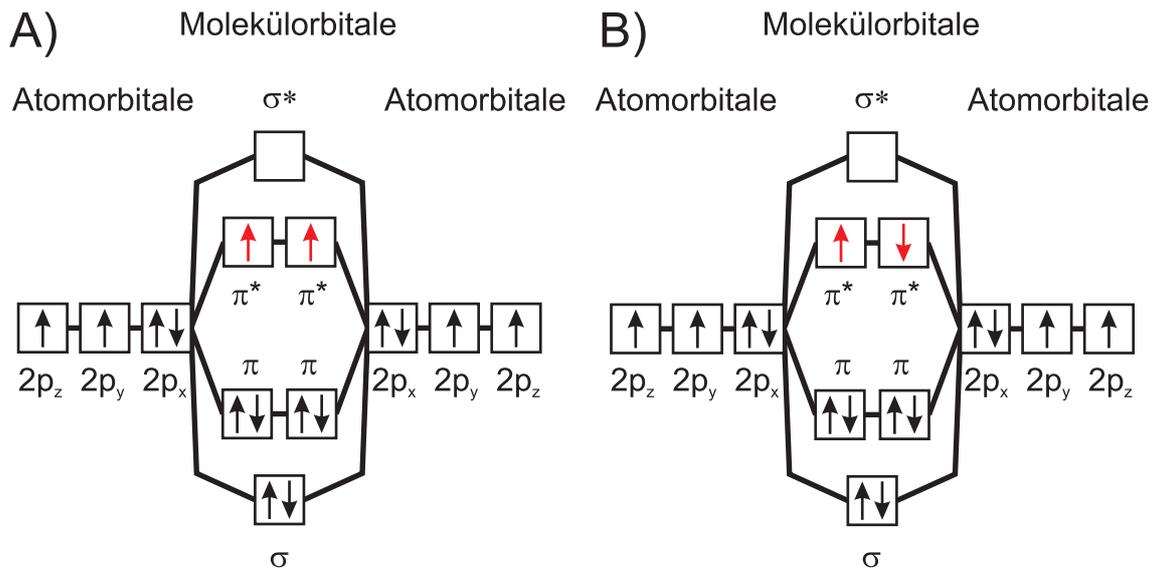


Abbildung 1.6: Besetzungsschema der Elektronenorbitale für $^3\text{O}_2$ (A) und $^1\text{O}_2$ (B) nach der Molekülorbitaltheorie, modifiziert nach [49].

Bevor ein Fluorophor irreversibel zerstört wird, kann es circa 10^5 - 10^6 Photonen emittieren [50]. Die Geschwindigkeit des Fotobleichens nimmt mit steigender Intensität der Excitation und mit steigender Verfügbarkeit von Sauerstoff zu [51]. Bei niedrigen Temperaturen nimmt die Geschwindigkeit des Fotobleichens ab [51].

1.2.3 Alexa Fluor[®] 532

In Abbildung 1.7 ist die Strukturformel des Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylesters gezeigt. Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff Alexa Fluor[®] 532 hat, IgG konjugiert, ein Absorptionsmaximum von 532nm , ein Emmissionsmaximum von 554nm , einen Extinkti-

onskoeffizienten von $81000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ und eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0,61 im Absorptionsmaximum [52]. Der Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester hat die Summenformel $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}_2$ und ein Molekulargewicht von $723,77\text{ Da}$ [53].

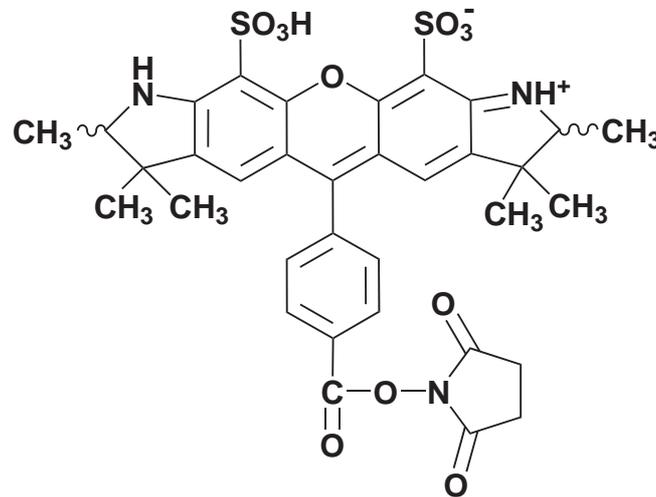


Abbildung 1.7: Strukturformel des Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylesters nach [53].

1.2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine sehr sensitive, sehr schnelle, minimalinvasive fluoreszenzmikroskopische Methode, die auf Einzelmolekülniveau Anwendung findet [54]. Aus Schwankungen der Fluoreszenzintensität können mittels FCS z.B. Konzentrationen [55–57], Diffusionskoeffizienten [55–57], chemische Kinetiken [55, 57, 58], Proteinoligomerisation [59] und Rotationsdiffusionskonstanten [60] bestimmt werden. Darüber hinaus erlaubt die FCS die Untersuchung der translationalen Diffusion in Modellmembranen [59, 61], des Verhaltens von Zelloberflächenrezeptoren [62–65], Ligand-Rezeptor-Interaktionen [66] und intrazellulären Dynamiken [59]. Ebenso können Zell-Zell-Kommunikation [67] oder Membranproteine in subzellulären Kompartimenten [68] mittels FCS untersucht werden. Eine praktische Anwendung der FCS ist z.B. der Nachweis einer Virusinfektion in einem frühen Stadium [69].

1.2.4.1 Prinzip

Die FCS beruht auf der Beobachtung von Fluoreszenzfluktuationen innerhalb eines kleinen Volumens ($\sim 0,2fL$) [70], wobei die Fluoreszenzfluktuationen dadurch zustande kommen, dass sich, wie in Abbildung 1.8 gezeigt, fluoreszierende Teilchen durch den Laserfokus bewegen, dabei angeregt werden und Photonen emittieren. Diese Photonen werden dann detektiert und als Fluoreszenzfluktuationen autokorreliert.

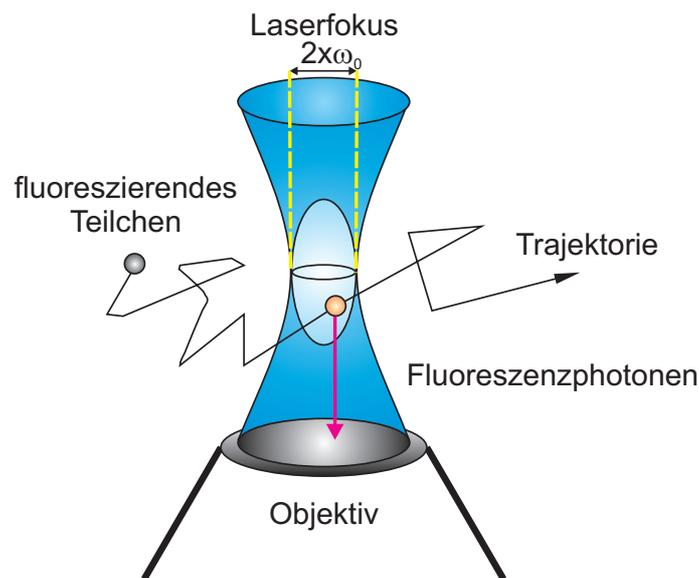


Abbildung 1.8: Fokus eines konfokalen Mikroskops mit einem fluoreszierenden Teilchen.

Die Abweichungen der Helligkeitsverteilung des realen Fokus von dem theoretischen werden bei der FCS, durch die Bestimmung des Verhältnisses der vertikalen zur lateralen Ausdehnung aus Justagemessungen, kompensiert [71].

Die Geschwindigkeiten der IgGs folgt theoretisch einer Maxwellverteilung (Formel 1.3), wie in Abbildung 1.9 gezeigt. Für ideale Systeme kann der Geschwindigkeitsanteil ($F(v)$) aus der molaren Masse (M), der Temperatur (T), der universellen Gaskonstante ($R = 8,314472 \frac{J}{molK}$) und der zugehörigen Geschwindigkeit (v) errechnet werden.

$$F(v) = 4\pi \left(\frac{M}{2} \pi \cdot R \cdot T \right)^{1,5} \cdot v^2 \cdot e^{-\frac{Mv^2}{2RT}} \quad (1.3)$$

Dabei beträgt die Überschneidung der Geschwindigkeitsverteilungen von monomeren ($M_{\text{Monomer}} = 150 \text{ kDa}$) und dimeren ($M_{\text{Dimer}} = 300 \text{ kDa}$) IgGs in idealen Systemen 65,6%. Dies verdeutlicht, wie schwierig eine Unterscheidung zwischen Monomeren und Dimeren anhand ihrer Geschwindigkeiten ist.

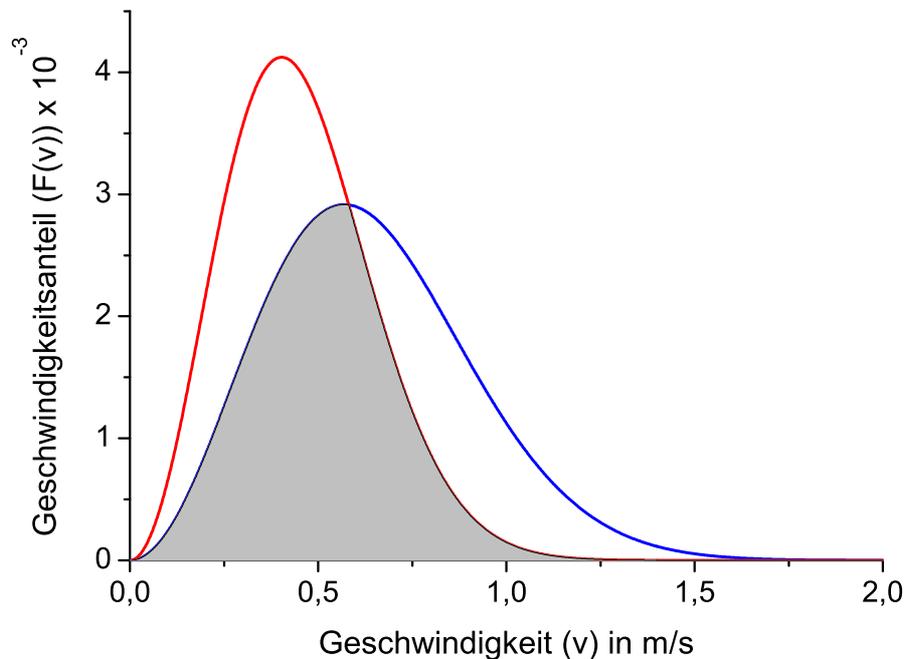


Abbildung 1.9: Theoretische Geschwindigkeitsverteilung von monomeren (blau) und dimeren (rot) IgGs. In Grau ist der Bereich gezeigt, in dem sich die Geschwindigkeitsverteilungen der monomeren und dimeren IgGs überschneiden.

1.2.4.2 Versuchsaufbau

In Abbildung 1.10 ist der schematische Aufbau des Fluoreszenzmikroskops gezeigt. Der Strahlengang des Anregungslichtes verläuft vom Laser aus durch eine Aufweitungsoptik und einen Anregungsfilter über einen dichroitischen Spiegel und anschließend durch das Objektiv in die Probe. Dort werden fluoreszierende Teilchen angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht (Abbildung 1.8). Der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes verläuft aus der Probe durch das Objektiv, den dichroitischen Spiegel, den Emissionsfilter, die Tubuslinse und die Lochblende in den Detektor.

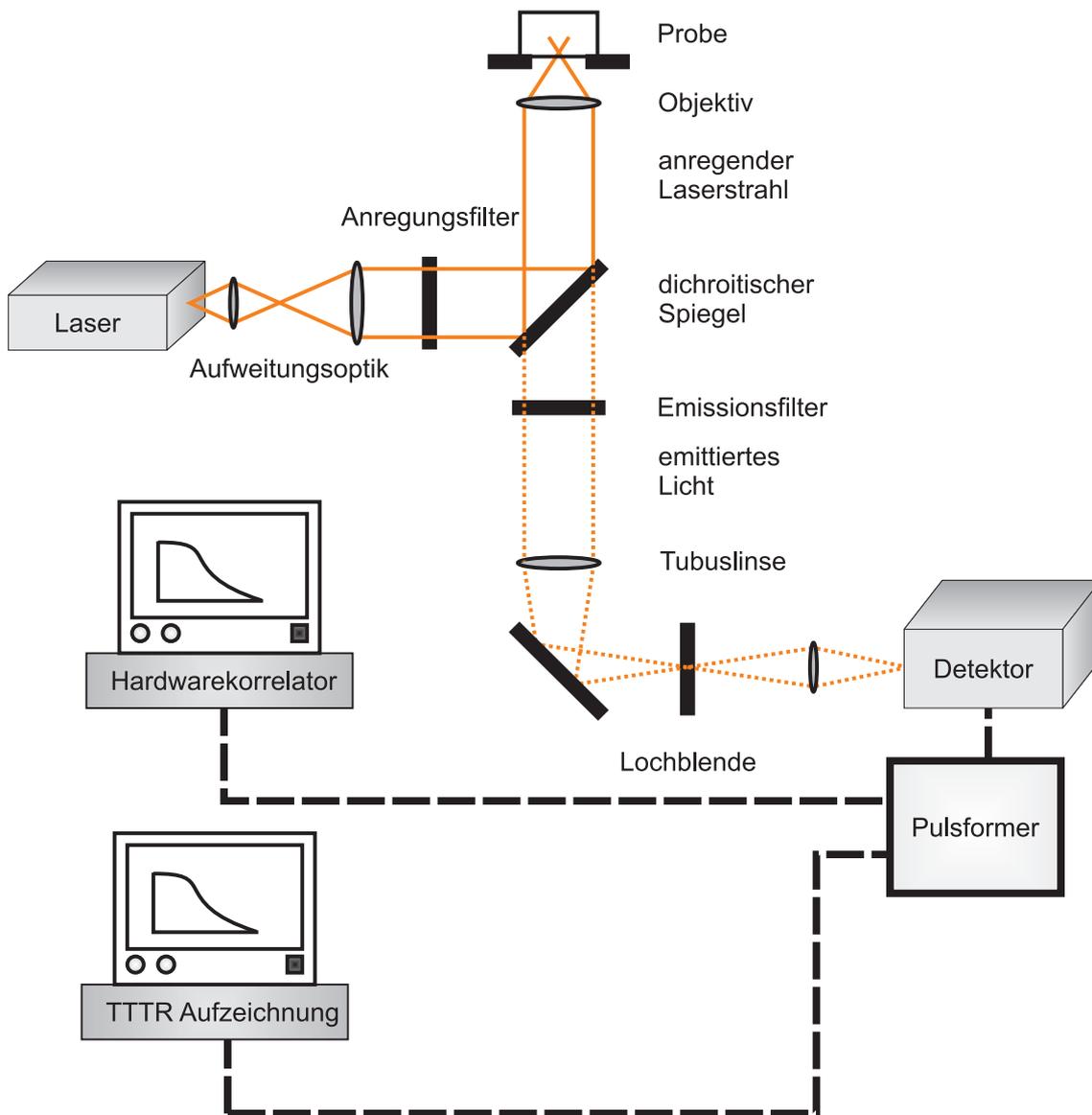


Abbildung 1.10: Schema des fluoreszenzmikroskopischen Setups in Anlehnung an [72]

Die Fluoreszenzphotonen werden in dem Detektor mittels einer Lawinenfotodiode (avalanche photodiode, APD) erfasst. Die Signale der APD werden in dem Pulsformer (Schaltplan siehe Abbildung 3.1) verdoppelt. Danach können sie direkt mit einem Zeitstempel (Time-Tagged Time-Resolved, TTTR) aufgezeichnet oder in einem Hardwarekorrelator zu einer Autokorrelationskurve verarbeitet werden. Die TTTR-Daten können in den verschiedenen Auswertungsverfahren eingesetzt werden.

1.2.4.3 Mathematischer Hintergrund

Für frei diffundierende Teilchen ohne Wechselwirkungen werden die Fluoreszenzfluktuationen durch die Autokorrelationskurve (ACC) beschrieben. Die ACC kann mit der Autokorrelationsfunktion (ACF) in Formel 1.4 beschrieben werden [55, 73, 74]. Die Amplitude der ACF ($G(\tau)$) wird dabei aus dem Strukturparameter (SP), der Anzahl der Komponenten (i), der durchschnittlichen Teilchenzahl im Detektionsvolumen (N), der Diffusionszeitkonstante (τ_D), dem Intervall für die Korrelationen der zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen (τ), dem Tripletanteil (t) und der Tripletzeit (τ_{trip}) errechnet. Der SP ist dabei das Verhältnis der vertikalen zur lateralen Ausdehnung des Fokus.

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{i=1}^M Q_i^2 N_i}{\left(\sum_{i=1}^M Q_i N_i\right)^2} \times \frac{1}{1 + \tau/\tau_{Di}} \times \sqrt{\frac{1}{1 + SP^2 \times \tau/\tau_{Di}}} \times \left(1 + \frac{t}{1-t} e^{-\frac{\tau}{\tau_{trip}}}\right) \quad (1.4)$$

Der Korrekturfaktor für die Quantenausbeute (Q) kann aus dem Absorptionskoeffizienten (σ), der Fluoreszenzquantenausbeute (η) und der Fluoreszenzdetektionseffizienz (g) errechnet werden (Formel 1.5).

$$Q_i = \sigma_i \cdot \eta_i \cdot g_i \quad (1.5)$$

Der Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten (D) und der Diffusionszeitkonstante (τ_D) wird über den Radius des Fokus in der lateralen Ebene (ω_0) durch die Formel 1.6 beschrieben.

$$\tau_{Di} = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot D_i} \quad (1.6)$$

Der theoretische Diffusionskoeffizient ist durch die Boltzmann-Konstante ($k = 1,38 \times 10^{-23} J/K$), die absolute Temperatur ($T = 293 K$), die Viskosität (η) und den hydrodynamischen Radius des Teilchens (r) gegeben (Formel 1.7).

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (1.7)$$

Der hydrodynamische Radius eines Teilchens kann aus der Masse (m) und der mittleren Dichte des Teilchens (ρ) sowie der Avogadrokonstante ($N_A = 6,02214179 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) berechnet werden (Formel 1.8).

$$r = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot m / N_A}{4 \cdot \pi \cdot \rho}} \quad (1.8)$$

1.2.5 Photonenzählhistogramm (PCH)

Die Photonenzählhistogramme (PCH) wurden 1999 von Chen *et al.* entwickelt [75]. Mit den PCHs können die Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität von Molekülen, die durch einen konfokalen Laserfokus diffundieren, ausgewertet werden. Dazu wird eine Häufigkeitsverteilung im relativen Vorkommen von Klassen, die sich in der Anzahl von Signalen pro Bin unterscheiden, erstellt und ausgewertet. Diese PCHs enthalten Informationen über die mittleren Partikelzahlen im Beobachtungsvolumen (\bar{N}) und deren verschiedenen molekularen Helligkeiten (ε) [75].

Bei PCH Experimenten ist zu beachten, dass für den Fokus keine gaußförmige Intensitätsverteilung (Formel 1.17) zugrunde gelegt werden kann [76]. Bei der hier verwendeten Einphotonenanregung wurde daher ein Korrekturfaktor (Formel 1.19) für die PCH Analyse angewendet. Dieser gibt den Anteil der Photonen wieder, die nicht aus dem gaußförmigen Fokus stammen (Formel 1.18) [77]. Bei der PCH müssen die Binzeiten kürzer als die Diffusionszeiten sein (siehe Kapitel 3.5) [78]. Eine der Hauptquellen des Rauschens bei InGaAs APDs [79], das elektronisch bedingte Überschwingen nach einem Impuls im Photodetektor, kann bei der PCH vernachlässigt werden [80]. Die Totzeit des Detektors spielt nur eine Rolle, wenn mehr als ein Teilchen im Fokus vorhanden ist [80], was daher in den folgenden Experimenten vermieden wurde.

Mittels PCH kann zwischen Teilchenspezies, die sich in der Helligkeit um den Faktor zwei unterscheiden, differenziert werden [81], was theoretisch eine Unterscheidung von monomeren und dimeren Partikeln anhand ihrer Helligkeit ermöglicht.

1.2.5.1 Mathematischer Hintergrund

Die Wahrscheinlichkeit, k Photonen ($k > 0$) von einem einzelnen fluoreszierenden Partikel der molekularen Helligkeit (ε) in einem ausreichend großen Volumen (V_0) mit dem Profil des Observationsvolumens ($W(\vec{r})$) zu detektieren, ist in Formel 1.9 beschrieben [82]. $W(\vec{r})$ gibt die Stärke der Anregung und die Detektionseffizienz in Abhängigkeit der Position des Partikels wieder. Dazu wird $W(\vec{r})$ normiert, wobei $W(0) = 1$ gesetzt wird.

$$p^{(1)}(k; V_0, \varepsilon) = \frac{1}{V_0} \int \text{Poisson}[k, \varepsilon \cdot W(\vec{r})] d\vec{r} \quad (1.9)$$

ε ist dabei das Produkt aus der Laserintensität (I_0), dem Absorptionsquerschnitt (σ), der Fluoreszenzquantenausbeute (Q_F), dem Sammelwirkungsgrad des konfokalen Mikroskops (ϕ) und der Binbreite (T) (Formel 1.10) [83].

$$\varepsilon = I_0 \cdot \sigma \cdot Q_F \cdot \phi \cdot T \quad (1.10)$$

Die Wahrscheinlichkeit, k Photonen bei einer mittleren Zahl detektierter Photonen (x) zu erfassen, folgt dabei einer Poissonverteilung (Formel 1.11) [82].

$$\text{Poisson}(k, x) = \frac{x^k e^{-x}}{k!} \quad (1.11)$$

Für den Fall, dass sich mehrere Partikel (N) in V_0 befinden, muss die Verteilung der gezählten Photonen für jeden Partikel berücksichtigt werden. Dazu wird die N -te Convolution von Formel 1.9, die nur für ein Teilchen in V_0 bestimmt ist, gebildet (Formel 1.12) [84].

$$p^{(N)}(k; V_0, \varepsilon) = \underbrace{\left(p^{(1)} \otimes p^{(1)} \otimes \dots \otimes p^{(1)} \right)}_{N\text{mal}}(k; V_0, \varepsilon) \quad (1.12)$$

Die Fluktuation der Teilchenzahl in V_0 bei einer Konzentration (c) folgt einer Poissonverteilung mit dem Mittelwert $c \cdot V_0$ [75]. Die gesamte Photonenzahlverteilung $P(k; c, \varepsilon)$ ist das mit der Poissonverteilung ($Poisson(N, c \cdot V_0)$) gewichtete Mittel jedes einzelnen Falles einer Photonenzahlverteilung $p^{(N)}(k; V_0, \varepsilon)$ (Formel 1.13) [83].

$$P(k; c, \varepsilon) = \sum_{N=0}^{\infty} p^{(N)}(k; V_0, \varepsilon) \cdot Poisson(N, c \cdot V_0) \quad (1.13)$$

Statt c wird als Fitparameter die mittlere Teilchenzahl \bar{N} im Beobachtungsvolumen V (siehe Kapitel 1.2.4) benutzt. Die Formel 1.13 wird dann zu Formel 1.14 umgeschrieben [84].

$$P(k; N, \varepsilon) = \sum_{N=0}^{\infty} p^{(N)}(k; V_0, \varepsilon) \cdot Poisson\left(N, \bar{N} \cdot \frac{V_0}{V}\right) \quad (1.14)$$

Zur Vereinfachung kann der Quotient von V_0/V als Konstante Q betrachtet werden (Formel 1.15) [84].

$$P(k; \bar{N}, \varepsilon) = \sum_{N=0}^{\infty} p^{(N)}(k; Q, \varepsilon) \cdot Poisson(N, \bar{N}Q) \quad (1.15)$$

Für den Fall, dass Daten einer Probe mit unterschiedlichen, nicht wechselwirkenden Teilchenarten betrachtet werden, kann das PCH durch Convolution der PCHs der einzelnen Teilchenarten erhalten werden (Formel 1.16) [84].

$$P(k; \bar{N}_1, \varepsilon_1, \bar{N}_2, \varepsilon_2, \dots, \bar{N}_n, \varepsilon_n) = P(k; \bar{N}_1, \varepsilon_1) \otimes P(k; \bar{N}_2, \varepsilon_2) \otimes P(k; \bar{N}_n, \varepsilon_n) \quad (1.16)$$

1.2.5.2 Anpassung für reale Messungen

Die bisherigen Betrachtungen (Formel 1.9 bis 1.16) gelten nur für ideale Systeme. Da die Beschreibung der Verteilung der relativen Klassenhäufigkeiten keine Variable enthält,

die die Beschaffenheit des Fokus beschreibt, muss für die Auswertung realer Daten ein Korrekturfaktor (F) eingeführt werden, der die theoretischen PCHs an die gemessenen Daten anpasst. Dazu wird die Differenz zwischen dem 3D-gaussförmigen Profil $W_G(\vec{r})$ mit dem Radius (w_0) und der effektiven Länge des konfokalen Volumens (z_0) (Formel 1.17) zu dem Profil des Observationsvolumens $W(\vec{r})$ bestimmt (Formel 1.18) [82].

$$W_G(\vec{r}) = e^{\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2} - \frac{2z^2}{z_0^2}\right)} \quad (1.17)$$

Für Partikel nahe des Fokusmittelpunktes ist $W_G(\vec{r})$ eine gute Näherung. Für Partikel, die weit vom Fokusmittelpunkt entfernt sind, fällt $W_G(\vec{r})$ viel schneller ab als $W(\vec{r})$ [82], weswegen ($W_{OOF}(\vec{r})$) als Profil der Emission, die außerhalb des Fokus stattfindet, benutzt wird (Formel 1.18).

$$W_{OOF}(\vec{r}) = W(\vec{r}) - W_G(\vec{r}) \quad (1.18)$$

F gibt das Verhältnis zwischen der Emission innerhalb und außerhalb des Fokus wieder (Formel 1.19) [82].

$$F = \frac{\int W_{OOF}(\vec{r}) d\vec{r}}{\int W_G(\vec{r}) d\vec{r}} \quad (1.19)$$

In den Formeln 1.20 für $k = 1$ und 1.21 für $k > 1$ ist die Anpassung für die Einphotonenfluoreszenzmikroskopie, das Einsetzen von F in die Formel 1.9 (für eine Komponente) unter Ersetzen von V_0 durch QV , gezeigt [84].

$$p^{(1)}(1; Q, \varepsilon) = \frac{1}{(1+F)^2} \left[p_G^{(1)}(1; Q, \varepsilon) + \frac{\varepsilon F}{2\sqrt{2}Q} \right] \quad (1.20)$$

$$p^{(1)}(k; Q, \varepsilon) = \frac{1}{(1+F)^2} p_G^{(1)}(k; Q, \varepsilon) \quad (k > 1) \quad (1.21)$$

1.2.6 Einzelereigniserkennung

Eine weitere Methode für die Auswertung von fluoreszenzmikroskopischen Daten ist die Einzelereigniserkennung. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten von einzelnen Partikeln analysiert. Voraussetzung hierfür ist, dass sich nur ein Partikel im Beobachtungsvolumen befindet. Bei dem experimentell verwendeten Probenvolumen von $400\ \mu\text{L}$ und einem darin zentrierten Fokus von ($\sim 0,2\ \text{fL}$) wurde dies bei einer Konzentration realisiert, bei der im zeitlichen Mittel $\sim 0,2$ Partikel ($\hat{=} \sim 2\ \text{nM}$) detektiert wurden. Bei größeren Konzentrationen besteht zunehmend die Gefahr, dass sich gleichzeitig zwei oder mehr Partikel im Fokus befinden. Dies würde „einzelne Partikel“ mit zu großer Helligkeit bzw. zu langer Verweildauer im Beobachtungsvolumen generieren.

Besonders geeignet ist die Einzelereigniserkennung für Proben mit großen Aggregaten. Fluoreszente Aggregate zeigen in der autokorrelierten Fluoreszenzspur oberhalb von $\sim 1\ \text{ms}$ oft eine stufige Form, die mittels ACF nicht hinreichend genau beschrieben werden kann [85, 86]. Im PCH nimmt die relative Wahrscheinlichkeit im Vorkommen von Intervallen mit steigender Fluoreszenzintensität normalerweise stetig ab. Aggregate heben diesen Zusammenhang auf [87] und führen zu PCHs, die eine Quantifizierung der Intensitätsverteilung nicht mehr erlaubt.

Bei der Einzelereigniserkennung gibt es verschiedene Methoden, mit denen Ereignisse detektiert werden können. Im einfachsten Fall werden TTTR-Daten gebinnt (Abbildung 1.11) und mittels eines Schwellenwertes, der das Hintergrundrauschen von den Einzelereignissen abgrenzt, analysiert [88, 89].

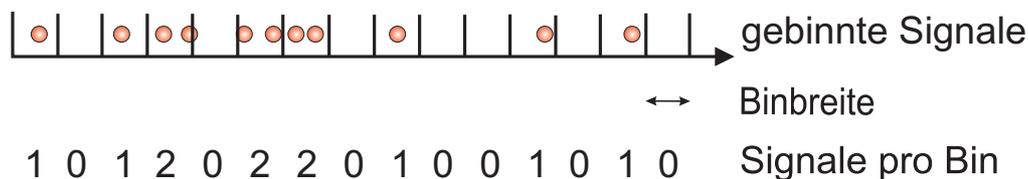


Abbildung 1.11: Beispiel von Signalen, die nach ihrer Detektionszeit in Bins eingeteilt werden, was zu einer Liste von Signalen pro Bin führt ($\hat{=} \text{Intensitätspur}$).

Einzelereignisse beginnen bei einer Signalstärke, die den Schwellenwert überschreitet und enden, wenn dieser unterschritten wird. Die theoretische Grenze der molekularen Detektionseffizienz (MDE) als Maß für die Helligkeit, mit der ein fluoreszenter Partikel vom Hintergrund noch unterschieden werden kann, kann nach Formel 1.22 aus dem Schwellenwert (t) und der durchschnittliche Zahl der registrierten Photonen pro Teilchen ($\langle n \rangle$) abgeschätzt werden [88].

$$MDE = 1 - \int_0^t \exp(-x/\langle n \rangle) dx \quad (1.22)$$

Da fluoreszierende Partikel Photonen nicht konstant emittieren und dadurch möglicherweise den Schwellenwert unterschreiten, besteht die Gefahr, ein längeres Einzelereignis in mehrere kürzere zu unterteilen. Unter Verwendung von zwei Schwellenwerten lässt sich dieses Problem minimieren [89]. Dabei bestimmt der obere Schwellenwert das Vorkommen eines Einzelereignisses, dessen Dauer durch das Über- und Unterschreiten des unteren Schwellenwertes definiert wird (Abbildung 1.12).

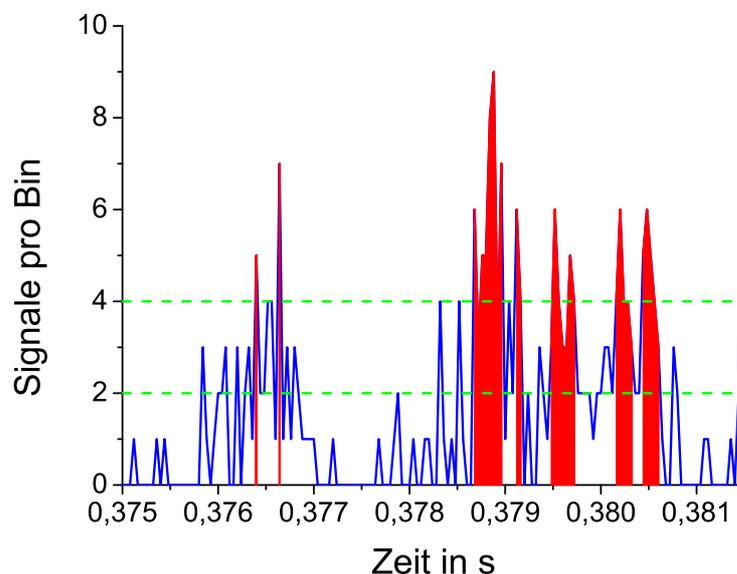


Abbildung 1.12: Beispielhafter Abschnitt einer Intensitätsspur (blau), aus einer Messung von bei -80°C gelagertem Alexa-ABT-325. Der untere (2 Signale pro Bin) und obere Schwellenwert (4 Signale pro Bin) sind grün eingezeichnet. In rot sind einzelne Ereignisse dargestellt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Aggregation von IgGs führt bekanntermaßen zum Aktivitätsverlust und zu unerwünschten Nebenwirkungen von Immunglobulinpräparaten. Die Aggregatbildung, die mit der Dimerisierung beginnt, ist daher nicht nur für die Stabilität, sondern auch für die Verträglichkeit derartiger Präparate von Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Dimerisierung von IgGs zu einem möglichst frühen Zeitpunkt von kleiner 5 % im Gemisch mit Monomeren sicher nachzuweisen und zu quantifizieren.

Ogleich mittels Fluoreszenzmikroskopie zeitmarkiert, zeitaufgelöst (TTTR) Daten auf molekularer Ebene aufgezeichnet und durch Autokorrelationsfunktionen, Photonenzähl-histogramme sowie Einzelereigniserkennungen ausgewertet werden können, lassen sich mit diesen Methoden nach bisherigem Kenntnisstand IgG Dimere von Monomeren nicht eindeutig unterscheiden. Daher sollte zunächst durch eigene Untersuchungen am Beispiel von ABT-325 das Ausmaß der Schwierigkeiten erfasst werden, um anschließend anhand dieser Daten eine fluoreszenzmikroskopische Methode zur Unterscheidung von IgG Dimeren von Monomeren zu entwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Matrices, Puffer

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung / Formel	Lieferant
ABT-325		Abbott
Acetonitril	ACN / C ₂ H ₃ N	Merck
Alexa Fluor [®] 532 Succinimidylester		Invitrogen
Bis(Sulfosuccinimidyl) suberat	BS ³	Pierce
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB / C ₇ H ₆ O ₄	Merck
Hase-Anti-Ziege IgG		Dianova
Histidin	His	MP Biomedicals
Kaliumdihydrogen- phosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	Merck
Methionin	Met	MP Biomedicals
Milchpulver		Sucofin (Reformhaus)
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Invitrogen
di-Natriumhydrogen- phosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Natronlauge	NaOH	Merck
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Merck
Salzsäure	HCl	Roth
Sinapinsäure	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Sigma
Tetramethylrhodamin	TMR	Invitrogen
Trifluoressigsäure	TFA / C ₂ HF ₃ O ₂	Merck
Tris(hydroxymethyl) aminomethan	Tris / C ₄ H ₁₁ NO ₃	Merck
Tween [®] 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	MP Biomedicals
Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor [®] 532 IgG		Invitrogen

Bei den vorhergehend genannten Lieferanten handelt es sich um:

Abbott Laboratories mit Sitz in Chicago, IL, USA

Carl Roth GmbH & Co.KG mit Sitz in Karlsruhe, Deutschland

Dianova GmbH mit Sitz in Hamburg, Deutschland

Invitrogen Corporation mit Sitz in Carlsbad, CA, USA

Merck KGaA mit Sitz in Darmstadt, Deutschland

MP Biomedicals mit Sitz in Solon, OH, USA

Pierce Biotechnology mit Sitz in Rockford, IL, USA

Sigma-Aldrich Corporation mit Sitz in St.Louis, MO, USA

Sinapinsäurematrix

Für massenspektroskopische Untersuchungen wurden die Antikörper in einer wässrigen Sinapinsäurematrix kristallisiert, deren Zusammensetzung in Tabelle 3.2 wiedergegeben ist. Bei den Prozentangaben handelt es sich um Volumenanteile. Die Menge der Sinapinsäure ist als Massenkonzentration angegeben.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Sinapinsäurematrix

Konzentration	Stoff
0,1 %	TFA
30 %	ACN
10 g/L	Sinapinsäure

Einlagerungsmatrix

Tabelle 3.3 gibt die Zusammensetzung einer wässrigen Matrix wieder, in der Alexa-ABT-325 gelagert wurde. Der pH wurde mit 1 M Salzsäure auf einen Wert von 5,9 eingestellt. Bei den Prozentangaben handelt es sich um Angaben der Massenkonzentration.

Tabelle 3.3: Bestandteile der wässrigen Einlagerungsmatrix

Konzentration	Stoff
5 mM	Histidin
5 mM	Methionin
0,5 %	Saccharose
2 %	Mannitol
0,1 %	Tween [®] 80

PBS

Die verwendete phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung enthielt die in Tabelle 3.4 beschriebenen Bestandteile und hatte einen pH von 7,4.

Tabelle 3.4: PBS Bestandteile

Konzentration	Stoff
2 mM	KH_2PO_4
10 mM	Na_2HPO_4
150 mM	NaCl

3.2 Geräte

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopischer Versuchsaufbau

Die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden an einem modifizierten ConfoCor[®] 1 (Zeiss/Evotec, Jena/Hamburg) durchgeführt. Das Setup verfügte über einen Argon-Ionen-Laser LGK 7812 ML 2 (Lasos, Jena), der für die Anregung bei der Wellenlänge 514nm betrieben wurde. Die Laserintensität wurde durch verschiedene Graufilter (OD, Linos, Göttingen) variiert. Wenn nicht anders erwähnt, wurde ein OD 2 verwendet, der eine Leistung von $1,44\mu\text{W}$ erzeugte. Die weitere Ausstattung des ConfoCor[®] 1 bestand aus einem Anregungsfilter BP 485 / 20, Farbteiler FT 510 und Emissionsfilter BP 515 - 565 (alle Zeiss). Als Objektiv wurde ein Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat 63x mit einer numerischen Apertur von 1,2 (Zeiss) verwendet. Die Lochblende wurde mit einem Durchmesser von $40\mu\text{m}$ betrieben. Die Photodetektion erfolgte durch eine Lawinenphotodiode (APD) SPCM-AQ (EG & G Canada, Vaudreuil, Kanada). Diese wurde in Anlehnung an [90] über einen selbstgebauten Pulsformer (Abbildung 3.1) an eine ALV-5000/E Korrelatorkarte (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen) [91] und eine TimeHarp 200 Datenerfassungskarte (PicoQuant GmbH, Berlin) [90, 92] mit TTTR (Time-Tagged Time-Resolved) Option angeschlossen.

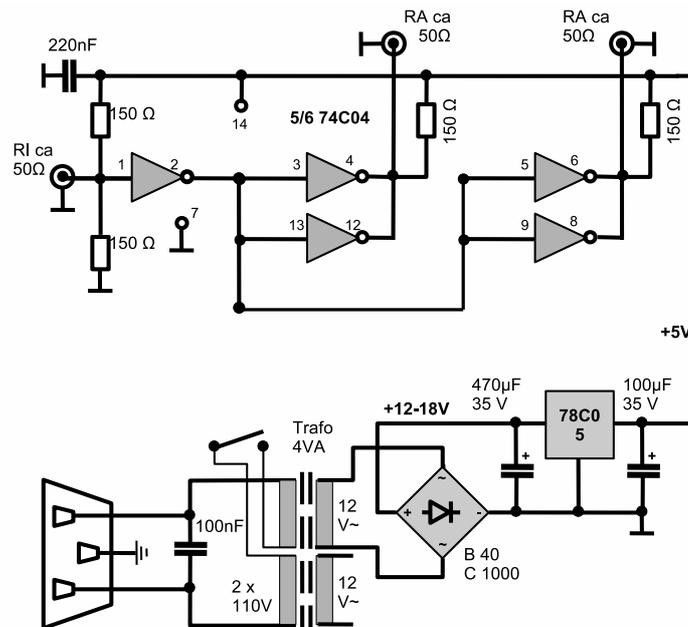


Abbildung 3.1: Schaltplan des Pulsformers mit dem Signaleingang bei RI und den Signalausgängen bei RA.

Die Steuerung des ConfoCor[®] 1 erfolgte über die FCS Access Control Software V. 1.2 (Zeiss).

3.2.2 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionmessungen wurden mit einem DU[®] 600 Absorptionsspektrometer (Beckman Coulter, Brea, USA) bei einer Scanngeschwindigkeit von 1200 nm/min durchgeführt. Mit der Apparatur wurde das Absorptionsspektrum von Alexa-ABT-325 gemessen (siehe Kapitel 4.4.1). Mit den Absorptionmessungen wurden auch die Labeleffizienz (siehe Kapitel 3.3.3.4 und 4.1.2) und die Fotostabilität (siehe Kapitel 3.3.3.6 und 1.2.2) bestimmt.

3.2.3 Emissionsspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Spektrofluorometer FP 6200 (Jasco, Easton, USA) durchgeführt. Mit dem Fluoreszenzspektrometer wurden Emissionsspektren

von Alexa Fluor[®] 532 und Alexa-ABT-325 bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm, aufgenommen.

3.2.4 Größenausschlusschromatographie

Die Abtrennung von ABT-325-BS³, Alexa-ABT-325 und Alexa-ABT-325-BS³ aus den Reaktionsansätzen erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit einem SMART-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) [93, 94]. Dabei wurde PBS (pH 7,4) bei einer Flussrate von 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ als Laufmittel verwendet. Die Detektion erfolgte über Absorptionsmessungen bei 280 nm für ABT-325-BS³ und zusätzlich bei 532 nm (514 nm) für Alexa-ABT-325 und Alexa-ABT-325-BS³.

3.2.5 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden über die matrixunterstützte Laser-Desorption/-Ionisation-Flugzeitanalyse (MALDI-TOF MS) im „positiv Modus“ durchgeführt. Hierfür wurden eine Voyager-DE[™] STR BioSpectrometry[™] Workstation und die Voyager Data Explorer 4.0.0.0 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die Spektren wurden mit der Programmeinstellung „voyager noise removal (Std Dev remove = 2)“ geglättet. Die Massenpeaks wurden mit der „Pick Peaks“ Funktion identifiziert. Mit der Massenspektrometrie wurde die Farbstoffmarkierung und Quervernetzung der Antikörper untersucht. Dazu wurde ABT-325, Alexa-ABT-325, ABT-325-BS³ Dimer und Alexa-ABT-325-BS³ Dimer in einer Sinapinsäurematrix (siehe Kapitel 3.1) kristallisiert. Die Reaktionsansätze der Fluoreszenzmarkierung in der Einlagerungsmatrix (siehe Kapitel 3.1) wurden mit DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) als Kristallisationsmatrix analysiert.

3.3 Antikörper

3.3.1 ABT-325

Für die nachfolgenden Experimente wurde das IgG1 ABT-325 (Lot# BAP02GEX, Abbott Laboratories, Chicago, USA) benutzt. ABT-325 enthält 44 Lysine und 18 Arginine [25], deren Aminogruppen für eine Fluoreszenzmarkierung mit dem Succinimidylester-aktivierten Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 532 genutzt wurden. ABT-325 wurde in einer Massenkonzentration von 62,5 g/L bei -80 °C gelagert. Er wurde in einer Matrix, bestehend aus 10 mM Histidin, 10 mM Methionin, 1 % Saccharose und 4 % Mannitol, bei einem pH von 5,9 gelagert.

3.3.1.1 Identität

Die Identität wurde über eine MALDI-TOF MS Untersuchung überprüft. Dies geschah wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Für die Kristallisation wurde die Sinapinsäurematrix verwendet. Die Massenpeaks wurden mit der „Pick Peaks“ Funktion der Voyager Data Explorer 4.0.0.0 Software identifiziert.

3.3.2 ABT-325-BS³ Dimer

3.3.2.1 Synthese

Die Lagerung von ABT-325 erfolgte in einer aminosäurehaltigen Matrix (siehe Kapitel 3.3.1). Vor der Quervernetzung wurden 16 μ L ABT-325 (62,5 g/L) gegen PBS dialysiert (3 \times mindestens 1 h in 10 L PBS bei 4 °C). Anschließend wurde ABT-325 mit 4 mM (Endkonzentration) BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat) in PBS bei Raumtemperatur 1 h lang umgesetzt. Danach wurde die Reaktion mit 40 mM (Endkonzentration) Tris pH 7,4 abgestoppt. Die Vernetzung erfolgte mit einer ABT-325 Konzentration (13 μ M), die weit unter dem Konzentrationsoptimum von 50 μ M bis 100 μ M des zu quervernetzenden Proteins lag [95], was die Bildung von Oligomeren verhinderte.

3.3.2.2 Aufreinigung

Der dimere ABT-325-BS³ Antikörper wurde aus dem Syntheseansatz mit einem SMART-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und einer SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) [93, 94] isoliert. Die Detektion erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Als Fließmittel wurde PBS (pH 7,4) verwendet. Die Flussrate betrug 80 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.3.2.3 Identität

Die Identität des quervernetzten ABT-325-BS³ Dimers wurde mittels MALDI-TOF MS, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, überprüft. Für die Kristallisation von ABT-325-BS³ wurde die Sinapinsäurematrix verwendet. Die Massenpeaks wurden mit der „Pick Peaks“ Funktion identifiziert.

3.3.3 Alexa-ABT-325

3.3.3.1 Synthese

In einer aminosäurehaltigen Matrix gelagertes ABT-325 (siehe Kapitel 3.3.1) wurde gegen PBS (pH 7,4) dialysiert (3 \times mindestens 1 h in 10 L PBS bei 4 °C) und mit dem Succinimidylester-aktivierten Alexa Fluor[®] 532 unter Verwendung eines „Alexa Fluor[®] 532 Monoclonal Antibody Labeling Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) markiert (Abbildung 3.2). Der Antikörper wurden nach Herstellerangaben in einer Massenkonzentration von 2 g/L in PBS mit einem zehnpromtigen Volumenanteil 1 M Natriumhydrogencarbonat und einem großen Überschuss Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester bei Raumtemperatur für 1 h unter ständigem Rühren im Dunklen umgesetzt.

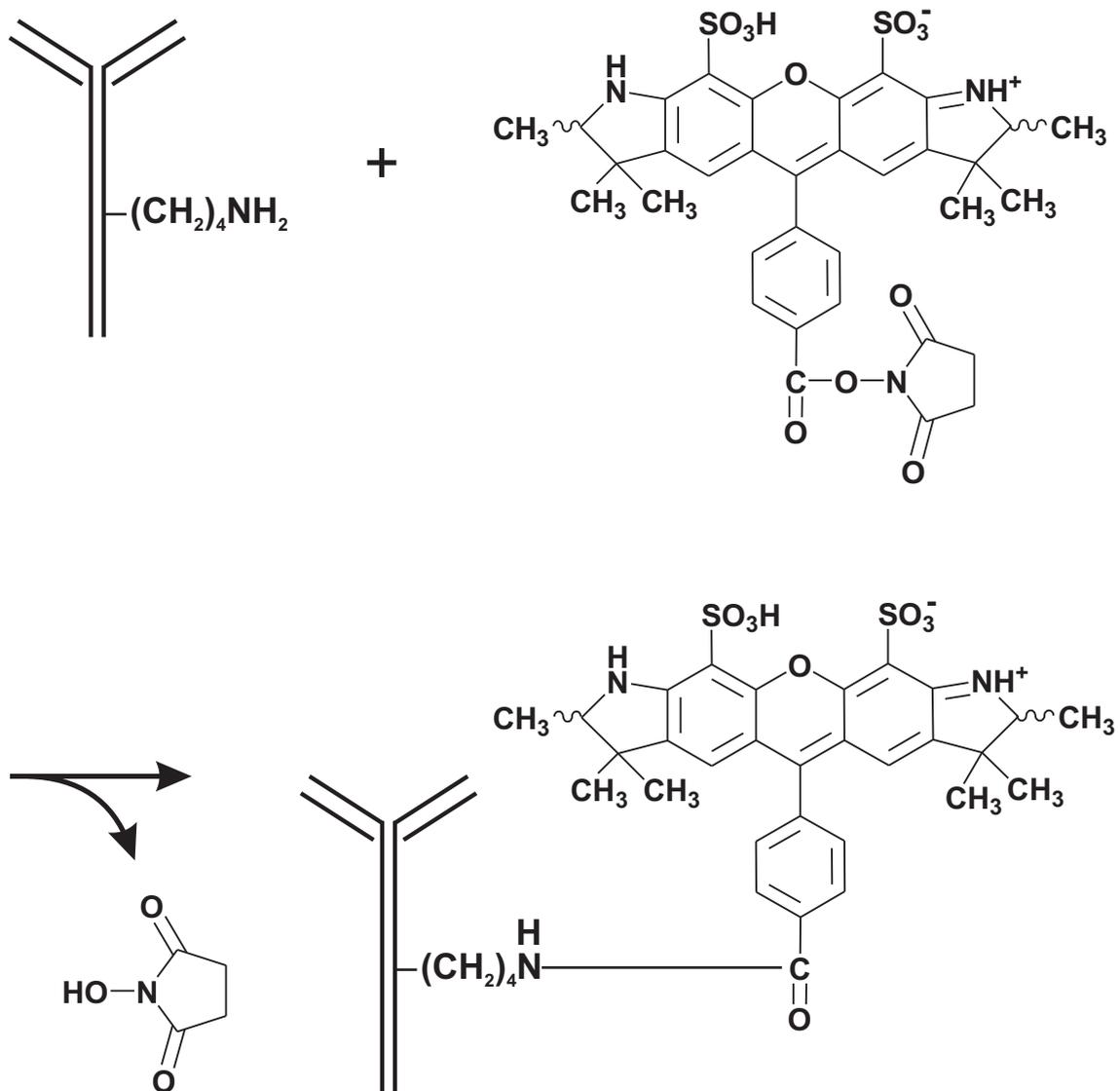


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung eines IgGs über einen Lysinrest mit dem Alexa Fluor 532[®] Succinimidylester

3.3.3.2 Aufreinigung

Alexa-ABT-325 wurde aus dem Fluoreszenzmarkierungsansatz über ein SMART-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einer Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) [93, 94] abgetrennt, wobei die Detektion über eine kontinuierliche Absorptionsmessung bei den Wellenlänge 280nm und 532nm (514nm) erfolgte. Das Fließmittel bei der Auftrennung war PBS (pH 7,4). Die Flussrate betrug 80 $\mu L/min$.

3.3.3.3 Identität

Mittels MALDI-TOF MS wurde die Identität von Alexa-ABT-325, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, untersucht. Abweichend von der Beschreibung wurden die Daten nicht geglättet. Für die Kristallisation von Alexa-ABT-325 wurde die Sinapinsäurematrix verwendet. Der $[M^+]$ Massenpeak wurde mit der „Pick Peaks“ Funktion identifiziert.

3.3.3.4 Labeffizienz

Für die Bestimmung der Labeffizienz von Alexa-ABT-325 wurde die Absorption mit einem DU[®] 600 Absorptionsspektrometer (Beckman Coulter, Brea, USA) bei 280nm (A_{280}) und 530nm (A_{530}) in einer 1cm dicken Küvette (d) gemessen. Daraus wurde die Stoffmengenkonzentration (c) nach Formel 3.1 errechnet. Dabei ist $0,09$ der Korrekturfaktor für die Absorption von Alexa Fluor[®] 532 bei $\lambda = 280\text{nm}$, $203.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ der molare Extinktionskoeffizient eines typischen IgGs und F_V der Verdünnungsfaktor.

$$c = \frac{[A_{280} - (A_{530} \times 0,09)] \times F_V}{d \times 203.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}} \quad (3.1)$$

Die Labeffizienz (κ) wurde dann nach Formel 3.2 errechnet. $81.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ist dabei der molare Extinktionskoeffizient von Alexa Fluor[®] 532 bei $\lambda = 530\text{nm}$.

$$\kappa = \frac{A_{530} \times F_V}{c \times d \times 81.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}} \quad (3.2)$$

3.3.3.5 Verteilung der Fluoreszenzlabel

Die Anzahl der Farbstoffmoleküle (n) an einem einzelnen Antikörpermolekül mit mehreren Kopplungsstellen folgt einer Poissonverteilung [96]. Die Wahrscheinlichkeit für einen Antikörper mit n Farbstoffmolekülen ($P_\kappa(n)$) konnte mit der Formel 3.3 aus κ errechnet werden.

$$P_\kappa(n) = \frac{\kappa^n}{n!} \cdot e^{-\kappa} \quad (3.3)$$

3.3.3.6 Fotostabilität von Alexa Fluor® 532

Die Fotostabilität von Alexa Fluor® 532 wurde bei einer Konzentration von $19\mu M$ in PBS bestimmt. Das Probenvolumen (V_{sam}) betrug $1,00 mL$. Der Farbstoff wurde in einer Quartzküvette ständig gerührt und dabei von einem Festkörperlaser (LasNova50 green laser, Lasos Lasertechnik GmbH, Jena) bei einer Wellenlänge von $532 nm$, einem Strahldurchmesser von $0,7 mm$ und einer Leistung von $40,3 mW$ (E) über einen Zeitraum von $5,5 h$ bestrahlt. Gemessen wurde die Laserleistung mit einem FieldMate™ Laser Power Meter mit OP-2VIS Sensor (Coherent, Santa Clara, USA). Der Laser bestrahlte ein zylinderförmiges Volumen (V_{exc}) der Probe mit dem Radius ($r = 0,35 mm$) und der Dicke ($d = 1 cm$).

$$V_{exc} = \pi \cdot r^2 \cdot d \quad (3.4)$$

Nach Formel 3.4 ergibt sich ein bestrahltes Volumen von $V_{exc} = 0,00363 cm^3$.

Die Bestrahlungszeit (t') ist um das Verhältnis von V_{exc} zu V_{sam} kleiner als die Versuchsdauer (t) (Formel 3.5).

$$t' = V_{exc}/V_{sam} \cdot t = 0,00385 \cdot t \quad (3.5)$$

Die Energie eines einzelnen Photons einer bestimmten Wellenlänge (E_λ) wurde nach der Formel 3.6 berechnet. Dabei ist die Planck-Konstante $h = 6,6260755 \times 10^{-34} Js$, die Geschwindigkeit des Lichtes im Vakuum $c = 2,99792458 \times 10^8 m/s$ und die Wellenlänge $\lambda = 532 nm$ bzw. $514 nm$.

$$E_\lambda = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (3.6)$$

Die Zahl der Photonen pro Sekunde (n_{ph}) wurde mit der Formel 3.7, der Energie eines einzelnen Photons von $E_{\lambda 532} = 3,734 \times 10^{-19} J$ und der gemessenen Laserleistung von $P = 40,3 mW$ berechnet.

$$n_{Ph} = \frac{P}{E_{\lambda}} \quad (3.7)$$

Demnach bestrahlte der Laser den Farbstoff während des Bleichexperiments mit $n_{Ph532} = 1,07929 \times 10^{17} s^{-1}$. Im FCS-Experiment unter Verwendung eines Argon-Ionen-Lasers mit $\lambda = 514 nm$ ergibt sich bei einer Energie eines einzelnen Photons von $E_{\lambda 514} = 3,865 \times 10^{-19} J$ und einer Laserleistung von $P = 1,44 \mu W$ eine Anzahl von Photonen von $n_{Ph514} = 3,72605 \times 10^{12} s^{-1}$. Der Faktor (a) zwischen dem molaren Extinktionskoeffizienten von Alexa Fluor[®] 532 bei $\lambda = 530 nm$ ($81.000 cm^{-1} M^{-1}$) und $514 nm$ ($\sim 40.500 cm^{-1} M^{-1}$) ist 0,5 [97]. Unter der Annahme, dass ein Photon der Wellenlänge von $514 nm$ den Farbstoff genauso schädigt wie ein Photon mit einer Wellenlänge $532 nm$, lässt sich die korrigierte Bestrahlungsdauer (t'') für das FCS-Experiment nach der Formel 3.8 berechnen.

$$t'' = \frac{n_{Ph532}}{a \cdot n_{Ph514}} \cdot t' \quad (3.8)$$

3.3.4 Alexa-ABT-325-BS³ Dimer

3.3.4.1 Synthese

Fluoreszenzmarkierte, kovalent verbundene Antikörperdimere wurden aus Alexa-ABT-325 hergestellt. Dazu wurden $5 \mu M$ Alexa-ABT-325 mit $4 mM$ (Endkonzentration) BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat) in PBS bei Raumtemperatur $1 h$ lang im Dunkeln umgesetzt. Danach wurde die Reaktion mit $40 mM$ (Endkonzentration) Tris pH 7,4 abgestoppt. Die Bildung von Oligomeren bei der Vernetzung von Alexa-ABT-325 wurde durch die Verwendung einer weit unter dem Optimum ($50 \mu M$ bis $100 \mu M$) liegenden Proteinkonzentration verhindert [95].

3.3.4.2 Aufreinigung

Der dimere Alexa-ABT-325-BS³ Antikörper wurde aus dem Reaktionsgemisch (siehe Kapitel 3.3.4.1) mit einem SMART-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und einer Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) isoliert [93, 94]. Als Fließmittel wurde PBS (pH 7,4) verwendet, die Flussrate betrug 80 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.3.4.3 Identität

Mit einer MALDI-TOF MS Analyse wurde die Identität von Alexa-ABT-325-BS³ überprüft. Dies geschah, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, mit der Sinapinsäurematrix für die Kristallisation. Die „Pick Peaks“ Funktion wurde benutzt um die Massenpeaks ($[\text{M}^{2+}]$, $[2\text{M}^{3+}]$ und $[\text{M}^+]$) von Alexa-ABT-325-BS³ zu identifizieren.

3.4 FCS-Untersuchungen

3.4.1 Justage

Die Symmetrie der Probenausleuchtung wurde vor jedem Messtag überprüft und korrigiert. Dazu wurde eine AxioCam-Kamera (MRm, Kamerasoftware Axiovision AC, Zeiss) verwendet. Die zu dieser Routine gehörende automatische Justage der Lochblende auf maximal erreichbare Zählrate wurde mit 100 nM Tetramethylrhodamin (TMR, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) in Aqua bidest. durchgeführt. Die Kalibrierung des Beobachtungsvolumens wurde mit 10 nM TMR ($M = 423\text{ Da}$) in Aqua bidest. durchgeführt (Abbildung 3.3). Die Diffusionszeitkonstante wurde als Mittelwert aus zehn Einzelmessungen mit einer Länge von 1 min bestimmt.

Der TMR Diffusionskoeffizient konnte über den Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 6G ($M = 479\text{ Da}$, $D_{\text{Rhodamin 6G}} = 2,8 \times 10^{-10}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$) [55, 66, 98–100] abgeschätzt werden. Die molekulare Masse von TMR beträgt 88% der molekularen Masse von Rhodamin 6G. Mit den Formeln 1.8 und 1.7 wurde der Diffusionskoeffizient von TMR auf $2,9 \times 10^{-10}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$ näherungsweise bestimmt.

Die Ausdehnung und Symmetrie des konfokalen Volumenelements konnte dann über den angenommenen Diffusionskoeffizienten von TMR $D_{\text{TMR}} = 2,9 \times 10^{-10}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$ berechnet werden (Formel 1.6).

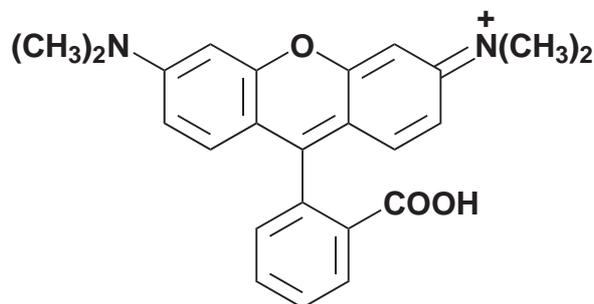


Abbildung 3.3: Strukturformel von Tetramethylrhodamin

3.4.2 Auswahl der Laserleistung

Die Laserleistung für die Anregung bei den fluoreszenzmikroskopischen Versuchen muss im linearen Bereich des Zusammenhangs zwischen Laserleistung und Zählraten pro Molekül liegen. Dieser wurde durch einen linearen Fit bestimmt. Dazu wurden FCS-Messungen ($10 \times 60s$) von $5nM$ Alexa Fluor[®] 532 in PBS mit verschiedenen Laserleistungen ($0,31\mu W$; $0,72\mu W$; $1,44\mu W$; $4,62\mu W$ und $15\mu W$) durchgeführt. Die Mittelwerte der Zählraten pro Molekül wurden über die Laserleistungen aufgetragen (Abbildung 4.17). Der lineare Bereich des Zusammenhangs zwischen Laserleistung und Zählraten pro Molekül wurde durch einen Fit der ersten drei Werte mit der linearen Fitfunktion von Origin-Pro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) bestimmt.

3.4.3 Adsorption von Alexa-ABT-325

Um die Adsorption von Antikörpern an Glas zu verhindern, wurden die Lab-Tek[™] Kammerdeckgläser (Nalge Nunc International, Rochester, USA) über Nacht bei $4^\circ C$ mit 5% (Massenkonzentration) Milchpulver in PBS beschichtet [101]. Das überschüssige Milchpulver wurde vor der Messung durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt.

3.4.4 Alexa-ABT-325

Verdunstungs- und Grenzflächeneffekte wurden durch die Verwendung von $400\mu L$ großen Proben vermieden. Alexa-ABT-325 wurde vor den fluoreszenzmikroskopischen Messungen mit PBS (pH 7,4) in den nanomolaren Konzentrationsbereich verdünnt. Die exakten Konzentrationen sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Die Messungen wurden bei $20^\circ C$ in Milchpulver beschichteten Lab-Tek[™] Kammerdeckgläsern durchgeführt.

Die Dateien der TTTR-Daten im t3r-Format wurden zur Autokorrelation in MATLAB[®] (The MathWorks, Natick, USA) zunächst in das entsprechende m-Format konvertiert. Hierfür wurde in MATLAB[®] ein von PicoQuant entwickeltes Script mit der Bezeichnung

„Demo for accessing TimeHarp TTTR data files (*.t3r) from MATLAB“ verwendet, welches zuvor in Bezug auf die Datenein- und -ausgabe optimiert wurde. Die konvertierten Daten wurden mit einem MATLAB[®]-basierten Programm von Jörg Enderlein [102] autokorreliert. Zusätzlich erfolgte eine Anpassung der $G(\tau)$ Werte, bei der $G'(\tau_i)$ für $i = \{1, \dots, n\}$ durch $G'(\tau_n)$ dividiert wurde.

$$G(\tau_i) = \frac{G'(\tau_i)}{G'(\tau_n)} \quad (3.9)$$

In MATLAB[®] wurde die Autokorrelationsfunktion (Formel 1.4) mit der „lsqcurvefit“ Fitfunktion und den „optimset“ Parametern 'Display', 'final', 'FunValCheck', 'off', 'MaxFunEvals', 1e6, 'MaxIter', 1e6, 'TolFun', 1e-10, 'TolX', 1e-10' angepasst.

3.4.5 Alexa-ABT-325-BS³ Dimer

Das Alexa-ABT-325-BS³ Dimer wurde in 400 μL großen Proben bei 20°C in Milchpulver beschichteten Lab-Tek[™] Kammerdeckgläsern fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde Alexa-ABT-325-BS³ auf eine Konzentration von 3 nM in PBS (pH 7,4) verdünnt. Die Auswertung der TTTR-Daten erfolgte wie in Kapitel 3.4.4 für Alexa-ABT-325 beschrieben.

3.4.6 Alexa-ABT-325 nach Lagerung

Das Aggregationsverhalten von Alexa-ABT-325 wurde durch einen Einlagerungsversuch mit zwei Proben je Bedingung untersucht. Dazu wurde Alexa-ABT-325 aus PBS in die Einlagerungsmatrix (siehe Kapitel 3.1) umgepuffert. Dies erfolgte über eine Fast Desalting PC 3.2/10 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Säule die über einen Adapter in einem HPLC-System mit der Einlagerungsmatrix als Fließmittel betrieben wurde. Das HPLC-System bestand aus einer HPLC-Pumpe MSDS 600 E (Waters, Eschborn), einem Dioden

Array Detektor 996 (Waters, Eschborn), einem Autosampler 700 Satellite WISP (Waters, Eschborn), einem 4-Kanal-Online Entgaser (Knauer, Berlin) und der Millennium Software V2.1 (Waters, Eschborn).

Je $50\ \mu\text{L}$ Antikörper der Massenkonzentration $2\ \text{g/L}$ Einlagerungsmatrix wurden in Reaktionsgefäßen aus dunkelbraunem Polypropylen (neoLab, Heidelberg) mit Schraubverschlüssen bei $4\ ^\circ\text{C}$ und $50\ ^\circ\text{C}$ für ein, zwei, vier und sieben Tage gelagert. Die Dichtigkeit der Reaktionsgefäße wurde mit einer elektronischen Analysenwaage (Kern 770, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) überwacht.

Die Proben aus der Einlagerung wurden auf eine Konzentration von $2\ \text{nM}$ in PBS verdünnt. Danach wurden die $400\ \mu\text{L}$ großen Proben bei $20\ ^\circ\text{C}$ in mit Milchpulver beschichteten Lab-TekTM Kammerdeckgläsern fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die so gewonnenen TTTR-Daten wurden wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben weiterverarbeitet.

3.5 PCH-Untersuchungen

3.5.1 Alexa-ABT-325

Bei den PCH-Untersuchungen von Alexa-ABT-325 wurden die TTTR-Daten der FCS-Experimente (siehe Kapitel 3.4.4) verwendet. Die TTTR-Daten wurden mit einem MATLAB[®]-basierten Programm mit einer Breite von $40\mu s$ gebinnt. Die Daten der so entstandenen Intensitätsspur wurden dann nach ihrer relativen Häufigkeit von Klassen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Signalen aufgetragen. Die Schrittweite für den Übergang zwischen den Klassen war dabei ein Signal. Die so entstandenen PCHs wurden mit der Software IGOR Pro V. 6.0.3.1 (Wavemetrics Inc., Oregon, USA) und dem PCH Data Processing Plugin von Thomas D. Perroud [83] ausgewertet. Dabei erfolgte die Auswertung gemäß der in Kapitel 1.2.5.1 beschriebenen Prinzipien [77, 82, 84, 103], die die Detektionseffizienz für Teilchen an verschiedenen Stellen der Probe wiedergeben. Der Fit Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich keine besseren Startparameter mehr fanden und die Ergebnisse den Startwerten glichen. Außerdem sollte der überwiegende Teil der Emissionen aus dem Fokus stammen, das heißt der gefittete Korrekturfaktor F sollte ≤ 1 sein.

3.5.2 Simulation von PCH-Daten

Es wurden PCHs von Antikörper Monomer-Dimer-Gemischen mit 0%, 50% und 100% Dimeranteil simuliert, wobei die Gesamtkonzentration mit $1nM$ festgelegt wurde. Dies geschah für einen Fokus mit gaußförmiger Intensitätsverteilung [60, 66, 74, 104]. Das verwendete MATLAB[®]-basierte Simulationsprogramm von Jörg Enderlein [105] wurde so angepasst, dass eine Monte-Carlo-Simulation von zwei Partikelspezies bei variabler x- und y-Achse der Fokusaussdehnung mit Berücksichtigung eines Hintergrundrauschens durchgeführt werden konnte. Für alle Simulationen wurden die Parameter in Anlehnung an die Parameter den ConfoCor[®] 1 wie folgt festgesetzt: $0,208\mu m$ für die transversalen

und $1,041 \mu\text{m}$ für den longitudinalen Halbmesser des Fokus, 300Hz für das Hintergrundrauschen, $2 \times 10^{-7} \text{s}$ für die zeitliche Auflösung der Simulation, $0,012$ für das Monomer und $0,024$ für das Dimer als maximale Fluoreszenzrate im Fokussmittelpunkt. Es wurden jeweils 10 Messungen mit einer Simulationsdauer von 1min simuliert.

Die Auswertung der simulierten PCHs erfolgte wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, allerdings ohne den Korrekturfaktor F , da nur Partikel im Fokus simuliert wurden.

3.6 Einzelereigniserkennung von Alexa-ABT-325

Bei der Einzelereigniserkennung wurden die TTTR-Daten der FCS-Untersuchungen verwendet (siehe Kapitel 3.4.4). Die TTTR-Daten wurden mit einer Breite von $40 \mu\text{s}$ gebinnt und mit zwei Schwellenwerten auf Einzelereignisse hin untersucht. Dabei legte der untere Schwellenwert die Länge eines Ereignisses fest. Es begann mit dem Überschreiten des unteren Schwellenwertes und endete mit seiner Unterschreitung. Mit dem oberen Schwellenwert wurden die Ereignisse vom Hintergrund getrennt. Damit ein Ereignis gewertet wurde, musste innerhalb des Zeitraums, der mit Hilfe des unteren Schwellenwertes definiert wurde, der obere Schwellenwert überschritten werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem MATLAB®-basierten Programm, wobei Schwellenwertkombinationen von ein und zwei bis zu acht und neun Signale pro Bin definiert wurden. In Abbildung 1.12 ist die Einzelereigniserkennung beispielhaft dargestellt.

3.7 Eine neue Methode für die Auswertung von Autokorrelationskurven (ACC)

3.7.1 Simulation der Kalibrierdaten

Es wurden Autokorrelationskurven (ACC) von verschiedenen Antikörper Monomer-Dimer-Gemischen in einem Fokus mit gaußförmiger Intensitätsverteilung [60, 66, 74, 104] simuliert. Dazu wurde ein MATLAB[®]-basiertes Simulationsprogramm von Jörg Enderlein verwendet [105]. Es wurde so angepasst, dass die Monte-Carlo-Simulation von zwei Partikelspezies möglich war. Die x- und y-Achse der Fokusaussdehnung und die Stärke des Hintergrundrauschens konnte bestimmt werden. Durch weitere Modifikation des angepassten Programms wurde die gleichzeitige Nutzung der GPU (Grafikprozessor) zur Beschleunigung über das „NVIDIA CUDA Toolkit 2.3“ und „GPUmat 0.1 gp-you.org“ ermöglicht. Die Simulationsparameter wurden in Anlehnung an die Werte des ConfoCor[®] 1 Systems wie folgt festgesetzt: $0,208 \mu\text{m}$ für den transversalen und $1,041 \mu\text{m}$ für den longitudinalen Halbmesser des Fokus, 300 Hz für das Hintergrundrauschen und $2 \times 10^{-7} \text{ s}$ für die zeitliche Auflösung der Simulation. Die maximale Fluoreszenzrate im Fokusmittelpunkt wurde mit 0,012 für das Monomer und 0,024 für das Dimer festgesetzt. Es wurden jeweils 30 Messungen mit einer Dauer von 10 min pro Gemisch simuliert. Die variablen Konzentrationen und die zugehörigen Dimeranteile sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Für die Simulationen der Kalibrierkurve verwendete variable Konzentrationen von Monomeren (c_{M_0}) und Dimeren (c_{D_i})

Dimeranteile in %	c_{M_0} in M	c_{D_i} in M
0,5	$9,95 \times 10^{-10}$	5×10^{-12}
1	$9,90 \times 10^{-10}$	1×10^{-11}
2	$9,80 \times 10^{-10}$	2×10^{-11}
3	$9,70 \times 10^{-10}$	3×10^{-11}
4	$9,60 \times 10^{-10}$	4×10^{-11}
5	$9,50 \times 10^{-10}$	5×10^{-11}
6	$9,40 \times 10^{-10}$	6×10^{-11}
7	$9,30 \times 10^{-10}$	7×10^{-11}
8	$9,20 \times 10^{-10}$	8×10^{-11}
10	$9,00 \times 10^{-10}$	1×10^{-10}

Der Diffusionskoeffizient für das Alexa-ABT-325 Monomer wurde zuvor mittels FCS-Messung mit $D_{\text{Monomer}} = 3,20 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt. Der Diffusionskoeffizient des Alexa-ABT-325-BS³ Dimers (siehe Kapitel 3.3.4.1) mit $D_{\text{Dimer}} = 2,30 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ wurde ebenfalls durch FCS-Messungen bestimmt. Die experimentell gefundenen Diffusionskoeffizienten wurden für die Simulationen verwendet.

3.7.2 Erstellung der Kalibrierkurve

Aus den simulierten ACCs wurde mit einem MATLAB[®]-basierten Programm eine Kalibrierkurve erstellt. Dazu wurden die simulierten ACCs mit der Zweikomponenten Autokorrelationsfunktion (ACF) gefittet. Dabei wurde der Strukturparameter wie in den Simulationen auf 5,0 gesetzt. Der erste Wendepunkt der ACF (τ_{D_1}) wurde auf den Wert der Diffusionszeitkonstante des monomeren IgGs festgesetzt. Der zweite Wendepunkt der ACF (τ_{D_2}) wurde im Bereich von 0,1 s bis 1 s auf 100 logarithmisch verteilte Werte fixiert. Die sich daraus ergebenden 100 Fraktionen der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ wurden über den zugehörigen τ_{D_2} aufgetragen. Diese Kurve konnte mit einer Potenzfunktion beschrieben werden (Formel 4.1). Die Kalibrierkurve wurde aus den mittleren gefitteten c Werten, die die Höhe der Kurve wiedergeben, und den zugehörigen Dimeranteilen gebildet.

Zwischen den simulierten Werten wurden jeweils 10 Werte interpoliert. Dabei wurden die Dimeranteile linear (über `interp`) und die c Werte mit einer Hermite Interpolation (über `interp1('pchip')`) in MATLAB[®] errechnet.

3.7.3 Überprüfung der Richtigkeit der neuen Auswertungsmethode mit Antikörperkontrollproben

Die Richtigkeit der neuen Auswertungsmethode wurde mit realen fluoreszenzmikroskopischen Messungen in mit Milchpulver beschichteten Lab-Tek[™] Kammerdeckgläsern festgestellt. Die Diffusionszeitkonstante für IgG Monomere wurde durch acht 10 *min* Messungen mit $5 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ (Massenkonzentration) Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG in PBS bestimmt. Anschließend wurden durch Zugabe von $5 \times 10^{-6} \text{ g/L}$, $10 \times 10^{-6} \text{ g/L}$ oder $15 \times 10^{-6} \text{ g/L}$ (Massenkonzentration) Hase-Anti-Ziege IgG gezielt IgG Dimere erzeugt. Nach der Zugabe wurde vorsichtig gemischt und bei 20 °C für 10 *min* inkubiert. Die IgG Gemische wurden danach jeweils acht mal 10 *min* vermessen.

Durch die Verschiebung von τ_{D_2} im Bereich von 0,1 s bis 1 s auf 100 logarithmisch verteilte Werte konnte die Kurve $F(\tau_{D_2})$ über τ_{D_2} erstellt werden. Diese wurde zur Bestimmung des c Wertes mit der Potenzfunktion Formel 4.1 gefittet. Die Dimeranteile wurden dann durch einen Vergleich der c Werte mit der Kalibrierkurve (siehe Kapitel 3.7.2) bestimmt. Bei der hochaffinen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen mit einem großen Überschuss an Antigen wird der Anteil der gebundenen Antikörper wesentlich von der Konzentration des Antigens bestimmt. Daher wurde davon ausgegangen, dass annähernd das gesamte Hase-Anti-Ziege IgG gebunden vorliegt und 1 %, 2 % oder 3 % Dimeranteil gefunden werden.

3.7.3.1 Statistische Auswertung

Die Messergebnisse wurden mittels Student'schen t-Tests (Excel, Microsoft[®] Office 2003, Redmond, USA) auf eine signifikante Unterscheidbarkeit hin überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Alexa-ABT-325

4.1.1 Synthese und Aufreinigung

Die Aggregation eines IgGs sollte am Beispiel von ABT-325 mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken untersucht werden. ABT-325 wurde daher in der Einlagerungsmatrix mit dem aktivierten Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 532 Succinimidylester bei Raumtemperatur im Dunklen umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine Superdex™ 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Fließmittel bei einer Flussrate von $80 \mu\text{L}/\text{min}$ aufgetrennt (Abbildung 4.1).

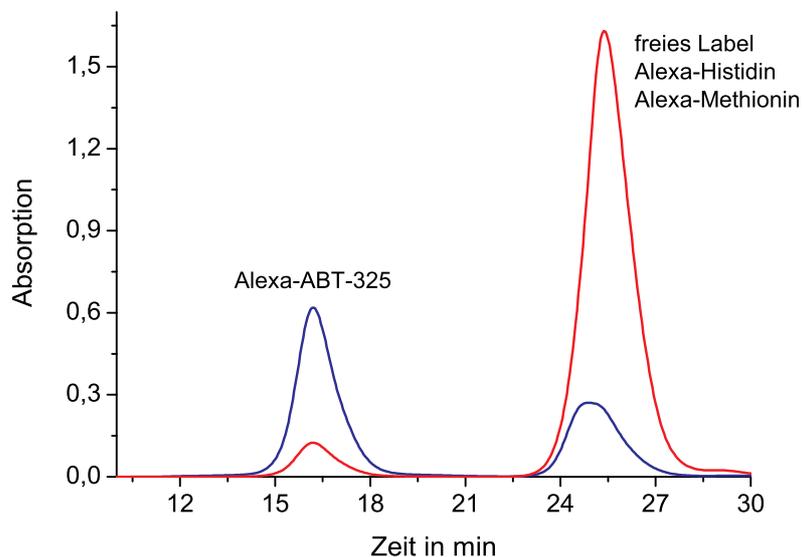


Abbildung 4.1: Auftrennung des ABT-325 Markierungsansatzes in der Einlagerungsmatrix über eine Superdex™ 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Fließmittel. Die Detektion erfolgte über die Absorption bei $\lambda = 280\text{nm}$ (blau) und 532nm (rot).

Die Absorptionkurven der Auftrennung des ABT-325 Markierungsansatzes zeigten jeweils zwei Maxima, wobei das erste im Bereich von 15min bis 18min der Retentionszeit von Alexa-ABT-325 entsprach. Die Absorption war bei $\lambda = 280\text{nm}$ deutlich größer als bei $\lambda = 532\text{nm}$, was zeigte, dass die Fluoreszenzmarkierung von ABT-325 nur bei einem geringen Anteil des Antikörpers funktioniert hatte. Das zweite Absorptionsmaximum lag zwischen 24min bis 27min und lag im Bereich der Retentionszeit des freien Labels.

Die Einlagerungsmatrix (siehe Kapitel 3.1) enthielt neben Saccharose, Mannitol und

Tween[®] 80 auch die Aminosäuren Histidin und Methionin. Eine Probe aus dem zweiten Absorptionsmaximum wurde mit der matrixunterstützten Laser-Desorption/-Ionisation-Flugzeitanalyse (MALDI-TOF MS, siehe Kapitel 3.2.5) untersucht und zeigte Massenpeaks $[M^+]$ für die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse von Alexa-Histidin $m/z = 765$ und Alexa-Methionin $m/z = 759$ (Abbildung 4.2).

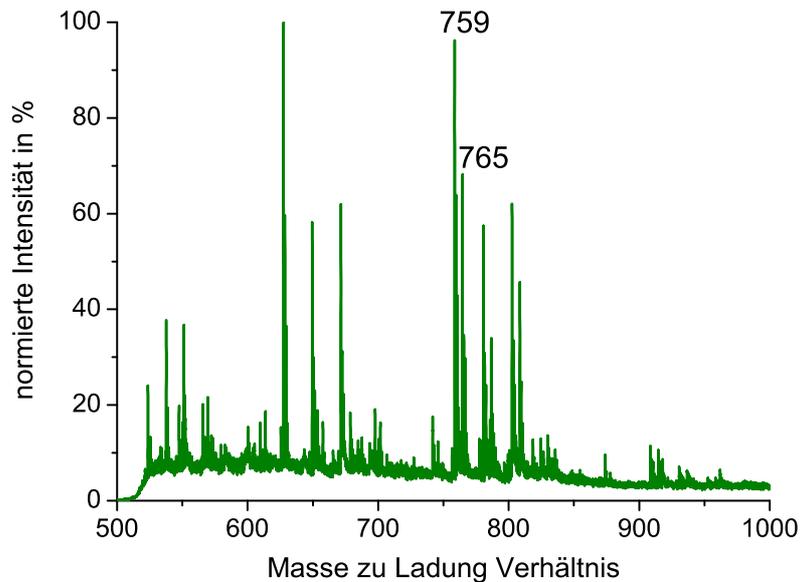


Abbildung 4.2: Normiertes Massenspektrum eines Fluoreszenzmarkierungsansatzes von ABT-325 in der Einlagerungsmatrix mit den Massenpeaks $[M^+]$ von Alexa-Histidin ($m/z = 765$) und Alexa-Methionin ($m/z = 759$).

Der Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester wurde also zum größten Teil an die Aminogruppen von Histidin und Methionin gekoppelt (Abbildung 4.3).

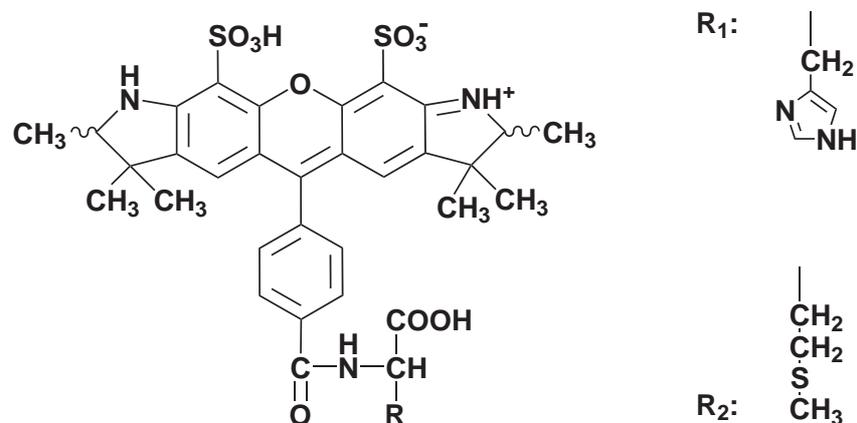


Abbildung 4.3: Strukturformeln von Alexa-Histidin (R_1) und Alexa-Methionin (R_2).

Die Reaktion des Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylesters mit Histidin und Methionin musste verhindert werden, um die Labeleffizienz für ABT-325 soweit zu erhöhen, dass der Großteil des Antikörpers fluoreszenzmarkiert wurde. Daher wurde 1 mg ABT-325 mittels einer Dialyse über drei mal mindestens 1 h in 10 L PBS bei 4 °C umgepuffert. Anschließend wurde ABT-325 in PBS mit einem Überschuss an Alexa Fluor 532[®] Succinimidylester bei Raumtemperatur im Dunkeln umgesetzt (siehe Kapitel 3.3.3.1). Der Reaktionsansatz wurde über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Laufmittel bei einer Flussrate von 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ aufgetrennt (Abbildung 4.4).

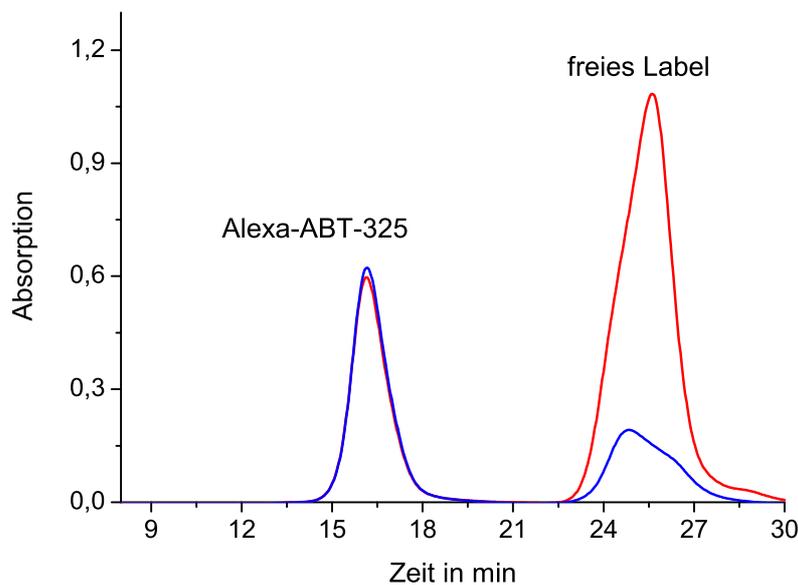


Abbildung 4.4: Isolierung von Alexa-ABT-325 über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule und mit PBS als Fließmittel. Detektion bei $\lambda = 280\text{nm}$ (blau) und 514nm (rot).

Die ersten Peaks der Absorptionskurven lagen zwischen 15 min und 18 min für Alexa-ABT-325, wobei der Anteil der Absorption des Alexa Fluor 532[®] im ersten Peak deutlich größer war als bei dem in der Einlagerungsmatrix markiertem ABT-325, das heißt die Labeleffizienz des Markierungsansatzes in PBS war deutlich größer. Die zweiten Peaks, die das freie Label zeigten, lagen zwischen 24 min und 27 min. Die deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten von Alexa-ABT-325 und dem freien Fluoreszenzfarbstoff zeigte die gute Abtrennung von Alexa-ABT-325.

Die Reinheit von Alexa-ABT-325 wurde mittels FCS-Messungen bestimmt. Dazu wurde

erst die Diffusionszeitkonstante von 2 nM Alexa Fluor[®] 532 in PBS mit $\tau_{D_1} = 35,4 \pm 0,5\ \mu\text{s}$ bestimmt ($n = 10$). τ_{D_1} wurde in der weiteren Auswertung auf diesen Wert festgesetzt. Danach wurde 1 nM Alexa-ABT-325 in PBS zehn mal 60 s vermessen und die Autokorrelationskurven (ACC) mit der Zweikomponenten Autokorrelationsfunktion (ACF, Formel 1.4) ausgewertet (Abbildung 4.5).

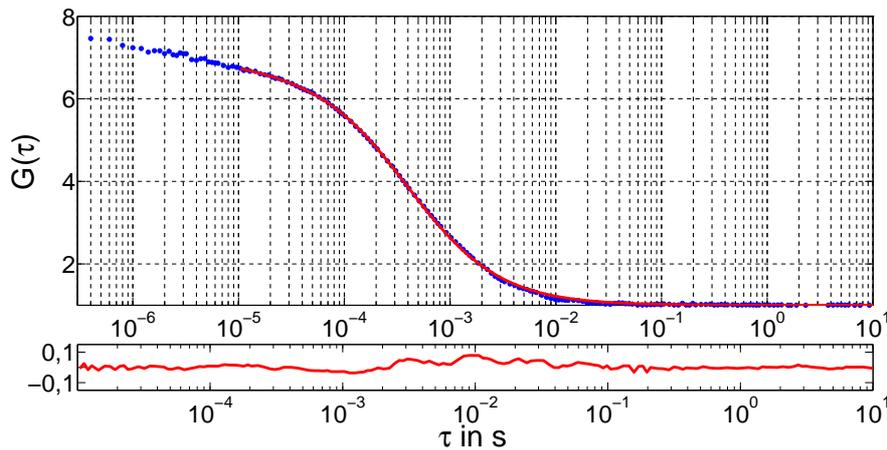


Abbildung 4.5: FCS-Messung von 1 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 60 s (blau) und Zweikomponenten Fit mit bei $35,4\ \mu\text{s}$ festgesetztem τ_{D_1} (rot).

Die Zweikomponenten Auswertung fand für Alexa-ABT-325 einen Anteil von $99,7 \pm 0,9\%$, bei einem festgesetzten τ_{D_1} von $35,4\ \mu\text{s}$ und einem mittlerem gefitteten τ_{D_2} von $399,7 \pm 14,7\ \mu\text{s}$. Die Abtrennung des freien Labels erfolgte also innerhalb der Nachweismöglichkeiten vollständig.

4.1.2 Labeffizienz und -verteilung

ABT-325 verfügt u.a. über 88 Lysine, deren NH_2 Gruppen potentiell bei einer Farbstoffmarkierung umgesetzt werden können. Durch Absorptionsmessungen (siehe Kapitel 3.2.2) wurde die Labeffizienz (κ) des aus dem Reaktionsgemisch abgetrennten Alexa-ABT-325 bestimmt. Die Berechnungen erfolgten nach Formel 3.1 und 3.2 (siehe Kapitel 3.3.3.4) und ergaben ein κ von 4,6 für das verwendete Alexa-ABT-325. Die sich aus κ

ergebende Poissonverteilung der Wahrscheinlichkeiten für die verschiedenen Anzahlen von Farbstoffmolekülen pro Antikörper ($P_{\kappa}(n)$) ist in Abbildung 4.6 gezeigt.

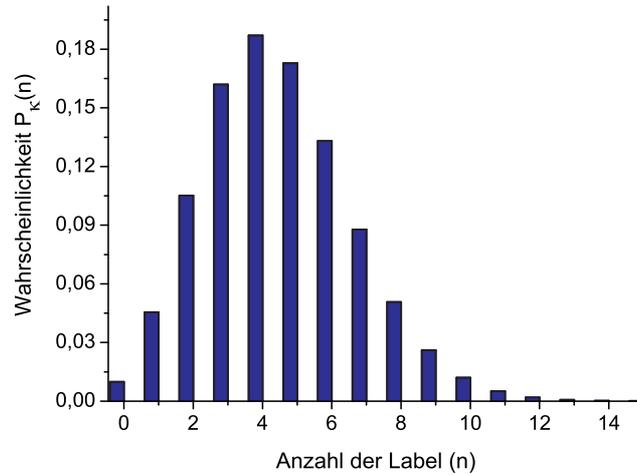


Abbildung 4.6: Wahrscheinlichkeit $P_{\kappa}(n)$ für n Label pro Alexa-ABT-325 bei einer Labelleffizienz von $\kappa = 4,6$.

Die Werte für die einzelnen Wahrscheinlichkeiten $P_{\kappa}(n)$ sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Bei einer Labelleffizienz von $\kappa = 4,6$ ergibt sich somit eine Wahrscheinlichkeit für ein ABT-325 ohne Farbstoffmolekül $P_{4,6}(0)$ von 0,985% (Abbildung 4.7). Alexa-ABT-325 war zu > 99% mit dem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt. Unmarkierter ABT-325 als störende Verunreinigung bei der Untersuchung der Aggregatbildung konnte daher ausgeschlossen werden.

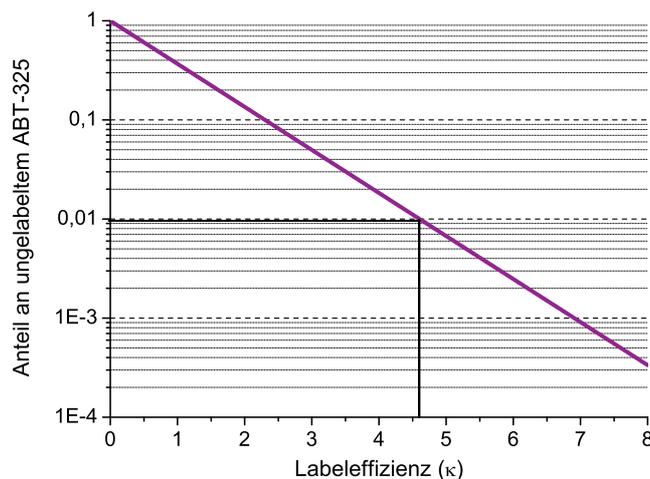


Abbildung 4.7: Anteile von ABT-325 ohne Fluoreszenzlabel $P_{\kappa}(0)$ bei verschiedenen Labelleffizienzen κ . In Schwarz ist der Anteil an ungelabeltem ABT-325 bei der gefundenen Labelleffizienz von $\kappa = 4,6$ gezeigt.

4.1.3 Identität

Die Identität des fluoreszenzmarkierten Antikörpers Alexa-ABT-325 wurde über die MALDI-TOF MS verifiziert. Das Massenspektrum zeigt für Alexa-ABT-325 einen Massenpeak $[M^+]$ von $m/z = 151.853$ (berechnet $m/z = 151.802$) (Abbildung 4.8).

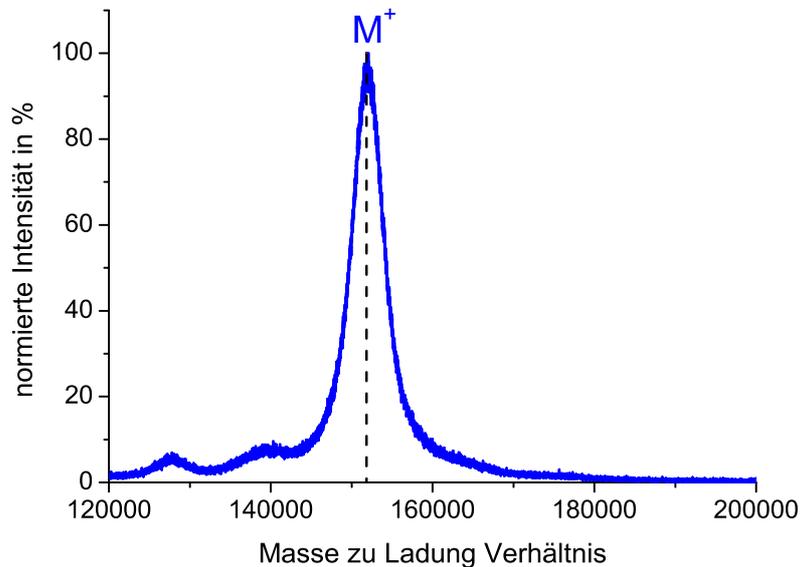


Abbildung 4.8: Normiertes Massenspektrum von Alexa-ABT-325 mit dem Massenpeak $[M^+]$ von $m/z = 151.853$.

Die Masse eines Alexa-ABT-325 war aufgrund des Alexa Fluor[®] 532 Anteils um 2877 Da größer als die von ABT-325 (siehe Kapitel 4.2.2). Da die Masse von Alexa Fluor[®] 532 ohne die Sulfosuccinimidylabgangsgruppe (Abbildung 3.2) mit 609 Da einging, ließ sich für ein Alexa-ABT-325 eine Anzahl von 4,7 Alexa Fluor[®] 532 berechnen.

Der Wert von 4,6 für κ aus der Absorptionsmessung (siehe Kapitel 4.1.2) unterschied sich nur um 0,1 von dem κ Wert 4,7, der mittels MALDI-TOF MS bestimmt wurde.

4.2 ABT-325-BS³ Dimere

4.2.1 Synthese und Aufreinigung

Für die Untersuchung der Antikörperdimerisierung sollte ein stabil kovalent verbundenes Dimer als Referenzsubstanz für fluoreszenzmikroskopische Analysemethoden hergestellt werden. Die Möglichkeit, ABT-325 kovalent zu dimerisieren, wurde zunächst mit nicht fluoreszenzmarkiertem ABT-325 untersucht. Dazu wurde 13 μM ABT-325 in PBS mit 4 mM BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat) 1 h lang umgesetzt (siehe Kapitel 3.3.4.1). Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte mit PBS als Laufmittel über eine SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule (Abbildung 4.9 und Kapitel 3.2.4).

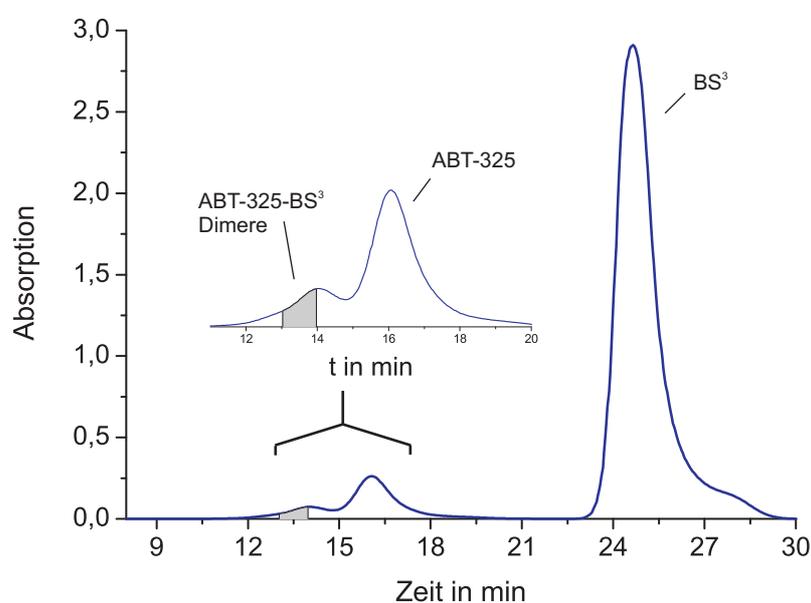


Abbildung 4.9: Isolierung von ABT-325-BS³ Dimeren über eine SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule. Detektion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. In Grau ist die verwendete Dimerfraktion hervorgehoben.

Die Identität von ABT-325-BS³ Dimer wurde anhand der in Abbildung 4.9 grau gezeigten 80 μL Fraktion untersucht.

4.2.2 Identität

Die normierten Massenspektren von dimerisiertem ABT-325-BS³ und monomerem ABT-325 sind in Abbildung 4.10 gezeigt. Für das ABT-325-BS³ Dimer wurden Massenpeaks mit $m/z = 151.458$ für $[M^{2+}]$, $m/z = 227.983$ für $[2M^{3+}]$ und $m/z = 304.464$ für $[M^+]$ (30,9%) gefunden. Das ABT-325 Monomer zeigte Massenpeaks von $m/z = 148.976$ für $[M^+]$ und $m/z = 299.076$ für $[2M^+]$ (11,8%).

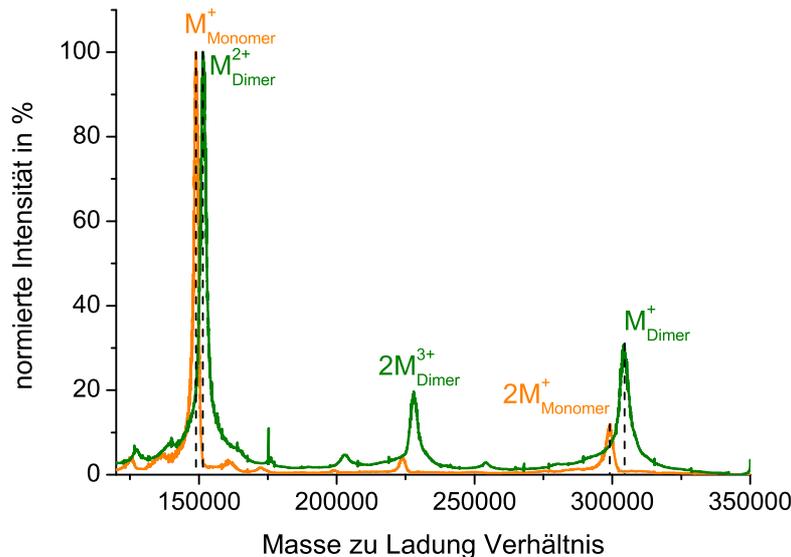


Abbildung 4.10: Normierte Massenspektren von ABT-325 Monomer (orange) und ABT-325-BS³ Dimer (grün) mit den Massenpeaks $[M^+]$ und $[2M^+]$ des Monomers und den Massenpeaks $[M^+]$, $[M^{2+}]$ und $[2M^{3+}]$ des Dimers.

Die Masse eines ABT-325-BS³ Dimers war aufgrund des BS³ Linkeranteiles um 6512 Da größer als die von zwei ABT-325 Monomeren. Die Masse eines BS³ Linkers ohne die Sulfosuccinimidylabgangsgruppen ging mit 156 Da ein (Abbildung 4.11) [95]. Dadurch ließ sich für ein ABT-325-BS³ Dimer eine Anzahl von 41,7 BS³ Linker berechnen.

Durch die Verwendung der niedrigen ABT-325 Konzentration ($13 \mu M$) bei der Vernetzung wurde die Bildung von nennenswerten Mengen größerer Aggregate vermieden. Diese konnten im Bereich $< 12 \text{ min}$ des Chromatogramms nicht gefunden werden (Abbildung 4.9).

4.3 Alexa-ABT-325-BS³ Dimere

4.3.1 Synthese und Aufreinigung

Zur Herstellung von Alexa-ABT-325-BS³ wurde ABT-325 zuerst fluoreszenzmarkiert und dann mit BS³ kovalent zu Dimeren verbunden. Die Reaktionsgleichung für die Vernetzung von zwei Alexa-ABT-325 mit BS³ ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

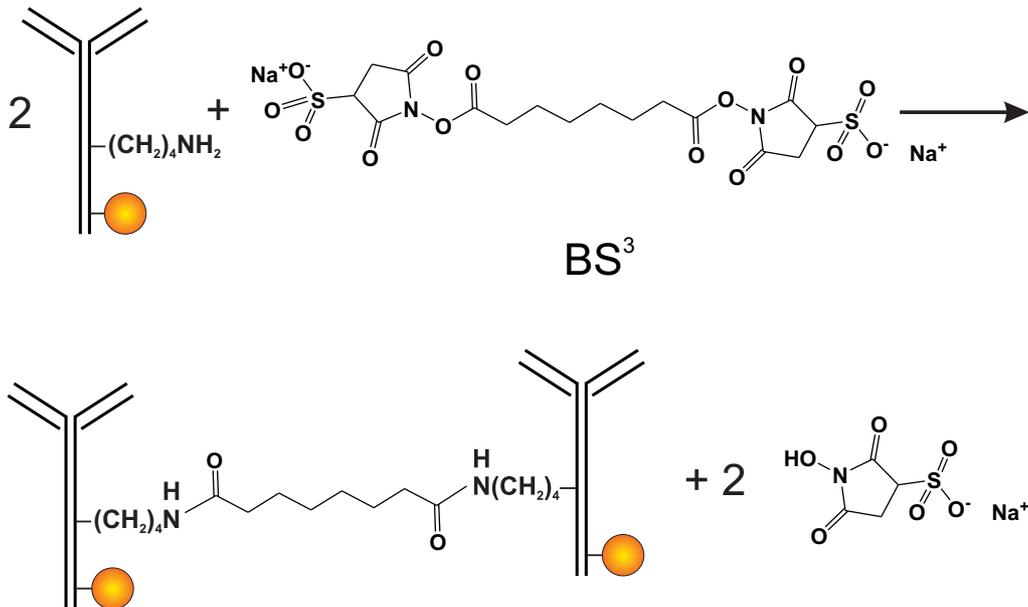


Abbildung 4.11: Vernetzung von zwei Alexa-ABT-325 Antikörpern mit BS³. Alexa-ABT-325 wurde als stilisierter Antikörper mit gelboranger Kreisfläche als Symbol für die Alexa Fluor[®] 532 Markierung dargestellt.

Die Auftrennung des Reaktionsansatzes erfolgte über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Laufmittel (Abbildung 4.12).

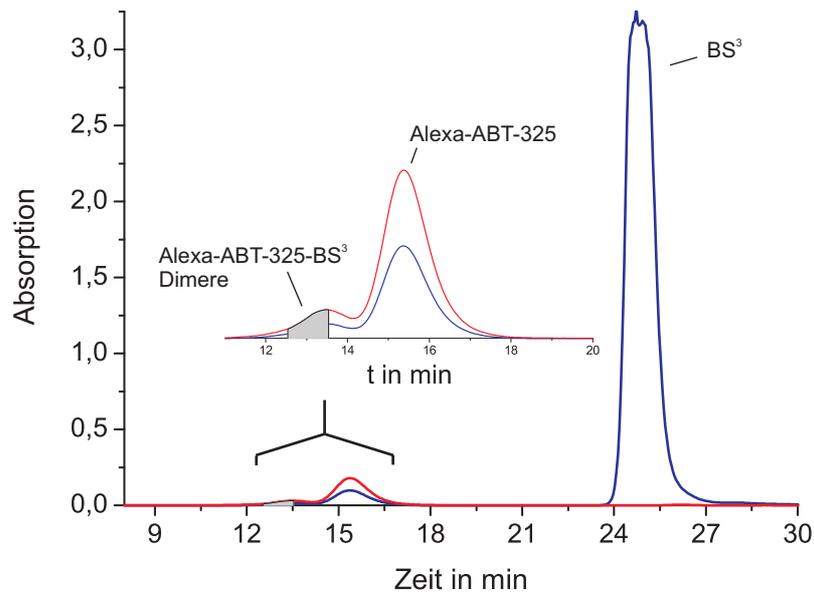


Abbildung 4.12: Isolierung von Alexa-ABT-325-BS³ Dimeren über eine SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Fließmittel. Detektion bei $\lambda = 280\text{nm}$ (blau) und 532nm (rot). In Grau ist die verwendete Alexa-ABT-325-BS³ Fraktion hervorgehoben.

Durch die Verwendung der niedrigen Alexa-ABT-325 Konzentration ($5\mu\text{M}$) wurde die Bildung von größeren Aggregaten vermieden. Die bei einer Wellenlänge von 280nm aufgenommene Absorptionskurve zeigt, dass die Abtrennung des freien BS³ vollständig erfolgte. Die Abtrennung der Alexa-ABT-325-BS³ Dimere von den Alexa-ABT-325 Monomeren erfolgte nicht vollständig, wie die Absorptionskurven in Abbildung 4.12 zeigen. Daher wurde nur die vordere in Grau gezeigte $80\mu\text{L}$ große Alexa-ABT-325-BS³ Fraktion verwendet.

4.3.2 Identität

In Abbildung 4.13 ist das normierte Massenspektrum von Alexa-ABT-325-BS³ Dimer zu sehen. Es zeigt Massenpeaks von $m/z = 154.516$ für $[\text{M}^{2+}]$, $m/z = 232.173$ für $[2\text{M}^{3+}]$ und $m/z = 309.752$ für $[\text{M}^+]$ (43,9%).

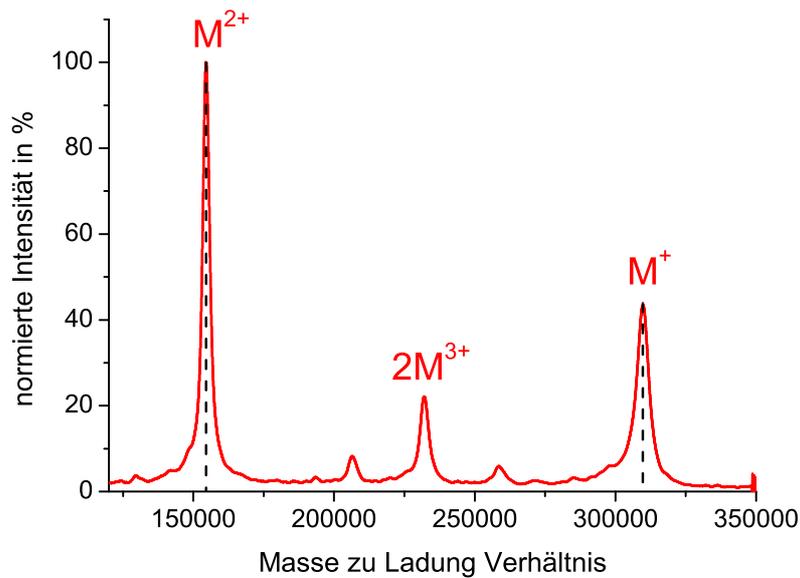


Abbildung 4.13: Normiertes Massenspektrum des Alexa-ABT-325-BS³ Dimers mit den $[M^+]$, $[M^{2+}]$ und $[2M^{3+}]$ Massenpeaks.

Die Masse eines Alexa-ABT-325-BS³ Dimers war aufgrund des BS³ Linkeranteiles um 6046 Da größer als die von zwei Alexa-ABT-325 Monomeren (siehe Kapitel 4.1.3), was einer Anzahl von 38,8 BS³ Linkern entsprach.

Dies war annähernd die Anzahl von Linkern (41,7), die bei den ABT-325-BS³ Dimeren gefunden wurde (siehe Kapitel 4.2.2). Der Einfluss der Alexa Fluor[®] 532 Markierung auf die Möglichkeit, die Antikörper mit BS³ zu vernetzen, war also gering.

4.3.3 Theoretische Betrachtung zur Labelverteilung

Alexa-ABT-325-BS³ wurde aus Alexa-ABT-325 durch Dimerisierung hergestellt. Da κ für Alexa-ABT-325 4,6 war, wurde für Alexa-ABT-325-BS³ ein Wert von $\kappa = 9,2$ angenommen. Die Poissonverteilungen der Label für Alexa-ABT-325-BS³ und Alexa-ABT-325 sind in Abbildung 4.14 gezeigt. Die einzelnen Werte der Wahrscheinlichkeiten für n Label pro Antikörper $P_{\kappa}(n)$ bei $\kappa = 4,6$ für Alexa-ABT-325 und $\kappa = 9,2$ sind in Tabelle 4.1 gezeigt.

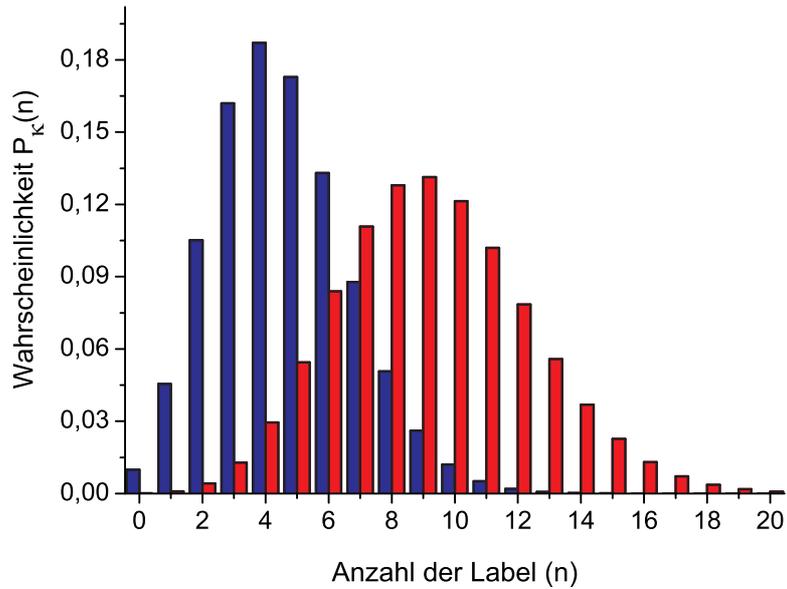


Abbildung 4.14: Wahrscheinlichkeit für n Label pro Antikörper $P_{\kappa}(n)$ bei einer Labeleffizienz von $\kappa = 4,6$ für Alexa-ABT-325 (blau) und $\kappa = 9,2$ für Alexa-ABT-325-BS³ Dimere (rot).

Tabelle 4.1: Wahrscheinlichkeit für n Label pro Antikörper $P_{\kappa}(n)$ bei $\kappa = 4,6$ (Monomer) und $\kappa = 9,2$ (Dimer).

n	$P_{\kappa}(n)$ Monomer	$P_{\kappa}(n)$ Dimer
0	$9,85 \times 10^{-3}$	$9,71 \times 10^{-5}$
1	$4,55 \times 10^{-2}$	$8,97 \times 10^{-4}$
2	0,11	$4,14 \times 10^{-3}$
3	0,16	$1,28 \times 10^{-2}$
4	0,19	$2,95 \times 10^{-2}$
5	0,17	$5,45 \times 10^{-2}$
6	0,13	$8,39 \times 10^{-2}$
7	$8,78 \times 10^{-2}$	0,11
8	$5,07 \times 10^{-2}$	0,13
9	$2,60 \times 10^{-2}$	0,13
10	$1,20 \times 10^{-2}$	0,12
11	$5,05 \times 10^{-3}$	0,10
12	$1,95 \times 10^{-3}$	$7,85 \times 10^{-2}$
13	$6,91 \times 10^{-4}$	$5,58 \times 10^{-2}$
14	$2,28 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-2}$
15	$7,03 \times 10^{-5}$	$2,27 \times 10^{-2}$
16	$2,03 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-2}$
17	$5,51 \times 10^{-6}$	$7,12 \times 10^{-3}$
18	$1,42 \times 10^{-6}$	$3,65 \times 10^{-3}$
19	$3,44 \times 10^{-7}$	$1,78 \times 10^{-3}$
20	$7,95 \times 10^{-8}$	$8,21 \times 10^{-4}$

Die aus der gemessenen Labeffizienz erstellte Verteilung der Wahrscheinlichkeit von n Labeln pro ABT-325 $P_{4,6}(n)$ (siehe Kapitel 4.1.2) überlagerte die theoretische Verteilung $P_{9,2}(n)$ für das Dimer. In dem Bereich, wo sich die beiden Verteilungen überlagern, ist die eindeutige Zuordnung einer Labelzahl zu dem monomeren oder dimeren Alexa-ABT-325 nicht möglich. Das deutet darauf hin, dass eine Unterscheidung der Antikörpermonomere und -dimere anhand der Helligkeit problematisch ist.

4.4 Fotophysikalische Eigenschaften von Alexa-ABT-325

4.4.1 Absorption

In Abbildung 4.15 sind die normierten Absorptionsspektren von Alexa Fluor[®] 532 und Alexa-ABT-325 in PBS gezeigt.

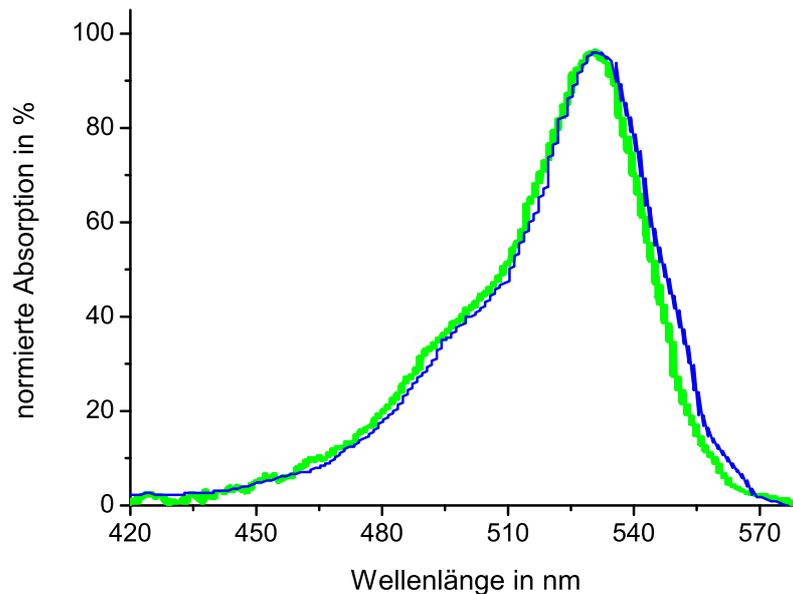


Abbildung 4.15: Normierte Absorptionsspektren von Alexa Fluor[®] 532 (grün) und Alexa-ABT-325 (blau).

Die Absorptionsmaxima von Alexa-ABT-325 und Alexa Fluor[®] 532 in PBS lagen beide bei 531 nm . Der fast identische Verlauf der Absorptionsspektren im Bereich von 420 nm bis 580 nm zeigte, dass der Farbstoff durch die Kopplung an ABT-325 sein Absorptionsverhalten nicht substantiell veränderte.

4.4.2 Emission

In Abbildung 4.16 sind die normierten Emissionsspektren von Alexa Fluor[®] 532 und Alexa-ABT-325 in PBS gezeigt. Dabei wurde eine Anregungswellenlänge von 490 nm verwendet.

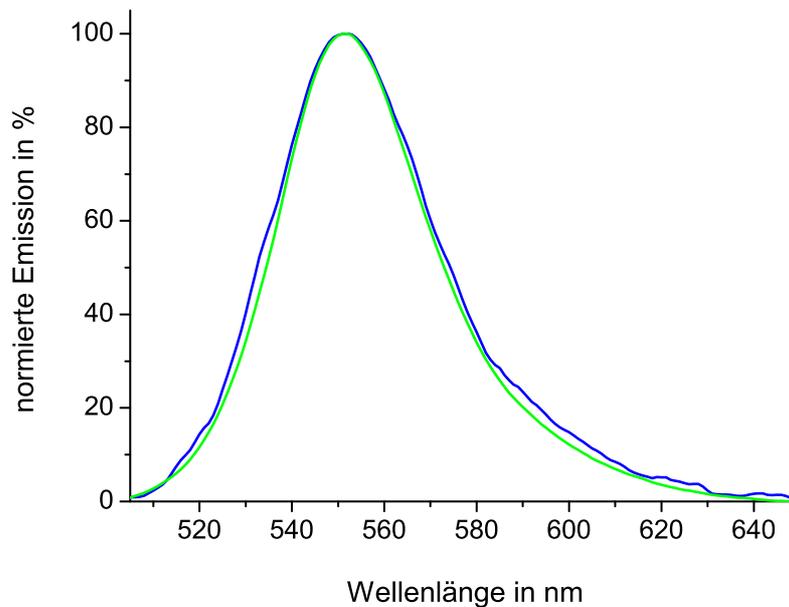


Abbildung 4.16: Normierte Emissionsspektren von Alexa Fluor[®] 532 (grün) und Alexa-ABT-325 (blau). Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm aufgenommen.

Die Maxima der Emissionsspektren von Alexa-ABT-325 und Alexa Fluor[®] 532 lagen beide bei 552 nm. Im Bereich von 505 nm bis 650 nm verliefen die Emissionsspektren sehr ähnlich was zeigte, dass sich das Emissionsverhalten von Alexa Fluor[®] 532 in PBS nach der Kopplung an ABT-325 nicht wesentlich änderte (Abbildung 4.16).

4.4.3 Fotostabilität

Fluoreszenzbasierte Analysemethoden erfordern Fluoreszenzfarbstoffe, die bei gegebener Anregungsleistung und Messdauer eine ausreichende Fotostabilität besitzen. Für Techniken wie z. B. die FCS und PCH, bei denen ein linearer Zusammenhang zwischen Zählrate und Teilchenzahl zwingend erforderlich ist, sind Laserleistungen zu verwenden, bei denen die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs nicht gesättigt ist.

4.4.3.1 Laserleistung

Das Emissionsverhalten von 5 nM Alexa Fluor[®] 532 wurde in PBS mittels FCS bei verschiedenen Laserleistungen von $0,31\ \mu\text{W}$ bis $15\ \mu\text{W}$ anhand von jeweils zehn Messungen mit einer Messdauer von 60 s untersucht. Mittels der ACCs wurden die Zählraten pro Molekül bestimmt, die je nach Laserleistung zwischen $2,2 \pm 0,1\text{ kHz}$ und $68,2 \pm 0,5\text{ kHz}$ lagen. Abbildung 4.17 stellt den Zusammenhang zwischen Laserleistung und Zählrate pro Molekül dar.

Soweit nicht anders erwähnt, wurde für alle fluoreszenzmikroskopischen Experimente die Leistung des Argon-Ionen-Laser von 22 mW ($\lambda = 514\text{ nm}$) durch Verwendung eines Graufilters ($\text{OD} = 2$) auf $1,44\ \mu\text{W}$ hinter dem Objektiv reduziert. Diese Leistung lag noch in dem in Abbildung 4.17 rot angedeuteten linearen Bereich, dessen Verlauf durch einen linearen Fit der ersten drei Werte bestimmt wurde.

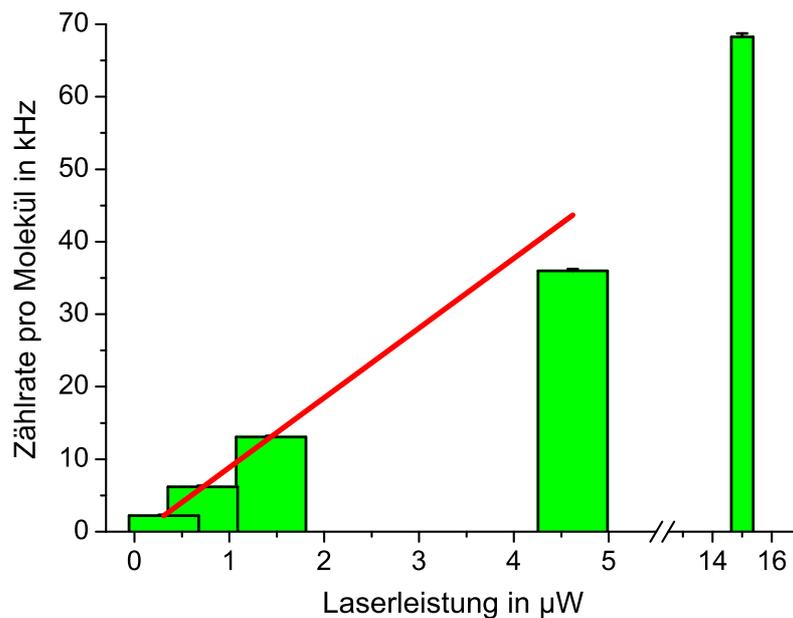


Abbildung 4.17: Zählraten pro Molekül von 5 nM Alexa Fluor[®] 532 in PBS bei verschiedenen Laserleistungen als Mittelwerte aus jeweils zehn Messungen von 60 s Dauer.

Bei größeren Laserleistungen von $> 4,5\ \mu\text{W}$ verlor sich der lineare Zusammenhang zwischen Laserleistung und Zählraten pro Molekül.

Bei der gewählten Laserleistung von $1,44\ \mu\text{W}$ wurden zehn ACCs (Messdauer jeweils

60 s) von Alexa Fluor[®] 532 in PBS generiert, deren Auswertung eine Zählrate pro Molekül von 13,1 kHz ergab (Abbildung 4.18).

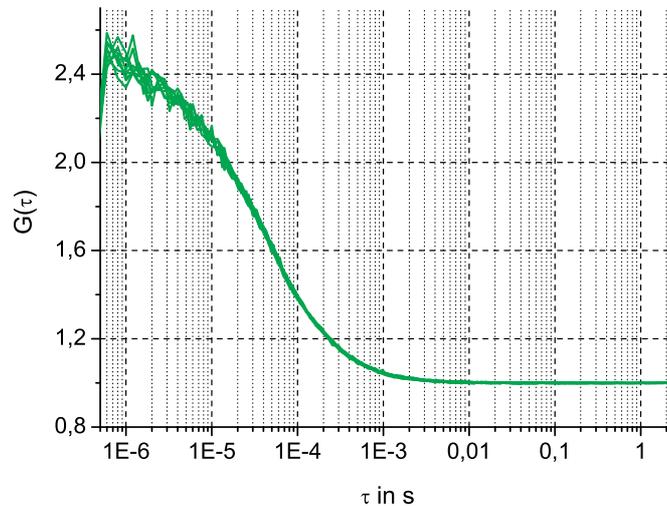


Abbildung 4.18: Zehn Autokorrelationskurven von 5 nM in PBS vermessenem Alexa Fluor[®] 532. Die Laserleistung betrug 1,44 μ W, die Messdauer war 60 s.

Die Darstellung der Fluoreszenzfluktuationen mittels PCH ergab in der halblogarithmischen Auftragung der Häufigkeitsverteilung der Ereignisse pro Bin einen nahezu linearen Zusammenhang. Dieser Befund belegt, dass die Anregung von Alexa Fluor[®] 532 bei der gewählten Laserleistung keine Sättigungseffekte zeigte (Abbildung 4.19).

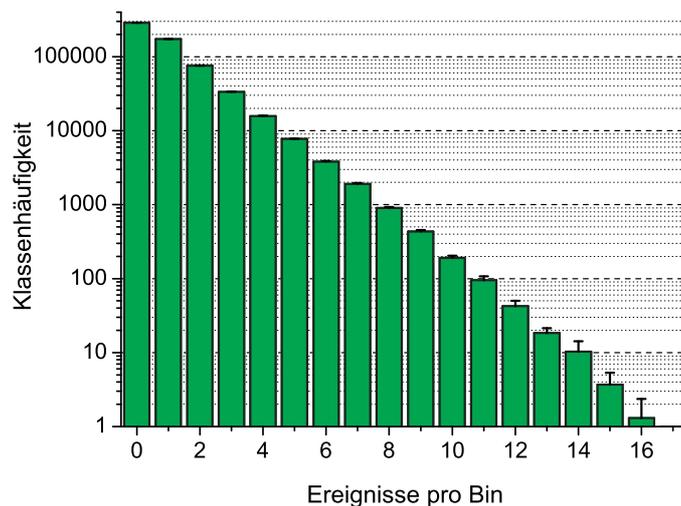


Abbildung 4.19: Mittelwerte und Standardabweichungen aus zehn PCHs, die mit einer Binbreite von 100 μ s aus Messungen von 5 nM Alexa Fluor[®] 532 in PBS bei einer Laserleistung von 1,44 μ W und einer Messdauer von jeweils 60 s erstellt wurden.

4.4.3.2 Stabilität

Die Fotostabilität von $19\mu\text{M}$ Alexa Fluor[®] 532 in PBS wurde durch Bestrahlung mit einem Festkörperlaser ($\lambda = 532\text{nm}$, $P = 40,3\text{mW}$) in einer Quarzküvette und Messung der Absorption ($\lambda = 532\text{nm}$) untersucht. In Tabelle 4.2 stehen die nach der Zeit t erhaltenen Absorptionswerte. Die für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente bei der Anregungswellenlänge 514nm und einer Anregungsleistung von $1,44\mu\text{W}$ umgerechneten Zeiten t'' sind auch in der Tabelle 4.2 dargestellt (siehe Kapitel 3.3.3.6).

Tabelle 4.2: Bestrahlungsdauer t , normierte Absorptionswerte bei $\lambda = 532\text{nm}$ nach der Bestrahlung mit der Leistung $P_{532\text{nm}} = 40,3\text{mW}$ und für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen bei der Leistung $P_{514\text{nm}} = 1,44\mu\text{W}$ korrigierten Bestrahlungsdauer t'' .

t in min	Absorption	t'' in h
0	100%	0
10	99,7%	14,9
30	99,1%	44,6
50	98,3%	74,3
70	97,5%	104,0
90	96,8%	
150	93,8%	
210	90,5%	
270	87,3%	
330	84,0%	

Aus der Fotostabilitätsmessung ergab sich, dass bei der verwendeten Anregungsleistung $P_{514\text{nm}} = 1,44\mu\text{W}$ auch bei langen Versuchsdauern von mehreren Stunden keine merklichen Bleicheffekte auftraten.

4.5 Fluoreszenzmikroskopische Messungen von Alexa-ABT-325

4.5.1 Adsorption

Die Adsorption von IgGs an Glasoberflächen ist ein bekannter Effekt [106] und musste auch für Alexa-ABT-325 untersucht werden. Diese Untersuchung war notwendig, da die Adsorption an der Glasoberfläche die Anzahl der Alexa-ABT-325 Moleküle im fluoreszenzmikroskopischen Experiment vermindert und eine Messung von Antikörperdimeren stört oder verhindert.

Die Adsorption fluoreszierender Partikel lässt sich mittels sogenannter Z-Scans nachweisen. Dabei durchwandert das fokussierte Beobachtungsvolumen die Probe vertikal (in Z-Richtung). Es trifft zunächst das Deckglas, um danach in die Untersuchungslösung einzutauchen. In Abbildung 4.20 sind Z-Scans für Alexa Fluor[®] 532 (A) und für den adsorbierten Alexa-ABT-325 Antikörper (B) gezeigt. Die Adsorption gibt sich durch ein hohes Fluoreszenzsignal unmittelbar hinter dem Deckglas zu erkennen (Abbildung 4.20 B).

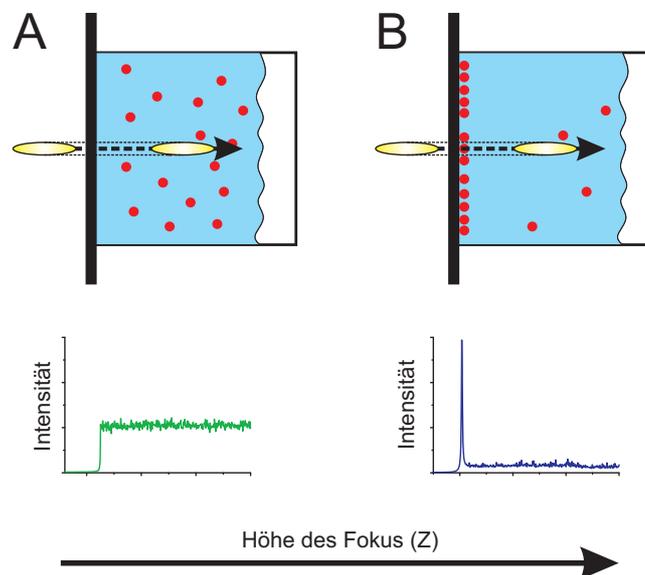


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung des um 90° nach rechts gekippten Versuchsablauf von Z-Scans einer Alexa Fluor[®] 532 (A) und einer Alexa-ABT-325 (B) Probe in unbehandelten Kammerdeckgläsern mit dem sich bewegenden Fokus (gelb) und den sich in der Lösung befindlichen fluoreszenten Molekülen (rot).

Die Adsorption von 12 nM Alexa-ABT-325 in PBS an den Glasboden eines Lab-Tek™ Kammerdeckglases ist in Abbildung 4.21 wiedergegeben, wobei die Menge des adsorbierten Alexa-ABT-325 mit der Zeit zunimmt. Dies sieht man an der Intensitätszunahme an der Glasoberkante zwischen dem bei 0 min (rot) und dem nach 15 min (orange) gemachten Z-Scan.

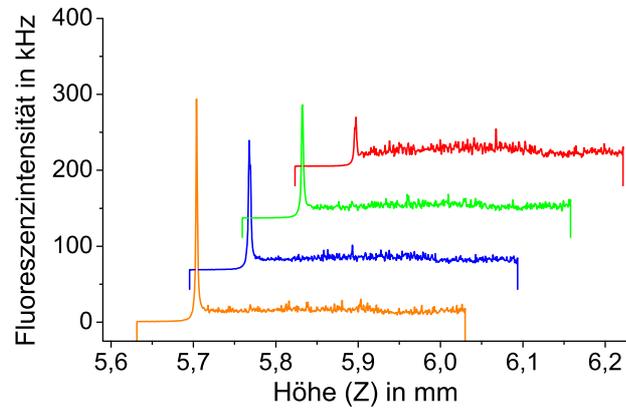


Abbildung 4.21: Wasserfalldiagramm der Z-Scans von 12 nM Alexa-ABT-325 in PBS in einem unbehandelten Lab-Tek™ Kammerdeckglas nach 0 min (rot), 5 min (grün), 10 min (blau) und 15 min (orange) Inkubationszeit.

Bei den Z-Scans von 12 nM Alexa-ABT-325 in dem mit 5% Milchpulver in PBS beschichtetem Lab-Tek™ Kammerdeckglas sieht man bei keiner der Inkubationszeiten von 0 min bis 60 min einen Intensitätsspeak (Abbildung 4.22). Die in Abbildung 4.21 gezeigte Adsorption von Alexa-ABT-325 in PBS kann also durch das Beschichten der Lab-Tek™ Kammerdeckgläser verhindert werden.

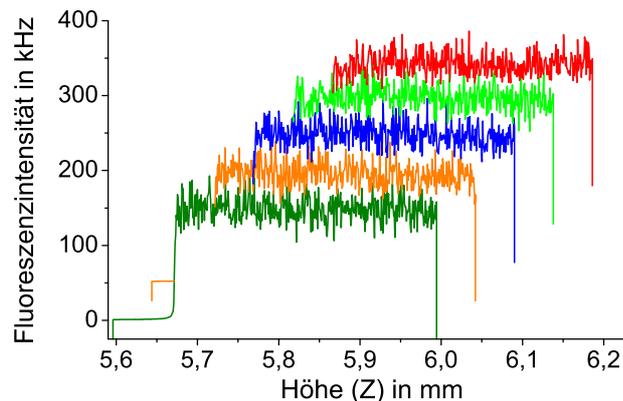


Abbildung 4.22: Wasserfalldiagramm der Z-Scans von 12 nM Alexa-ABT-325 in PBS in einem mit 5% Milchpulver in PBS beschichteten Lab-Tek™ Kammerdeckglas nach 0 min (rot), 5 min (grün), 10 min (blau), 15 min (orange) und 60 min (dunkelgrün) Inkubationszeit.

4.5.2 Intensitätsspuren

In dieser Arbeit sollte die Zunahme von Alexa-ABT-325 Aggregaten mit der Zeit untersucht werden. Dazu wurde Alexa-ABT-325 bei 4°C und 50°C bis zu 7d eingelagert. Eine Vergleichsprobe wurde bei -80°C gelagert. Es konnte angenommen werden, dass Dimere und Aggregate eine größere Helligkeit als Monomere haben. Daher wurden die aufzeichneten Fluoreszenzintensitätsspuren auf intensitätsstarke Fluoreszenzereignisse, als Indikator für die Alexa-ABT-325 Aggregation, hin untersucht. Die Fluoreszenzintensitätsspuren wurden alle mit 2nM Alexa-ABT-325 in PBS nach der Lagerung bei -80°C (A), sieben Tage bei 4°C (B) und 50°C (C) über 600s aufgenommen (Abbildung 4.23). Sie wurden aus TTTR-Daten mit einer Binbreite von 1ms erstellt.

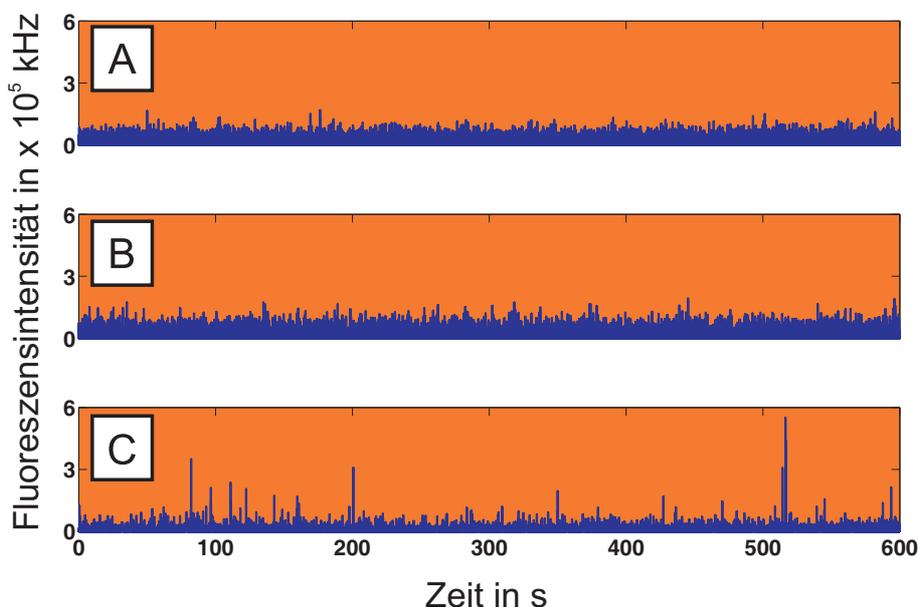


Abbildung 4.23: Fluoreszenzintensitätsspuren von 2nM Alexa-ABT-325 in PBS nach Lagerung bei -80°C (A), sieben Tage bei 4°C (B) und sieben Tage bei 50°C (C). Die Fluoreszenzintensität ist in Ereignisse pro Bin bei einer Binbreite von 1ms angegeben ($\equiv kHz$).

Die Fluoreszenzintensitätsspur des sieben Tage bei 4°C gelagerten Antikörpers unterschied sich nicht von der Intensitätsspur des bei -80°C gelagerten Antikörpers. Im Gegensatz dazu zeigte die Fluoreszenzintensitätsspur der bei 50°C gelagerten Probe deutliche Zeichen für große Alexa-ABT-325 Aggregate, die mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden nachweisbar sind.

4.5.3 FCS

Die FCS ist eine fluoreszenzmikroskopische Methode, die bewegliche Teilchen mit hinreichend unterschiedlicher Geschwindigkeit getrennt erfassen kann. Diese spiegeln sich in den Diffusionszeitkonstanten τ_D wieder, die von der ACF als die Wendepunkte der ACC beschrieben werden können.

Die τ_D von Alexa-ABT-325 wurde als Mittelwert aus 60 60 s Läufen an fünf Tagen mit $313 \pm 24 \mu s$ bestimmt. Die τ_D des Alexa-ABT-325-BS³ Dimer wurde als Mittelwert aus 31 60 s Läufen an drei Tagen mit $435 \pm 30 \mu s$ bestimmt.

In Abbildung 4.24 ist eine ACC einer Alexa-ABT-325 (blau) und einer Alexa-ABT-325-BS³ (rot) Probe gezeigt. Beide wurden mit einer Konzentration von 3 nM in PBS bei einer Laserleistung von 2,7 μW 60 s vermessen.

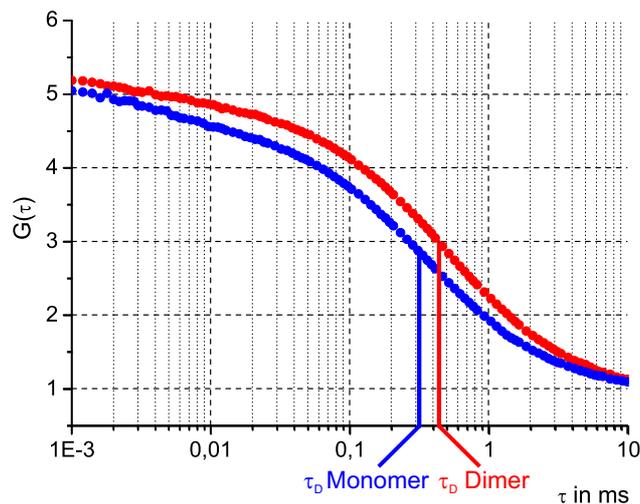


Abbildung 4.24: ACCs von 3 nM Alexa-ABT-325 (blau) und 3 nM Alexa-ABT-325-BS³ Dimeren (rot) in PBS mit angedeuteten Diffusionszeitkonstanten.

Da sich die Geschwindigkeitsverteilungen stark überlappen, konnten keine Dimeranteile mittels FCS bestimmt werden (Abbildung 1.9). Diese in der Literatur beschriebene Limitation der FCS wird bei der Betrachtung des Verlaufs von ACF Werten für Alexa-ABT-325 und Alexa-ABT-325 mit 5% Dimeranteil deutlich (Abbildung 4.25) [67, 107, 108]. Die ACF Werte $G(\tau)$ wurden mit den angenommenen Diffusionszeitkonstanten $\tau_{D_1} = 313 \mu s$ und $\tau_{D_2} = 435 \mu s$ für eine durchschnittliche Teilchenzahl von eins im Detektionsvolumen aus Formel 1.4 errechnet.

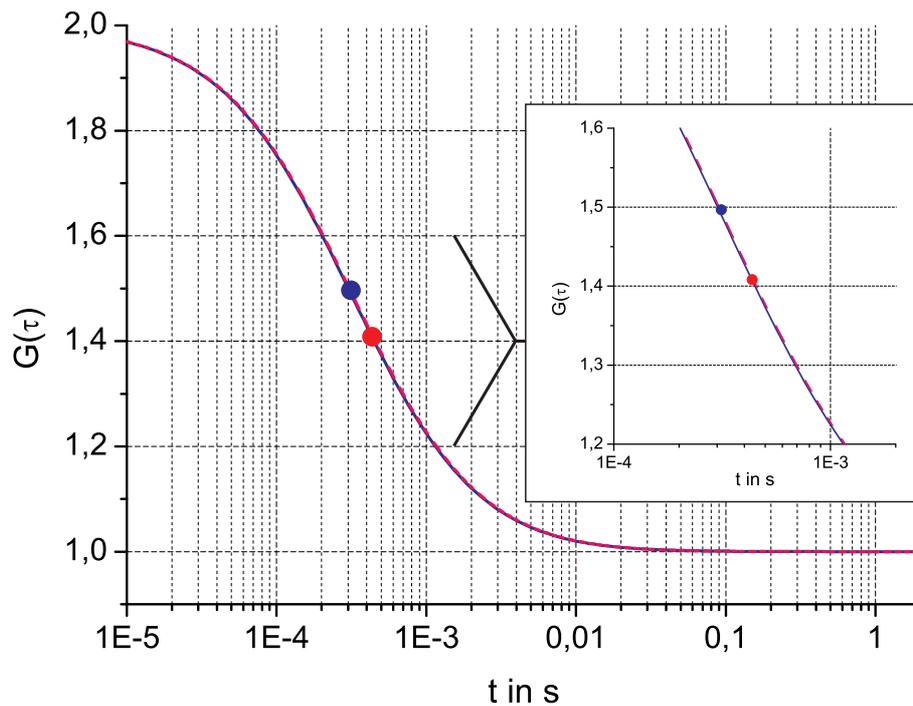


Abbildung 4.25: Theoretischer Verlauf von ACF Werten für Alexa-ABT-325 (blaue Linie) und Alexa-ABT-325 mit 5% Dimeranteil (magenta gestrichelt), mit den angenommenen Diffusionszeitkonstanten $\tau_{D_1} = 313 \mu s$ (blau) und $\tau_{D_2} = 435 \mu s$ (rot).

4.5.4 PCH

Die Quantifizierung des Dimeranteils in einer Probe von Monomeren war anhand der Diffusionszeitkonstanten nicht möglich, da sich die Geschwindigkeiten von Monomeren und Dimeren nicht ausreichend unterscheiden. Daher wurde versucht, eine Unterscheidung anhand der Helligkeiten mittels PCH zu treffen. Dies war aber kritisch, da wegen der Labelverteilung mit einem κ von 4,6 bei Alexa-ABT-325 keine einheitliche Helligkeitsverteilung zu erwarten war (Abbildung 4.6). Optimalerweise wäre jedes Dimer doppelt so hell wie jedes Monomer. Außerdem musste die PCH-Auswertung in einer für die Einphotonenmikroskopie angepassten Form verwendet werden (siehe Kapitel 1.2.5.1). Diese führte einen zusätzlichen Faktor für die außerhalb des idealen Fokus detektierten Photonen ein, was zu einer weiteren Unsicherheit in der PCH-Auswertung führte.

4.5.4.1 Auswertung gemessener Daten

Anhand einer Kontrollprobe wurde zunächst überprüft, inwieweit die PCH-Auswertung von TTTR-Daten das Alexa-ABT-325 Monomer als eine einzelne Komponente erfasst. Dazu wurde 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS zehnmal über eine Dauer von 10 min vermessen. Ein charakteristisches PCH und der Fit mit dem Einkomponenten-Modell des „PCH Data Processing Plugin“ ist in Abbildung 4.26 gezeigt [83].

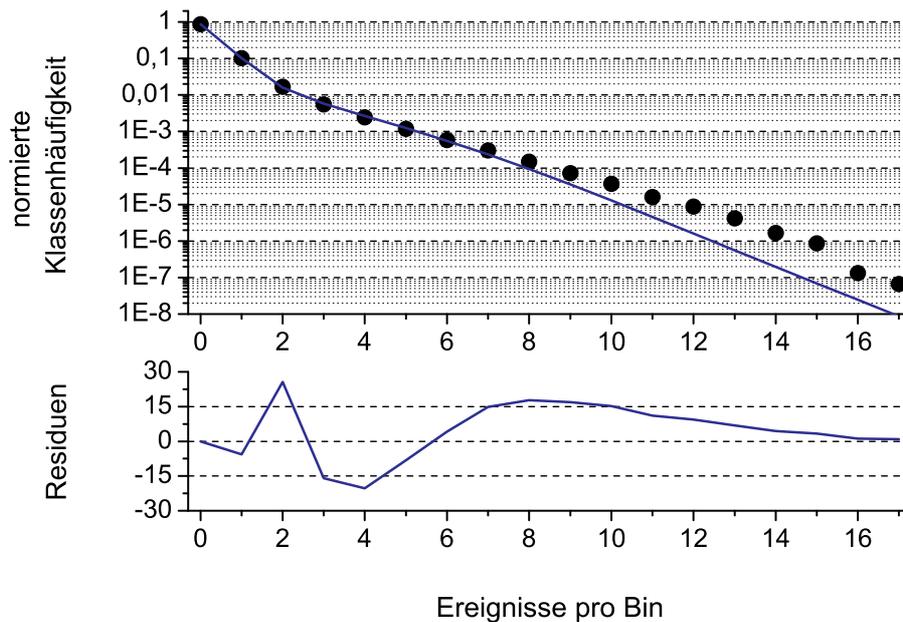


Abbildung 4.26: PCH-Daten (schwarze Punkte) einer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 10 min und Einkomponenten PCH-Fit (blaue Linie) und zugehörigen Residuen.

Während der Fit die Bins mit wenigen Ereignissen gut beschreibt, findet man ab sieben Ereignisse pro Bin zum Teil erhebliche Abweichungen von den gemessenen Daten. Ein Fit mit dem Zweikomponenten-Modell führte zu einer besseren Anpassung der Fitlinie an das PCH (Abbildung 4.27). Offenkundig führt die Labeleffizienz von Alexa-ABT-325 mit $\kappa = 4,6$ und einer davon abzuleitenden Labelverteilung zu zwei unterschiedlich hellen Komponenten, die sich mittels PCH beschreiben lassen.

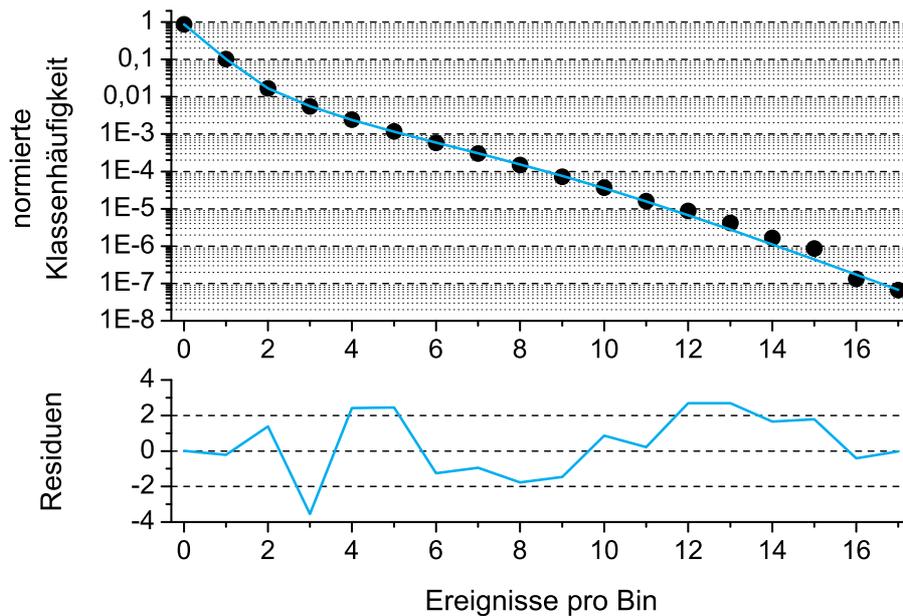


Abbildung 4.27: PCH-Daten (schwarze Punkte) einer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS, mit einer Messdauer von 10 min und Zweikomponenten PCH-Fit (cyan-farbene Linie) und zugehörigen Residuen.

Unter der Annahme, dass sich zwei unterschiedlich helle Komponenten mit den Helligkeiten ε_1 und ε_2 und den zugehörigen Teilchenzahlen \bar{N}_1 und \bar{N}_2 in der Alexa-ABT-325 Kontrollprobe identifizieren lassen, ergeben sich die in Tabelle 4.3 dargestellten Fit Ergebnisse.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Zweikomponenten PCH-Auswertung einer fluoreszenzmikroskopischer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit den mittleren Teilchenzahlen \bar{N} , den molekularen Helligkeiten ε und dem Korrekturfaktor F, dem Verhältnis der Emission innerhalb und außerhalb des theoretischen Fokus.

\bar{N}_1	$0,230 \pm 0.003$
ε_1	1.914 ± 0.016
\bar{N}_2	0.0695 ± 0.002
ε_2	5.910 ± 0.029
F	0.697 ± 0.008

Die Auswertung mittels Zweikomponenten Fit ergab 76,8% einer dunkleren (1) und 23,2% einer helleren (2) Komponente. Dabei war die molekulare Helligkeit ε_2 3,1 fach größer als ε_1 .

Da die Helligkeitsverteilung von Alexa-ABT-325 bereits zwei unterschiedlich helle Komponenten erkennen lässt, ist die exakte Quantifizierung eines geringen Dimeranteils als Bestandteil einer Monomerprobe mittels PCH-Auswertung kaum möglich.

4.5.4.2 Auswertung simulierter Daten

Dass die zwei unterschiedlich hellen Komponenten in den PCHs von Alexa-ABT-325 auf die Probe zurückzuführen waren, wurde durch die Simulation und Auswertung von PCH-Daten sichergestellt. Es wurden PCH-Daten mit 0%, 50% und 100% Dimeranteil und über eine Messdauer von 1 *min* simuliert. Dabei wurde der ideale Fall angenommen, dass ein Dimer doppelt so hell ist wie ein Monomer. Ein PCH mit 50% Dimeranteil und dem zugehörigen Zweikomponenten Fit (lila-farbene Linie) mit dem „PCH Data Processing Plugin“ ist in Abbildung 4.28 gezeigt [83]. Wobei die Residuen des Fits um den Faktor vier kleiner sind als die des Zweikomponenten Fits der realen Alexa-ABT-325 Probe (Abbildung 4.27). Dies deutete darauf hin, dass in der realen Alexa-ABT-325 Probe vermutlich mehr als zwei verschieden helle Komponenten enthalten waren und der Fit dort daher größere Abweichungen von den PCH-Daten zeigte.

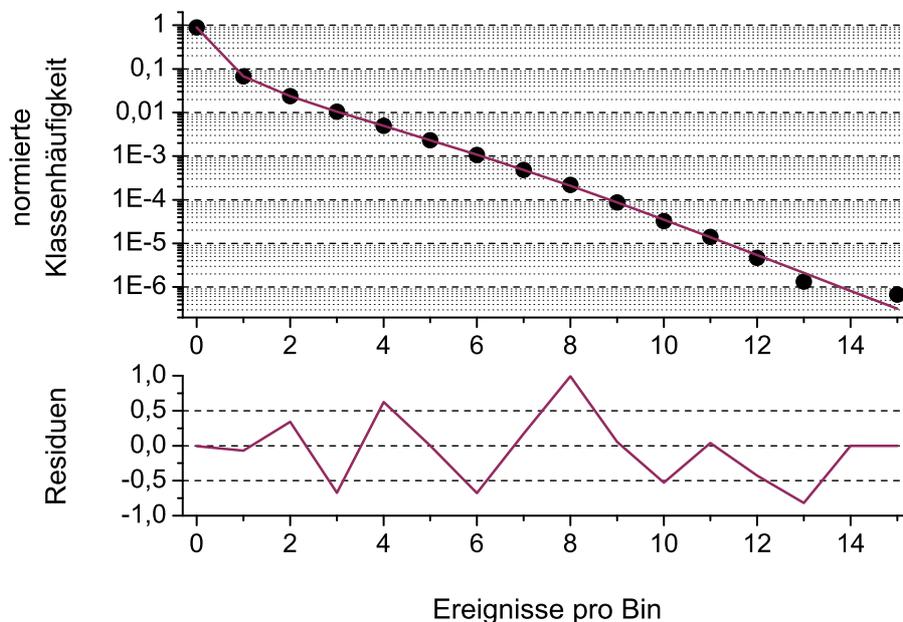


Abbildung 4.28: Die Abbildung zeigt mit 50% Monomer- und 50% Dimeranteil simulierte PCH-Daten (schwarze Punkte) und einen Zweikomponenten PCH-Fit (lila-farbene Linie) mit den sich ergebenden Residuen.

Die Ergebnisse der Auswertung von simulierten Daten sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Die simulierten Alexa-ABT-325 PCHs der Monomere und Dimere wurden mit dem Einkomponenten und das Gemisch mit dem Zweikomponenten-Modell ausgewertet. Dabei war \bar{N}_1 der Mittelwert der mittleren Teilchenzahl für den Monomer- und \bar{N}_2 für den Dimeranteil. ε_1 und ε_2 gaben den Mittelwert der molekularen Helligkeit des Monomer- und Dimeranteiles wieder. Der Korrekturfaktor F, das Verhältnis der Emission innerhalb und außerhalb des theoretischen Fokus, wurde nicht benötigt, da in den Simulationen nur Signale aus dem theoretischen Fokus kamen.

Tabelle 4.4: PCH Auswertungen von simulierten Daten. Mit den mittleren Teilchenzahlen \bar{N} und den molekularen Helligkeiten ε für Monomere, Dimere und einem Gemisch aus 50% Monomer und 50% Dimer.

	Monomere	Dimere	50% Monomere 50% Dimere
\bar{N}_1	$0,158 \pm 0,002$		$0,075 \pm 0,015$
ε_1	$2,318 \pm 0,020$		$2,293 \pm 0,297$
\bar{N}_2		$0,154 \pm 0,003$	$0,084 \pm 0,015$
ε_2		$4,640 \pm 0,059$	$4,547 \pm 0,206$

Bei der Auswertung des simulierten Gemisches aus 50% Monomer und 50% Dimer wurden die molekularen Helligkeiten (ε) der einzelnen Komponenten wiedergefunden. Dies zeigte, dass die verwendete PCH-Auswertung für die Einphotonenmikroskopie in der Lage war, Gemische anhand der Helligkeiten der enthaltenen Komponenten zu unterscheiden. Bei der Betrachtung der mittleren Teilchenzahl für den Monomeranteil $\bar{N}_1 = 47,4\%$ und für den Dimeranteil $\bar{N}_2 = 52,6\%$ mit einer Standardabweichung von jeweils 9% zeigte sich die Genauigkeit der PCH-Auswertung unter der Bedingung, dass ein Dimer $\varepsilon_2 = 4,640 \pm 0,059$ doppelt so hell war wie ein Monomer $\varepsilon_1 = 2,318 \pm 0,020$.

Die Quantifizierung eines Dimeranteils in einer realen Probe von Alexa-ABT-325 Monomeren ist anhand der Helligkeiten mittels PCH nicht möglich. Die in Abbildung 4.6 gezeigte Labelverteilung führt zu einer Helligkeitsverteilung, die eine sinnvolle Auswertung mit dem PCH-Modell verhindert.

4.5.5 Einzelereigniserkennung

Da die Quantifizierung eines Dimeranteils in einer Alexa-ABT-325 Probe anhand der Diffusionszeitkonstante und der Helligkeitsverteilung mittels FCS und PCH nicht möglich war, wurde eine Auswertung über die Ereignishelligkeiten als Quotient der Zählimpulse pro Ereignis und der Ereignislänge in der Einzelereigniserkennung versucht.

Dabei wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen ($n = 10$) von Alexa-ABT-325 in einer Konzentration von 2 nM in PBS über 10 min durchgeführt, wobei sich im zeitlichen Mittel nur $\approx 0,2$ Teilchen im Fokus aufhielten. Dass sich Ereignisse von mehreren Teilchen überlappen, konnte unter diesen Bedingungen nahezu ausgeschlossen werden. Zur Erzeugung einer Intensitätsspur wurden die TTTR-Daten dieser Messungen mit einer Dauer von $40\text{ }\mu\text{s}$ gebinnt. Mit diesen Intensitätsspuren konnte dann eine Einzelereigniserkennung mit zwei Schwellenwerten durchgeführt werden. Der untere Schwellenwert legt die Ereignislängen fest, der obere Schwellenwert wurde für die Unterscheidung zwischen Signal und Hintergrund genutzt. Die Schwellenwertkombinationen lagen dabei für den unteren Schwellenwert zwischen einem und acht Zählimpulsen pro Bin. Für den oberen Schwellenwert lagen die Werte zwischen zwei und neun Zählimpulsen pro Bin. Die niedrigste Intensität, die innerhalb eines Ereignisses erreicht werden musste damit dieses erkannt wurde, war 50 kHz bei zwei Zählimpulsen in einem Bin. Der höchste Schwellenwert von neun Zählimpulsen pro Bin entsprach einer Intensität von 225 kHz .

Die Verteilung der Ereignisintensitäten und die Anzahl der Ereignisse in Abhängigkeit der gewählten Schwellenwertkombination ist in Abbildung 4.29 gezeigt. Die Spannweite der gezeigten Ereignisintensitäten reicht von 75 kHz bei 60153 ± 596 Ereignissen für die untere Schwellenwertkombination eins/zwei bis zu 250 kHz bei 507 ± 28 Ereignissen für die oberste Schwellenwertkombination acht/neun. Die Einzelereigniserkennungen mit den dazwischen liegenden Schwellenwertkombinationen lieferten dabei Ergebnisse, die mit zunehmender Höhe der Schwellenwerte eine größere Ereignisintensität und eine kleinere Anzahl an Ereignissen lieferten.

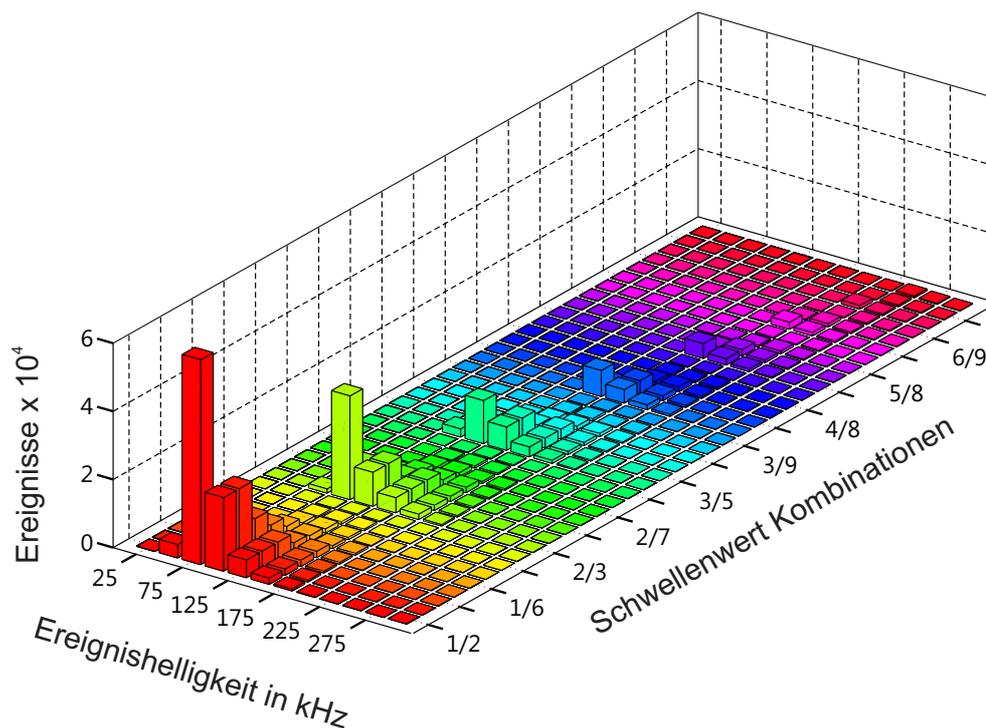


Abbildung 4.29: Verteilung der Intensitäten einzelner Ereignisse bei unterschiedlichen Schwellenwertkombinationen. Daten der Einzeleregniserkennung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 10 min ($n = 10$). Die Alexa-ABT-325 Probe wurde bei -80°C gelagert.

Die Labelverteilung von Alexa-ABT-325 führt zu den Verteilungen in den Ereignishelligkeiten für die einzelnen Schwellenwertkombinationen. Außerdem führt die Labelverteilung auch zu der Verteilung der Ereignishäufigkeiten bei den einzelnen Ereignishelligkeiten (Abbildung 4.29). Diese Verteilungen verhindern die Differenzierung zwischen Alexa-ABT-325 Monomeren und Dimeren, die maximal die doppelte Ereignishelligkeit der Monomere hätten. Da außerdem die Ereignishelligkeiten von Alexa-ABT-325 von der Anzahl der gebundenen Alexa Fluor[®] 532 Moleküle abhing und diese für Monomere und Dimere überlappten, war eine Quantifizierung des Dimeranteils auf diese Weise nicht möglich (siehe Kapitel 4.3.3).

4.6 Eine neue Methode für die Auswertung von ACCs

Da die Auswertungen von Fluoreszenzfluktuationsdaten mittels (i) Autokorrelationsfunktion (ACF) zur Untersuchung von Diffusionszeitkonstanten, (ii) Photonenzählhistogramm zur Untersuchung von molekularen Helligkeiten und (iii) Einzelereigniserkennung zur Unterscheidung von Ereignishelligkeiten für den Nachweis einer gerade einsetzenden Alexa-ABT-325 Dimerisierung ungeeignet sind, musste eine neue Auswertungsmethode entwickelt werden. Dabei wurde der Fokus auf den Bereich zwischen $0,1\text{ s}$ und 1 s der Autokorrelationskurve (ACC) von Monomer-Dimer-Gemischen gelegt, der weitestgehend Ereignisse abbildet, die von Dimeren erzeugt werden.

4.6.1 Prinzip der neuen Auswertungsmethode

Bei linear steigendem Anteil der zweiten Komponente nimmt die Amplitude einer normierten Zweikomponenten ACF im Bereich von $0,1\text{ s}$ bis 1 s linear zu. Dieser Zusammenhang gilt jedoch nur für ACFs mit den dort berücksichtigten Faktoren wie z.B. Strukturparameter, durchschnittliche Teilchenzahl im Detektionsvolumen, Diffusionszeitkonstanten und das Intervall für die Korrelationen der zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen. Bei ACCs, die aus realen Messungen stammen, geht allerdings auch das Hintergrundrauschen ein, was sich besonders bei kleinen Amplituden bemerkbar macht und den Zusammenhang zwischen dem Anteil der zweiten Komponente und der korrespondierenden Amplitude verzerrt. Da die Amplitude von ACCs im Bereich von $0,1\text{ s}$ bis 1 s ein wesentlicher Bestandteil bei der Entwicklung einer neuen Auswertungsmethode war, wurde das zuvor experimentell bestimmte Hintergrundrauschen von 300 Hz bei der Simulation der Fluoreszenzfluktuationen von Antikörpermonomeren mit einem angenommenen Dimeranteil von $0,5\%$ bis 10% für eine Messdauer von 10 min ($n = 30$) berücksichtigt. In Abbildung 4.30 ist beispielhaft eine simulierte ACC für 1 nM Alexa-ABT-325 mit 7% Dimeranteil gezeigt.

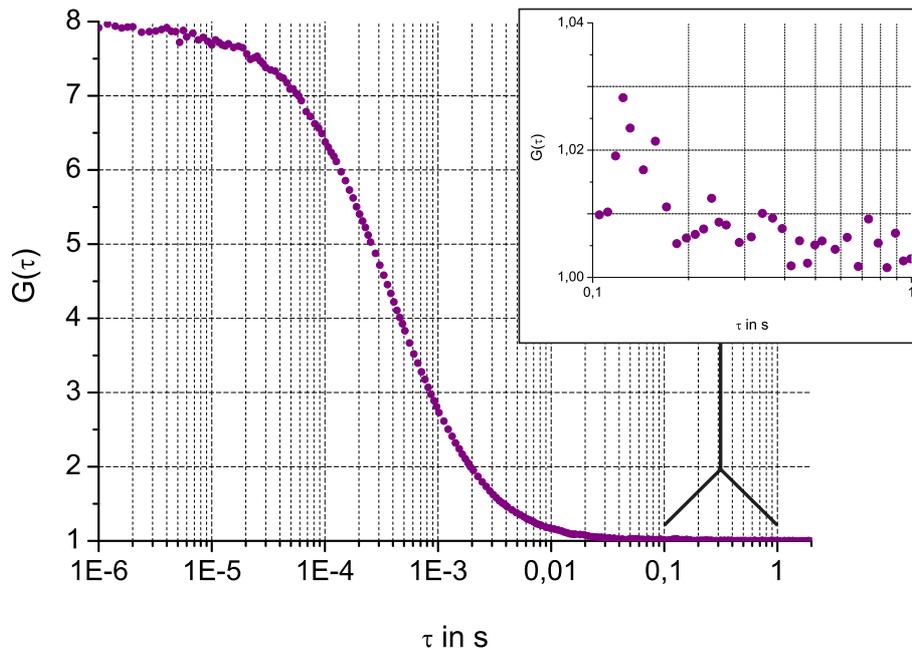


Abbildung 4.30: Simulierte Autokorrelationskurve von 1 nM Alexa-ABT-325 mit 7% Dimeranteil für eine Messdauer von 10 min.

Da in den Simulationen nur Alexa-ABT-325 Monomere und Dimere berücksichtigt wurden, erfolgte die Auswertung mit einer ACF für zwei Komponenten. Dabei wurde der erste Wendepunkt τ_{D_1} der ACF auf den Wert, der aus den Simulationen ermittelten Diffusionszeitkonstante von $345 \mu\text{s}$, des monomeren IgGs festgesetzt. Der zweite Wendepunkt τ_{D_2} wurde im Bereich von $0,1 \text{ s}$ bis 1 s auf 100 logarithmisch verteilte Werte fixiert. Die Fraktion $F(\tau_{D_2})$ nimmt mit steigendem Wert des zweiten Wendepunkt τ_{D_2} ab (Abbildung 4.31). So findet man für eine Simulation mit 2% Dimeranteil bei $\tau_{D_2} = 0,1 \text{ s}$ ein $F(\tau_{D_2})$ von $1,718 \times 10^{-4}$ und bei $\tau_{D_2} = 1 \text{ s}$ ein $F(\tau_{D_2})$ von $1,553 \times 10^{-4}$. Die Simulation einer Probe mit 10% Dimeranteil zeigt bei einem τ_{D_2} von $0,1 \text{ s}$ erwartungsgemäß einen höheren Wert für $F(\tau_{D_2})$ von $7,572 \times 10^{-3}$, der bei einem τ_{D_2} von 1 s auf einen Wert von $4,952 \times 10^{-3}$ abfällt.

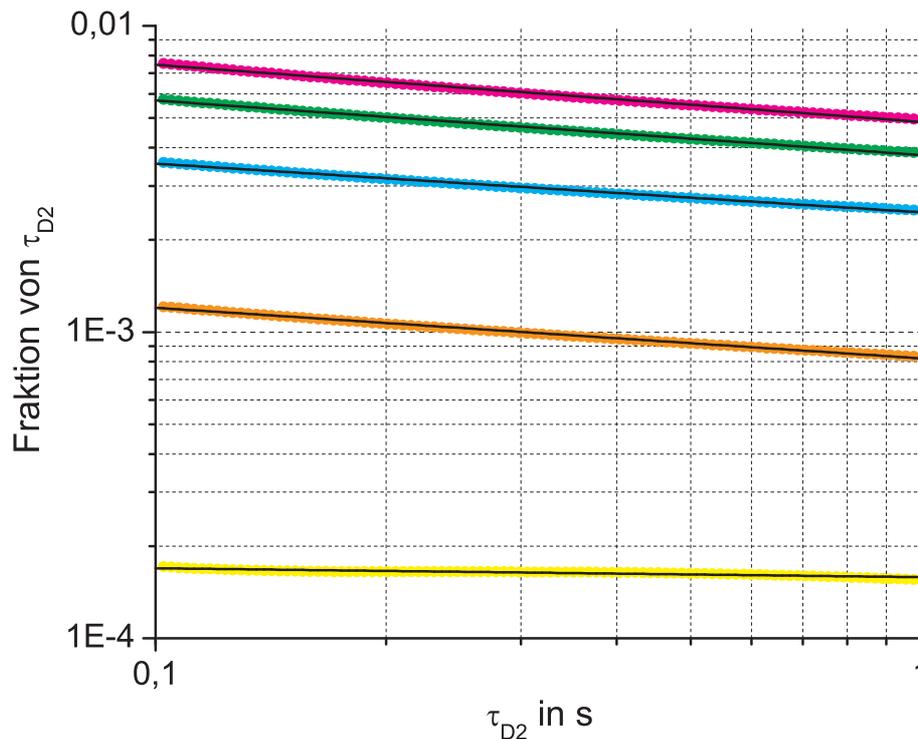


Abbildung 4.31: Fraktionen der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zweiten Wendepunktes τ_{D_2} einer simulierten Alexa-ABT-325 Probe mit 2% (gelb), 3% (orange), 5% (blau), 7% (grün) und 10% (magenta) Dimeranteil. Für die Simulationen wurde eine Stoffmengenkonzentration von 1 nM und eine Messdauer von 10 min eingesetzt.

Die Kurve $F(\tau_{D_2})$ über τ_{D_2} lässt sich mit der Potenzfunktion in Formel 4.1 beschreiben, wobei der Faktor c die Höhe der Kurve bei $\tau_{D_2} = 1\text{ s}$ darstellt und über den Exponenten γ die Anpassung an den nichtlinearen Zusammenhang zwischen τ_{D_2} und $F(\tau_{D_2})$ erfolgt. Hierfür wurde das MATLAB[®] Programm mit der „lsqcurvefit“ Fitfunktion und den „optimset“ Parametern 'Display', 'final', 'FunValCheck', 'off', 'MaxFunEvals', $1\text{e}6$, 'MaxIter', $1\text{e}6$, 'TolFun', $1\text{e}-10$, 'TolX', $1\text{e}-10$ verwendet.

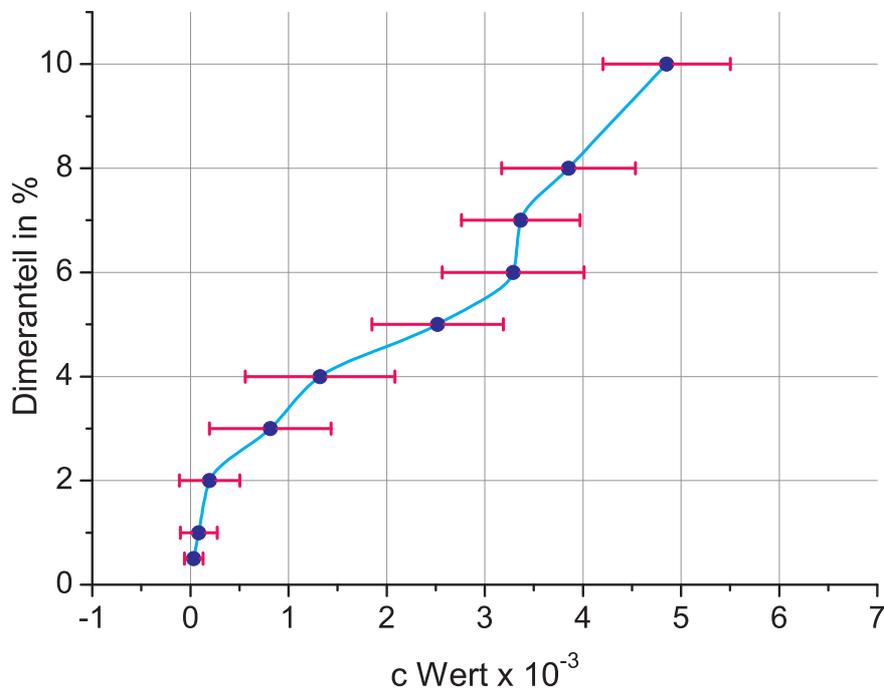
$$F(\tau_{D_2}) = c \cdot \tau_{D_2}^{-\gamma} \quad (4.1)$$

Offenkundig korreliert der c Wert mit einem entsprechenden Dimeranteil. Die c Werte der simulierten Monomer-Dimer-Gemische sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5: Dimeranteile und zugehörige c Werte aus simulierten Datensätzen (n = 30).

Dimeranteile	c Wert	Standardabweichung
0,5 %	$3,43 \times 10^{-5}$	$9,57 \times 10^{-5}$
1 %	$8,87 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-4}$
2 %	$1,96 \times 10^{-4}$	$3,07 \times 10^{-4}$
3 %	$8,14 \times 10^{-4}$	$6,19 \times 10^{-4}$
4 %	$1,32 \times 10^{-3}$	$7,62 \times 10^{-4}$
5 %	$2,52 \times 10^{-3}$	$6,70 \times 10^{-4}$
6 %	$3,29 \times 10^{-3}$	$7,22 \times 10^{-4}$
7 %	$3,37 \times 10^{-3}$	$6,05 \times 10^{-4}$
8 %	$3,85 \times 10^{-3}$	$6,82 \times 10^{-4}$
10 %	$4,85 \times 10^{-3}$	$6,49 \times 10^{-4}$

Trägt man die c Werte gegen den Dimeranteil auf und ergänzt zwischen den Werten aus den Simulationen jeweils zehn durch hermitesche Interpolation generierte Datenpunkte, so erhält man die in Abbildung 4.32 dargestellte Kalibrierkurve, die erwartungsgemäß keinen linearen Verlauf zeigt.

**Abbildung 4.32:** Kalibrierkurve aus simulierten Alexa-ABT-325 Datensätzen mit über den c Werten aufgetragenen unterschiedlichen Dimeranteilen (Messdauer = 10 min, n = 30 pro Punkt).

Vernachlässigt man das Hintergrundrauschen und simuliert die Datenpunkte im Bereich von 5 % bis 8 % Dimeranteil erneut, so kann hier ein linearer Zusammenhang zwischen Dimeranteil und c Wert festgestellt werden. Der Einfluss des Hintergrundrauschens lässt sich durch Vergleich dieser Datenpunkte mit der zuvor generierten Kalibrierkurve deutlich darstellen (Abbildung 4.33). Die der Abbildung 4.33 zugrunde liegenden c Werte sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die c Werte ohne den Einfluss des Hintergrundrauschens auch bei kleineren Dimerkonzentrationen dem theoretisch erwarteten linearen Verlauf folgen.

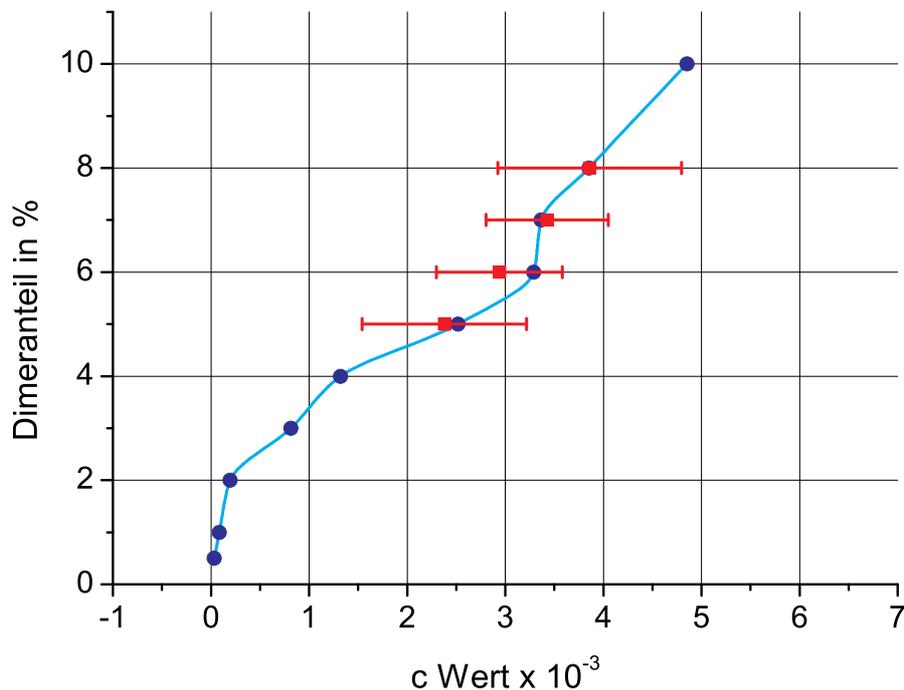


Abbildung 4.33: c Werte aus simulierten Alexa-ABT-325 Datensätzen ohne Hintergrundrauschen in Rot (Messdauer = 10 min, n = 10 pro Punkt) im Vergleich zur Kalibrierkurve (Messdauer = 10 min, n = 30 pro Punkt).

Tabelle 4.6: Dimeranteile und zugehörige c Werte aus simulierten Datensätzen ohne Hintergrundrauschen (n = 10).

Dimeranteile	c Wert	Standardabweichung
5 %	$2,38 \times 10^{-3}$	$8,39 \times 10^{-4}$
6 %	$2,94 \times 10^{-3}$	$6,42 \times 10^{-4}$
7 %	$3,43 \times 10^{-3}$	$6,22 \times 10^{-4}$
8 %	$3,86 \times 10^{-3}$	$9,36 \times 10^{-4}$

4.6.2 Kontrollversuche zum Nachweis von IgG Dimeren

Inwieweit die mittels simulierter Datensätze generierte Kalibrierkurve auch bei realen Messungen zu richtigen Ergebnissen führt, wurde anhand von Kontrollexperimenten untersucht. Dazu wurde eine fluoreszenzmikroskopische Messung von einem kommerziell erhältlichen Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG als Monomerprobe durchgeführt. Die Messungen ($n = 8$) dauerten 10min und die Anregungsleistung war $P_{514\text{nm}} = 1,44\ \mu\text{W}$. Die Auswertung der ACCs über den c Wert ergab bereits einen Dimeranteil von $4,63 \pm 0,42\%$.

Nach der Zugabe von 1% (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG wurde eine weitere fluoreszenzmikroskopische Messung durchgeführt ($n = 8$). Die normierten Autokorrelationskurven von Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG vor und nach Zugabe von 1% (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG wiesen einen sehr ähnlichen Verlauf auf (Abbildung 4.34).

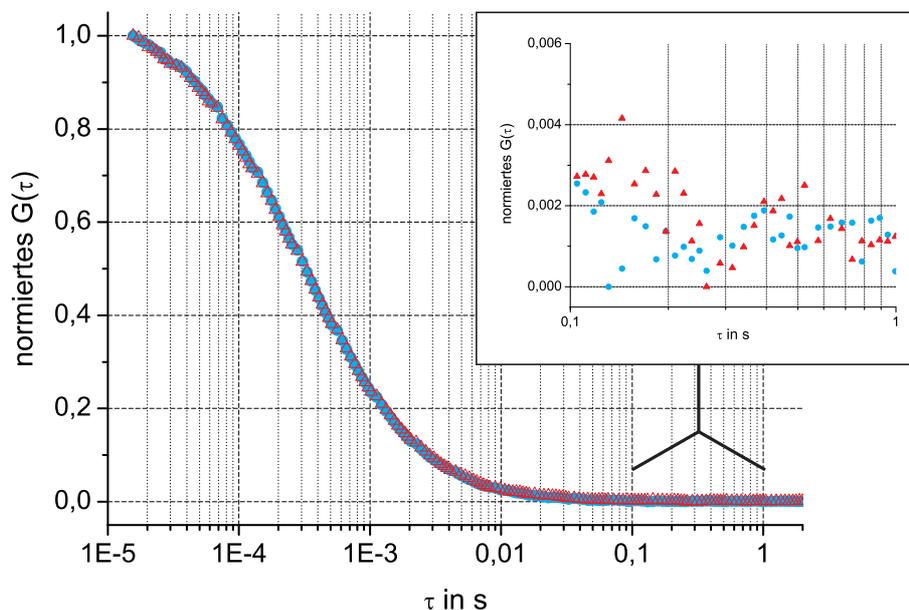


Abbildung 4.34: Normierte Autokorrelationskurven von $5 \times 10^{-4}\text{ g/L}$ Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG vor (cyan) und nach (rot) Zugabe von 1% (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG in PBS bei einer Messdauer von 10min .

Nach Bestimmung des c Wertes der mit 1% (Massenverhältnis) gespikten Probe wurde ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Anstieg des Dimeranteils von $4,63 \pm 0,42\%$ auf $5,32 \pm 0,66\%$

festgestellt, was einer Differenz von 0,69 % entspricht (Abbildung 4.35 und 4.36). Theoretisch wäre eine Zunahme des Dimeranteils von 0,97 % (Stoffmengenverhältnis) zu erwarten. Dies entspricht einem Massenverhältnis von 1 %. Das Stoffmengenverhältnis musste betrachtet werden, da der unmarkierte Antikörper ein geringeres Molekulargewicht hat. Nach Zugabe von 2 % (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG, was einem Stoffmengenverhältnis von 1,94 % entspricht, wurde in der Probe eine signifikante ($p \leq 0,05$) Zunahme im Dimeranteil von $4,63 \pm 0,42$ % auf $6,40 \pm 1,36$ % gefunden. Dies entspricht einer Differenz von 1,77 % (Abbildung 4.35 und 4.36). Bei der Zugabe von 3 % (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG zu Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG stieg der Dimeranteil signifikant ($p \leq 0,05$) von $5,41 \pm 1,52$ % auf $8,02 \pm 1,28$ %, was eine Differenz von 2,62 % ergibt (Abbildung 4.36). Die theoretische Zunahme des Dimeranteils lag bei 2,91 % (Stoffmengenverhältnis). Auch wenn die theoretisch zu erwartende Dimerbildung experimentell nicht vollständig wiedergefunden wurde, kann dennoch festgestellt werden, dass die neue Auswertungsmethode eine Möglichkeit eröffnet, Dimerisierungen von IgGs zu einem frühen Zeitpunkt zu erkennen.

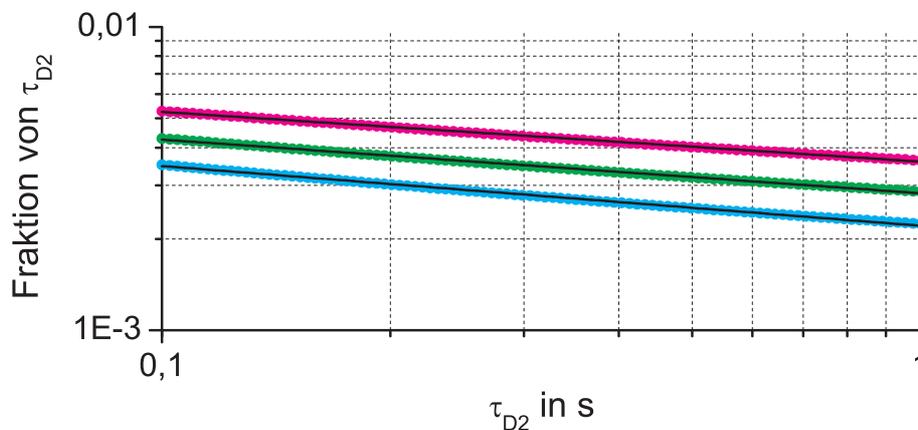


Abbildung 4.35: Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D2} von 5×10^{-4} g/L Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG vor (blau) und nach Zugabe von 1 % (grün) und 2 % (magenta) Hase-Anti-Ziege IgG. Die Messungen wurden in PBS mit einer Messdauer von 10 min durchgeführt.

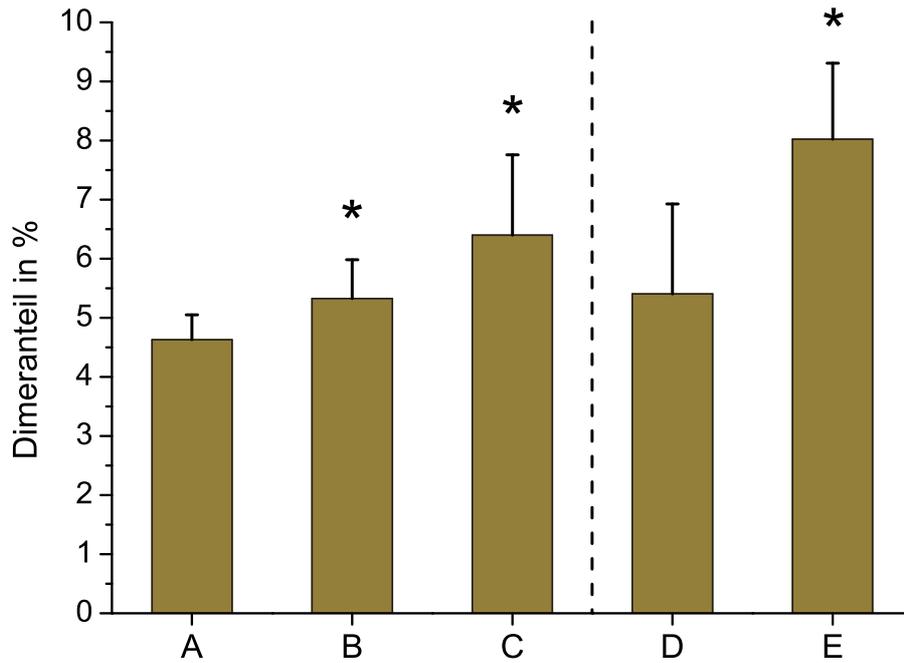


Abbildung 4.36: Dimeranteile von $5 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG vor (A und D) und nach Zugabe von 1 % (B), 2 % (C) und 3 % (E) Hase-Anti-Ziege IgG in PBS ($p \leq 0,05$). Die Messdauer betrug 10 min ($n = 8$).

4.6.3 Messergebnisse der eingelagerten Proben

Die Bildung von Dimeren wurde anhand einer realen Probe durch Lagerung von Alexa-ABT-325 und unter Verwendung der neuen Auswertungsmethode untersucht. Dafür wurden jeweils zwei Alexa-ABT-325 Proben in einer Konzentration von 2 g/L bei 4°C und 50°C für 1, 2, 4 und 7 Tage gelagert (siehe Kapitel 3.4.6). Die sich anschließende fluoreszenzmikroskopische Messung der gelagerten Probe erfolgte nach Verdünnung mit PBS auf eine Konzentration von 2 nM über 10 min ($n = 10$).

Außerdem wurden bei -80°C gelagerte Kontrollproben vermessen, die einen mittleren c Wert von 0,0020 und 0,0024 und einen mittleren Dimeranteil von $4,75 \pm 0,57\%$ zeigten. Nach Auswertung der Proben, die bei 4°C gelagert wurden, konnte nur zwischen Tag eins und sieben ein signifikanter Unterschied in den Fraktionen der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ mit gemittelten c Werten von 0,0020 und 0,0030 festgestellt werden (Abbildung 4.37 und 4.38). Entsprechend der c Werte betrug der gemittelte Dimeranteil nach

einem Tag $4,6 \pm 0,9\%$, der nach siebentägiger Lagerung um 1,5% auf durchschnittlich $6,1 \pm 1,8\%$ stieg (siehe Tabelle 4.7). Demgegenüber lagen die c Werte der Proben nach zwei- und viertägiger Lagerung nahezu auf dem Niveau der Probe, die für einen Tag eingelagert wurde (siehe Tabelle 4.7).

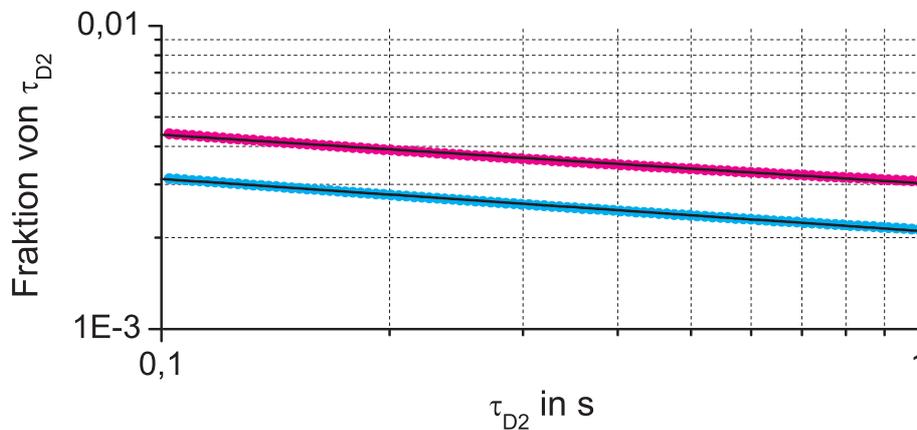


Abbildung 4.37: Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D_2} von $2nM$ Alexa-ABT-325 gelagert bei $4^\circ C$ nach einem (blau) und sieben (magenta) Tagen. Die Messdauer betrug 10min .

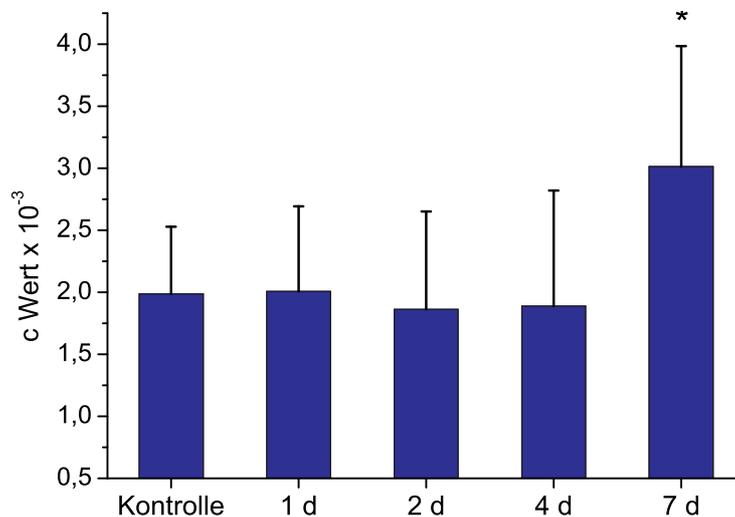


Abbildung 4.38: Gemittelte c Werte ($n = 10$) von $2nM$ Alexa-ABT-325 Kontrollproben und nach ein bis siebentägiger Lagerung bei $4^\circ C$ ($p \leq 0,05$).

Tabelle 4.7: c Werte und Dimeranteile von eingelagerten Alexa-ABT-325 Proben

Temperatur	Dauer	c Wert	Dimeranteil
-80 °C		$0,0020 \pm 0,0005$	$4,57 \pm 0,49\%$
		$0,0024 \pm 0,0006$	$4,94 \pm 0,61\%$
4 °C	1 d	$0,0017 \pm 0,0005$	$4,25 \pm 0,64\%$
		$0,0023 \pm 0,0007$	$4,95 \pm 0,98\%$
	2 d	$0,0013 \pm 0,0004$	$3,81 \pm 0,62\%$
		$0,0024 \pm 0,0007$	$4,95 \pm 0,61\%$
	4 d	$0,0015 \pm 0,0007$	$4,02 \pm 0,87\%$
		$0,0022 \pm 0,0010$	$5,13 \pm 1,69\%$
	7 d	$0,0029 \pm 0,0012$	$6,10 \pm 1,52\%$
		$0,0031 \pm 0,0007$	$6,17 \pm 2,19\%$
50 °C	1 d	$0,0233 \pm 0,0065$	n.a.
		$0,0315 \pm 0,0045$	n.a.
	2 d	$0,0543 \pm 0,0131$	n.a.
		$0,0594 \pm 0,0219$	n.a.
	4 d	$0,0654 \pm 0,0316$	n.a.
		$0,0780 \pm 0,0307$	n.a.
	7 d	$0,0777 \pm 0,0923$	n.a.
		$0,1029 \pm 0,1387$	n.a.

n.a.: nicht auswertbar

Die bei 50 °C gelagerten Alexa-ABT-325 Proben zeigten bereits nach einem Tag hohe Werte für die Fraktionen $F(\tau_{D_2})$ mit einem entsprechend hohen durchschnittlichen c Wert von $0,0274 \pm 0,0069$ (Abbildung 4.39 und Tabelle 4.7). Um die Aggregation von IgGs zu einem möglichst frühen Zeitpunkt erfassen und auswerten zu können, wurde eine Kalibrierkurve mit c Werten erstellt, die eine Dimerisierung von bis zu 10% abbildet. Da der c Wert der bei 50 °C eingelagerten Probe bereits nach einem Tag um den Faktor 5,6 mal größer war als die Obergrenze des kalibrierten Bereichs, konnte ein genauer Dimeranteil von größer 10% nicht ermittelt werden (siehe Tabelle 4.7). Vielmehr lässt sich anhand der

ACC erkennen, dass offenkundig größere Aggregate gebildet wurden, die sich als Stufen und Peaks oberhalb von 5 ms wiederfinden ließen (Abbildung 4.40).

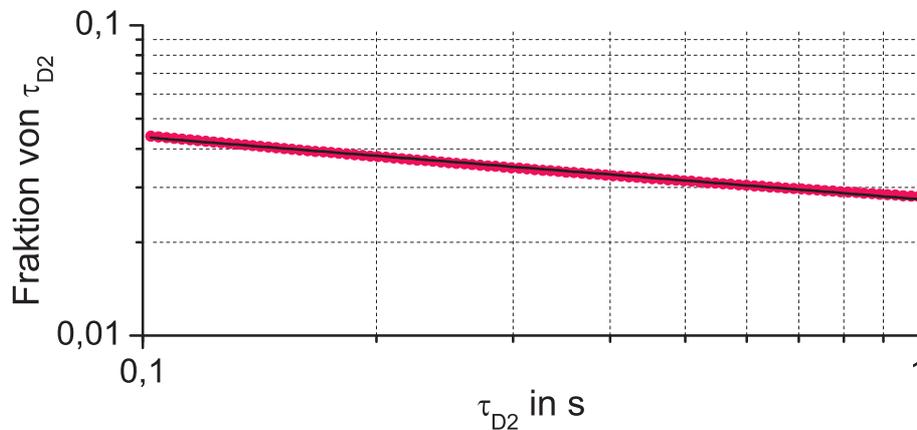


Abbildung 4.39: Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D2} einer Messung von einem Tag bei 50°C eingelagertem Alexa-ABT-325. Die vermessene Stoffkonzentration war 2 nM und die Messdauer 10 min .

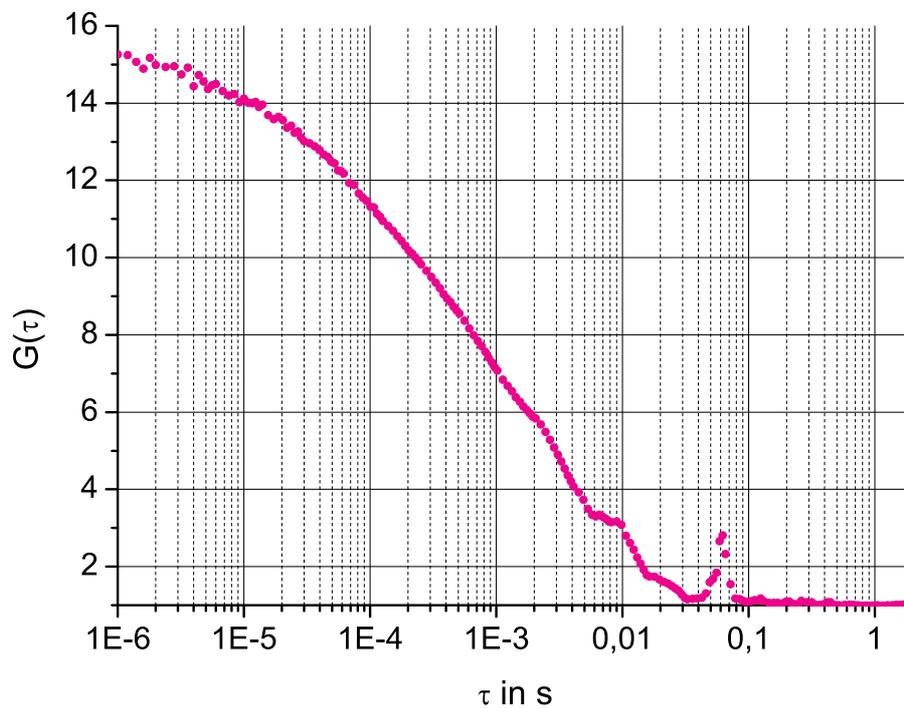


Abbildung 4.40: Autokorrelationskurve einer FCS Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 nach siebentägiger Lagerung bei 50°C . Die Messdauer betrug 10 min .

5 Diskussion

Für medikamentös eingesetzte Antikörper ist die Überwachung und Vermeidung von Aggregaten von großer Bedeutung. Die Antikörperaggregation kann nicht nur zu einem Aktivitätsverlust führen [37], sondern auch eine Immunantwort hervorrufen [27, 28]. Bei der Herstellung von Antikörpermedikamenten führen im Wesentlichen Effekte von Primärpackmitteln und Matrices zu Antikörperaggregaten [33]. Auch der Umgang mit Antikörperpräparaten spielt eine Rolle, wie z.B. ein häufiges Auftauen und Einfrieren oder die verwendete Lagertemperatur etc. [32, 37, 109]. Es ist daher notwendig, die Aggregatbildung in Antikörpermedikamenten frühstmöglich zu erkennen. Idealerweise sollten die hierfür eingesetzten analytischen Methoden bereits die Dimerbildung mit einem Anteil von weniger als 5% sicher nachweisen.

5.1 Methoden der Antikörperaggregatdetektion

5.1.1 Nicht-fluoreszenzbasierte Methoden

Nicht-fluoreszenzbasierte Methoden für die Antikörperaggregatdetektion haben den Nachteil, eine größere Probenmenge zu benötigen und möglicherweise nicht-kovalent verbundene Aggregate wieder aufzulösen. Nicht-fluoreszenzbasierte Methoden sind z.B. die asymmetrische Feld-Fluss-Fraktionierung, die verbesserte Form der Gel-Permeations-Chromatographie [110], die Größenausschlusschromatographie [26], die Polyacrylamid-Gelelektrophorese [40], die Ultrafiltration [111], die Ultrazentrifugation [112] und die Elektronenmikroskopie [113–118]. Bei der Ultrafiltration gibt es außerdem das Problem der Trennschärfe bei Aggregaten, die nicht globulär größer werden, und das Problem der Adsorption von IgGs und deren Aggregate an das Membranmaterial. Die Ultrazentrifugation eignet sich wegen der auftretenden Scherkräfte nur für stabile Aggregate, wie sie z.B. durch Erhitzen erzeugt werden [119]. Weniger stabile Aggregate, die durch längeres Lagern von IgGs bei 4°C entstehen, können nicht mittels Ultrazentrifugation detektiert werden [31]. Mit der Elektronenmikroskopie können bereits Antikörperdimere sichtbar

gemacht werden [113–118], wobei sogar inter- und intramolekulare Winkel und die Art der Aggregation von offen- oder geschlossenkettigen Formen erkannt werden. Die aufwändige Probenvorbereitung bei der Elektronenmikroskopie ist ein erheblicher Nachteil, der ein Screening mit hohem Probendurchsatz praktisch nicht erlaubt [116].

5.1.2 Fluoreszenzbasierte Methoden

Die quantitative Analyse von Antikörperproben mit kleinen Dimeranteilen können mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Methoden sind sehr sensitiv. Sie können auf Einzelmolekülniveau arbeiten und brauchen dementsprechend nur kleinste Probenmengen. Sie sind schnell und wenig invasiv, was auch eine Untersuchung von nicht-kovalent verbundenen Aggregaten ermöglicht. Allerdings müssen die Antikörper dazu fluoreszenzmarkiert werden. Ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff darf das Aggregationsverhalten der Antikörper nicht beeinflussen. Da Antikörper in der Regel in wässrigen Puffern untersucht werden, muss der Fluoreszenzfarbstoff hydrophil sein. Außerdem muss der Fluoreszenzfarbstoff über den Messzeitraum über eine hohe Fotostabilität verfügen, da ein Bleichen des Chromophors die Messergebnisse verfälscht, indem sinkende Partikelzahlen und kürzere Aufenthaltsdauern im Fokus vorgetäuscht werden. Weitere Eigenschaften, die über eine Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes entscheiden, sind der hydrodynamische Radius, die Fluoreszenzquantenausbeute sowie das Absorptions- und Emissionsspektrum.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Aggregation von ABT-325 musste das IgG fluoreszenzmarkiert werden. Dies geschah mit dem Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester über die Aminogruppen des Antikörpers. Dass Alexa Fluor[®] 532 markierte Antikörper noch funktionell waren, belegte das in dieser Arbeit verwendete Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG sowie die Nutzung von Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG als Zweitantikörper bei der Detektion des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 [120]. Neben der Fluoreszenzmarkierung über Aminogruppen mit einem Succinimidylester-

aktivierten Farbstoff können auch andere funktionelle Gruppen für eine Kopplung genutzt werden, wie z.B. Thiol-, Hydroxyl-, Aldehyd-, Keto- und Carbonsäuregruppen [121]. Eine Markierung über eine dieser Gruppen stellte für ABT-325 keine Alternative dar, da in keinem Fall ein Derivat mit exakt einem Farbstoffmolekül zu erwarten war, was eine einfachere Helligkeitsverteilung bei den fluoreszenzmikroskopischen Messungen und damit eine bessere Auswertbarkeit der Daten zur Folge hätte.

Nach der Markierung musste das freie Alexa Fluor[®] 532 über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule vom Alexa-ABT-325 abgetrennt werden. Freies Alexa Fluor[®] 532 würde bei Messungen der Diffusionszeitkonstanten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zu einem Wert führen, der weder von Alexa-ABT-325 noch seinen Aggregaten stammt und für die Auswertung ein aufwändigeres Dreikomponenten-Modell erfordert. Bei Messungen der Fluoreszenzhelligkeiten würde freies Alexa Fluor[®] 532 zu Überlagerungen mit Alexa-ABT-325 mit gleicher Fluoreszenzhelligkeit führen. Die Reinheit des chromatographisch isolierten Alexa-ABT-325 wurde mittels FCS mit $99,7 \pm 0,9\%$ bestimmt.

Die Identität des fluoreszenzmarkierten IgGs wurde mittels MALDI-TOF MS Analyse bestätigt. Für Alexa-ABT-325 wurde ein Massenpeak $[M^+]$ bei $m/z = 151.853$ gefunden. Demgegenüber lag der Massenpeak $[M^+]$ für ABT-325 bei $m/z = 148.976$. Über das Molekulargewicht von Alexa Fluor[®] 532 (609 Da) konnte die Labeffizienz mit $\kappa = 4,7$ bestimmt werden.

Für die Messung des Diffusionskoeffizienten von Antikörperdimeren wurde ABT-325 bzw. Alexa-ABT-325 mit Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) kovalent verbunden und jeweils anschließend über eine Superdex[™] 200 PC 3.2/30 Säule abgetrennt. BS³ wurde z.B. zur Herstellung von kovalent quervernetzten Dimeren der P Domänen des Norovirus Capsid-Proteins benutzt, um als Kontrollproben in SDS Gelen zu dienen [122]. Die mittels MALDI-TOF MS Analyse untersuchte Identität der ABT-325-BS³ Dimere zeigte einen Massenpeak $[M^+]$ von $m/z = 299.076$. Die Alexa-ABT-325-BS³ Dimere zeigten dagegen einen Massenpeak $[M^+]$ von $m/z = 309.752$. Aus der Differenz von 6046 zwischen

$[M^+_{\text{Alexa-ABT-325-BS}^3}]$ und $2 \times [M^+_{\text{Alexa-ABT-325}}]$ lässt sich eine Zahl von 38,8 BS^3 Linkern ohne Sulfosuccinimidylabgangsgruppen errechnen. Offenkundig wurde von den zur Verfügung stehenden Aminogruppen für die Markierung von ABT-325 mit Alexa Fluor[®] 532 Succinimidylester nur wenige funktionelle Gruppen umgesetzt. Daraus ergibt sich eine Labelverteilung nach Poisson, was die Betrachtung der Labelverteilung von ABT-325 Monomer und Dimer in dieser Arbeit ermöglichte (Abbildung 4.6). Im MS Spektrum von ABT-325- BS^3 wurde neben einem $[M^{2+}]$ Massenpeak mit $m/z = 151.458$ auch ein $[2M^{3+}]$ Massenpeak mit $m/z = 227.983$ identifiziert. Auch für das Alexa-ABT-325- BS^3 wurden entsprechende Massenpeaks für $[M^{2+}]$ mit $m/z = 154.516$ und $[2M^{3+}]$ mit $m/z = 232.173$ gefunden. Eine analoge Interpretation von MS Spektren für monoklonale IgGs wurde bereits publiziert [123, 124].

Die Labeffizienz für Alexa-ABT-325 wurde mittels Absorptionsmessungen mit $\kappa = 4,6$ bestimmt, was der über massenspektrometrische Daten erhaltene Wert von $\kappa = 4,7$ bestätigt. Der Anteil an nicht markiertem ABT-325 war $P_{\kappa}(0) < 1\%$. Das in dieser Arbeit verwendete Alexa-ABT-325 war also nahezu vollständig fluoreszenzmarkiert. Dies ermöglicht die Erkennung von allen Antikörpern und deren Aggregaten bei den fluoreszenzmikroskopischen Messungen. Die Mehrfachmarkierung der meisten Antikörper erschwert allerdings die Unterscheidung von Antikörpermonomeren und -dimeren durch Überlappung ihrer Fluoreszenzhelligkeit.

Da in dieser Arbeit mehrstündige Fluoreszenzmessungen geplant waren, musste sichergestellt werden, dass Alexa-ABT-325 während der Messdauer nicht merklich bleichte. Ein Vergleich der Absorptions- und Emissionsspektren zeigte, dass sich Alexa-ABT-325 und Alexa Fluor[®] 532 in ihrem Fluoreszenzverhalten nur unwesentlich unterscheiden. Die Fotostabilität des fluoreszenzmarkierten Antikörpers kann daher durch Untersuchungen mit Farbstoff Alexa Fluor[®] 532 beschrieben werden. Nach Bestrahlung des Farbstoffes mit einem Festkörperlaser der Wellenlänge 532 nm bei einer Leistung von $40,3\text{ mW}$ über 70 min wurde ein Fotobleichen von $2,5\%$ festgestellt. Da für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen ein Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 514 nm bei einer

Leistung von $1,44\ \mu W$ verwendet wurde, lässt sich das Fotobleichen unter diesen Bedingungen durch Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten von Alexa Fluor[®] 532 bei 514 nm und 532 nm abschätzen. Im Ergebnis wurde eine geringe Abnahme der Absorption von $0,3\%$ in $14,9\text{ h}$, umgerechnet für die benutzte Laserleistung von $P_{514\text{ nm}} = 1,44\ \mu W$, festgestellt. Ein nennenswerter Einfluss auf lange fluoreszenzmikroskopische Messungen durch ein Fotobleichen des Farbstoffanteils konnte daher ausgeschlossen werden.

5.1.2.1 FCS

Die FCS ist eine etablierte fluoreszenzmikroskopische Methode, die u.a. auch die Aggregation von fluoreszierenden Partikeln detektieren kann, soweit sich die Diffusionskoeffizienten der Aggregate hinreichend, das heißt um mindestens den Faktor 1,6, unterscheiden. Daraus ergibt sich für die entsprechenden Molekulargewichte ein Unterschied um den Faktor von mindestens vier [107]. Da die Masse eines Dimers nur doppelt so groß ist wie die des entsprechenden Monomers, kann die FCS unter Verwendung einer klassischen Autokorrelationsfunktion (ACF) nicht zum Nachweis von Dimeren bei gleichzeitig überwiegend vorkommenden Monomeren eingesetzt werden.

Für die Entwicklung einer neuen Auswertungsmethode, die eine Unterscheidung von Monomer und Dimer ermöglicht, ist die Aufzeichnung von TTTR-Daten mit optimalen Parametern Voraussetzung, nicht zuletzt um beispielsweise das Vorkommen eines geringen Anteils einer Teilchenspezies vor dem Hintergrund zu detektieren. Daher wurde über einen Graufilter ($OD=2$) eine Laserleistung von $1,44\ \mu W$ eingestellt, um einerseits Sättigungseffekte zu vermeiden (Abbildung 4.17) und andererseits bei größtmöglicher Anreizleistung eine maximale Helligkeit der einzelnen Partikel zu erzielen, was wiederum das Photonenrauschen minimiert [125]. Bei einer Sättigung des Farbstoffes steigt der Tripletanteil, was eine deformierte Autokorrelationskurve (ACC) zur Folge hat [104, 126]. Eine Sättigung des Detektors führt, durch eine Verzerrung des gaußförmigen Detektionsvolumens, zu scheinbar langsameren Diffusionszeiten [66, 127]. Das Partikelrauschen

wurde durch eine lange Messzeit von deutlich mehr als tausendfacher Dauer der Diffusionszeitkonstante minimiert [125, 128]. Das Schrotrauschen des Detektors wurde mit 300 Hz bestimmt, stellte aber einen zu vernachlässigenden Anteil von etwa 1 % für die TTTR-Daten dar, die überwiegend mit einer Signalstärke von circa 30kHz aufgezeichnet wurden.

Für Alexa-ABT-325 wurde mittels FCS ein Diffusionskoeffizient von $3,20 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt. Vergleichbare Diffusionskoeffizienten für humane IgGs mit $3,89 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ [129] und $3,7\text{-}3,96 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ [130] wurden mittels „Photon Correlation Spectroscopy“ und Elektrophorese gefunden. Der Diffusionskoeffizient für das Alexa-ABT-325-BS³ Dimer wurde mit $2,30 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt. Ein sehr ähnlicher Wert von $2,81 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ wurde bereits für ein durch Lagerung entstandenes humanes IgG Dimer publiziert [129].

5.1.2.2 PCH

Bei einer PCH Analyse können Monomere und Aggregate anhand ihrer molekularen Helligkeiten diskriminiert werden, sofern sich die Werte um einen Faktor von mindestens zwei unterscheiden [77, 81, 84, 131]. Dies konnte in dieser Arbeit durch Simulation von TTTR-Daten eines Monomer-Dimer-Antikörpergemisches im Mengenverhältnis 1:1 und einer doppelten Helligkeit des Dimers im Vergleich zum Monomer und anschließender PCH Analyse bestätigt werden. Das entsprechende Photonen-zählhistogramm konnte mit einem Zweikomponenten-Modell und einer Monomer-Dimer-Verteilung von 47,4% zu 52,6% gut und im Ergebnis richtig beschrieben werden. Die durchschnittliche Anzahl der Fluoreszenzlabel von Alexa-ABT-325 betrug $\kappa = 4,6$ und lag poissonverteilt vor. Wie schon für ein Ziege-Anti-Maus IgG Alexa Fluor[®] 532 Konjugat mit verschiedenen Label-effizienzen gezeigt wurde, kann auch für Alexa-ABT-325 nicht von einem linearen Zusammenhang zwischen Anzahl der Labeln und Fluoreszenzemission ausgegangen werden. Offenkundig wird eine maximale Fluoreszenzemission bei circa 3 Farbstoffmolekülen pro IgG detektiert [97]. Eine größere Anzahl von Farbstoffmolekülen führt vermutlich durch Quencheffekte zu einer Abnahme in der Fluoreszenzemission. Die Hoffnung, dass

sich aus diesem Umstand für Alexa-ABT-325 nur eine Komponente mit mittlerer molekularer Helligkeit ergeben könnte, die sich dann vom entsprechenden Dimer mittels PCH unterscheiden ließe, wurde nicht erfüllt. Die Verteilung der Fluoreszenzmissionen für Alexa-ABT-325 konnte nicht mit einem Einkomponenten-Modell, sondern nur mit einem Zweikomponenten-Modell bzw. darüber hinaus mit mehreren Komponenten hinreichend beschrieben werden. Für ein Monomer-Dimer-Gemisch von Alexa-ABT-325 ist daher eine größere Anzahl von Komponenten zu erwarten, deren eindeutige Zuordnung aufgrund sich überschneidender Helligkeiten nicht möglich ist und eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen Monomer und Dimer deshalb nicht zulässt.

5.1.2.3 Einzelereigniserkennung

Die Einzelereigniserkennung kann neben der Verteilung der Ereignislängen und Fluoreszenzmissionen wie in FCS und PCH auch die Ereignishelligkeiten untersuchen. Unter der Ereignishelligkeit wird der Quotient aus den Zählimpulsen pro Ereignis und der korrespondierenden Ereignislänge verstanden. Bei der Untersuchung der Verteilung der Ereignislängen und Fluoreszenzmissionen sind die FCS und PCH der Einzelereigniserkennung überlegen, da sie einen größeren Konzentrationsbereich abdecken und auch Messungen mit mehr als einem Teilchen im Fokus auswerten können. Mehrere Partikel im Fokus haben zudem den Vorteil, das Partikelrauschen zu minimieren und daher kürzere Messzeiten im FCS und PCH Experiment zu ermöglichen. Außerdem haben die FCS und PCH nicht das Problem, einzelne Ereignisse vom Hintergrundrauschen trennen zu müssen. Bei der Einzelereigniserkennung lag das Hauptaugenmerk auf der Detektion von Ereignishelligkeiten, was voraussetzte, dass nur Zählimpulse von einem Ereignis pro Bin erfasst wurden. Mehrere Partikel pro Bin verhinderten daher die Bestimmung von Ereignishelligkeiten und mussten im Experiment durch entsprechende Verdünnung der Probe vermieden werden. Unter Einhaltung dieser Bedingungen können mit der Einzelereigniserkennung auch größere Aggregate erfasst werden, die im FCS Experiment zu komplexen ACCs führen und mit ACFs nicht mehr ausgewertet werden können. In der PCH kommt

ein vergleichbarer Effekt zum Tragen. Ein stetiger Abfall in der Verteilung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Bin mit steigenden Zählimpulsen vorkommt, wird durch die Anwesenheit großer und heller Aggregate aufgehoben, was eine Auswertung meist unmöglich macht. Die Einzelereigniserkennung ist ideal für die Auswertung von Daten aus Messungen mit großen Aggregaten, die weder mit FCS noch PCH ausgewertet werden können. Dabei gibt es für die Einzelereigniserkennung keine Obergrenze für die Aggregatgröße und Helligkeit, mit der die Auswertung durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Ereignisse mit zwei Schwellenwerten vom Hintergrundrauschen getrennt. Allerdings war die Wahl der Schwellenwerte bei den Alexa-ABT-325 Messungen problematisch, da die Verteilung der Label und die sich daraus ergebende Verteilung der stochastischen Fluoreszenzemissionen keine sichere Parametrisierung zur Unterscheidung von Monomeren und Dimeren zuließen. Bei einem zu hohen oberen Schwellenwert wurden Ereignisse mit einer zu niedrigen Ereignishelligkeit nicht erkannt, sondern dem Hintergrundrauschen zugerechnet. Bei einem zu hohen unteren Schwellenwert wurden Ereignisse fälschlicherweise als mehrere Teilereignisse erfasst und ausgewertet. Die beschriebenen experimentellen Schwierigkeiten verhinderten letztlich eine zweifelsfreie Unterscheidung von Alexa-ABT-325 Monomeren und Dimeren und somit auch deren quantitative Bestimmung.

5.1.2.4 Weitere fluoreszenzbasierte Methoden

Neben den in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Techniken gibt es noch weitere Methoden, die unterschiedliche Komponenten in einer Probe differenzieren können. Eine Unterscheidung von Monomeren und Dimeren anhand zweier unterschiedlich farbig markierter Proben ist z.B. mit der Kreuzkorrelationspektroskopie (FCCS) [132, 133], mit dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [134] oder mit der Zweifarben-PCH [135] möglich. Die 2D FIDA ermöglicht nicht nur die Unterscheidung von Antikörpern, die mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Antigenen interagieren, sondern kann auch Antikörper mit einem oder zwei gebundenen fluoreszenten Antigenen

diskriminieren. Zwei Teilchenspezies mit Fluoreszenzfarbstoffen, die ein unterschiedliches Abklingverhalten haben, kann man mit der zeitaufgelösten FCS unterscheiden [136]. Die FCA (Fluorescence Cumulant Analysis) ist eine Methode, die wie die PCH Teilchenspezies mit verschiedenen Helligkeiten, wie z.B. Coumarin und Rhodamin, unterscheiden kann [131].

Die PAID (Photon Arrival-Time Interval Distribution) ist eine Auswertungsmethode für fluoreszenzmikroskopische Daten, die nicht nur zwei verschiedenfarbige Teilchenarten, sondern auch Teilchen mit ein oder zwei Fluoreszenzlabeln unterscheiden kann, wie es für Cy3 bzw. Cy5 markierte DNS Proben gezeigt wurde. Sie basiert auf der Beobachtung der Zeitintervalle zwischen den Photonen anstatt auf dem Zählen von Photonen in Bins [137].

Ein Dimernachweis mittels FCS kann über die Beobachtung der Fluoreszenzlöschung, z.B. bei der Dimerisierung des Oxazin Fluorophores MR121, geschehen [138]. Eine weitere Methode für den Dimernachweis mittels FCS ist die Beobachtung der Verdopplung der Teilchenzahl bei der Dissoziation von Dimeren, wie dies für PLA₂ (Phospholipase A₂) Dimere aus *Crotalus atrox* Schlangengift gezeigt wurde [139].

Ogleich eine Vielzahl fluoreszenzmikroskopischer Techniken etabliert sind, ist es bislang nicht möglich, die Bildung fluoreszierender Dimere zu einem frühen Zeitpunkt von kleiner 5% quantitativ zu erfassen. Um dieses Ziel zu erreichen, war die Entwicklung einer neuen fluoreszenzbasierten Methode notwendig und wurde mit der vorliegenden Arbeit wie folgt realisiert.

5.2 Eine neue Methode für die ACC Auswertung

Bei der neuen Auswertungsmethode für Fluoreszenzfluktuationen wurden die TTTR-Daten autokorreliert und der hintere Bereich von 0,1 s bis 1 s der ACC untersucht. Dazu wurde die ACC mit einer Zweikomponenten ACF gefittet, wobei der erste Wendepunkt τ_{D_1} mit der Diffusionszeitkonstante des Alexa-ABT-325 Monomers konstant gehalten wurde. Der zweite Wendepunkt τ_{D_2} wurde in diesem Bereich auf 100 logarithmisch verteilte Werte fixiert. Die sich ergebenden Anteile der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ wurden gegen τ_{D_2} aufgetragen und mit einer Potenzfunktion (Formel 4.1) beschrieben, deren c Wert proportional zum Dimeranteil ist. Betrachtet man die Abweichungen dieser Anpassung an die gemessenen Werte, so sind diese vernachlässigbar klein im Vergleich zu den Standardabweichungen der Fluoreszenzfluktuationmessungen. Der Zusammenhang zwischen c Werten und Dimeranteil wurde mit simulierten Datensätzen im Bereich von 0,5% bis 10% untersucht. Die grafische Darstellung ergab eine Kalibrierkurve, deren Form sich nicht durch eine einfache, z.B. lineare oder exponentielle, Funktion beschreiben ließ. Im Bereich der c Werte für Dimeranteile $\leq 6\%$ war der Einfluss des Hintergrundrauschens so groß, dass sich die Krümmung der $F(\tau_{D_2})$ Kurve nur schlecht mit einer Potenzfunktion beschreiben lässt und sich nicht, wie theoretisch erwartet, linear mit der Zunahme des Dimeranteils verändert. $F(\tau_{D_2})$ Kurven mit höheren Dimeranteilen entsprechen der Krümmung der Potenzfunktion und verhalten sich, bei einer Zunahme des Dimeranteils, wie theoretisch erwartet, d.h. ein linearer Anstieg des Anteils der zweiten Komponente korreliert linear mit dem Anstieg des c Wertes. In wie weit die Kalibrierkurve den Zusammenhang zwischen c Werten und Dimeranteil richtig beschreibt, wurde anhand realer Proben überprüft, bei denen gezielt unterschiedliche Anteile von Antikörperdimeren erzeugt wurden. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches fluoreszenzmarkiertes IgG (Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG) eingesetzt, welches in Kontrollmessungen und nach Auswertung über den c Wert bereits einen Dimeranteil von $4,63 \pm 0,42\%$ zeigte. Da ein vergleichbarer Dimeranteil von Hawe et al. mittels Feld-Fluss-Fraktionierung in nicht gestressten monoklonalen IgGs gefunden wurde, kann angenommen werden, dass

sich trotz vorsichtiger Lagerung eine Dimerisierung von IgGs nicht vermeiden lässt [40]. Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen eines ungelabelten IgGs (Hase-Anti-Ziege IgG), das gegen den Fc-Teil des fluoreszenzmarkierten IgGs gerichtet war, wurden zusätzlich 0,97%, 1,94% und 2,91% Dimere (Stoffmengenverhältnis) gezielt erzeugt. Die Auswertung der entsprechenden ACCs ergaben zusätzlich erzeugte Dimeranteile von 0,69%, 1,77% und 2,62%. Die Abweichung zwischen theoretischem und gemessenem Dimeranteil betrug 0,28%, 0,17% bzw. 0,29% und lag innerhalb der Standardabweichung des Gesamtdimeranteils der jeweils gespikten Proben. Eine mögliche Ursache für die zu niedrige Wiederfindung im gespikten Dimeranteil könnte die nicht vollständige Bindung des Hase-Anti-Ziege IgGs an das Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor[®] 532 IgG sein. Obgleich nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die durch Simulation generierte Kalibrierkurve ebenfalls zu Abweichungen in der Bestimmung von Dimeren in realen Proben führte, zeigten die durchgeführten Kontrollexperimente, dass mit der neu entwickelten Auswertungsmethode eine Dimerisierung von IgGs zu einem frühen Zeitpunkt erkannt werden konnte. Für die Bestimmung des Dimeranteils in realen Proben wurde daher die Kalibrierkurve genutzt.

Bei der Untersuchung der Dimeranteile nach Lagerung wurde bei dem bei 4°C gelagertem Alexa-ABT-325 für die ersten drei Messtage 4,5% Dimeranteil gefunden und erst am Tag sieben ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Anstieg auf 6,2% festgestellt, wobei die bei -80°C gelagerten Kontrollproben einen Dimeranteil von $4,75 \pm 0,57\%$ hatten.

Die Auswertung der bei 50°C gelagerten Proben führte bereits nach Tag eins zu c Werten, die weit außerhalb des kalibrierten Bereiches lagen. Große und zugleich breite Peaks in den Fluoreszenzintensitätsspuren von FCS Experimenten haben Aggregate erkennen lassen, die deutlich grösser als Dimere waren. Ähnliches wurde von Mahler et al. für bei 40°C gelagertes IgG diskutiert [109]. Für IgGs, die bei höheren Temperaturen gelagert wurden, stellte sich daher nicht die Frage einer Dimerisierung, da unter derartigen Bedingungen die sofortige Bildung großer Aggregate zu erwarten war.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Auffassung vertreten, dass eine eindeutige

Unterscheidung von Antikörpermonomeren und -dimeren im Gemisch mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden nicht möglich sei. Als Gründe wurden insbesondere zu geringe Unterschiede im Diffusionsverhalten und in der Helligkeit angeführt. Die hier neu beschriebene Auswertungsmethode basiert auf der Analyse von ACCs und eröffnet die Möglichkeit, eine Dimerisierung von IgGs zu einem frühen Zeitpunkt zweifelsfrei zu detektieren. Unter der Voraussetzung, dass die Fluoreszenzmarkierung das Aggregationsverhalten von IgGs nicht beeinflusst, kann nunmehr mit dem neu entwickeltem Verfahren die Dimerisierung von pharmazeutisch eingesetzten IgG Präparaten und somit deren Stabilität bzw. Aktivität zeitabhängig untersucht werden. Mögliche zukünftige Optimierungen, die die Empfindlichkeit der neuen Auswertungsmethode eventuell weiter erhöhen können, sind in Kapitel 5.3 beschrieben.

5.3 Ausblick

Mit der neuen Auswertungsmethode können anhand von Autokorrelationskurven IgG Dimere frühzeitig und in einem ungünstigen Verhältnis von kleiner 5% neben IgG Monomeren quantitativ erfasst werden, allerdings sind noch Optimierungen vorstellbar. Ein fluoreszenzmikroskopisches Setup mit geringerem Hintergrundrauschen ($< 300\text{Hz}$) ermöglicht die Verwendung einer optimierten Kalibrierkurve, da die Krümmung der $F(\tau_{D_2})$ Kurven auch noch bei Dimeranteilen von $\leq 6\%$ mit der Potenzfunktion beschrieben werden kann. Die Intensitätsverteilung im Fokus wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen wie auch bei den meisten ACFs der FCS als doppelt gaußförmig angenommen [102]. Eine dem realen Fokus besser angenäherte Form der Intensitätsverteilung in den Simulationen könnte eventuell zu einer besseren Kalibrierkurve führen [140]. Auch könnte man versuchen, die zweiten Anteile $F(\tau_{D_2})$ über τ_{D_2} mit einer anderen Funktion zu beschreiben, die sich besser an die gemessenen Daten annähern lässt.

Die Verwendung eines Multiphotonenmikroskops führt zu einem besser definierten Fokus, da die Anregung der Fluorophore nur im Fokus stattfindet und dieser schärfere Konturen als der Fokus der Einphotonenmikroskopie aufweist. Für die in dieser Arbeit neu entwickelte Auswertungsmethode, die sich insbesondere auf Ereignisse zwischen $0,1\text{s}$ und 1s in der ACC stützt, könnte der Einsatz eines Multiphotonenmikroskops mit geringerem Hintergrundsignal zu deutlich weniger verrauschten ACCs führen, was die Qualität der Korrelation zwischen c Wert und Dimeranteil verbessern sollte.

Die vorliegenden Befunde lassen vermuten, dass nicht nur die Dimerisierung von Antikörpern, sondern auch von anderen Molekülen in Lösung erfasst werden kann. Ob die neue Auswertungsmethode für ACCs sich auch auf komplexere fluoreszente Systeme mit Monomer- und Dimerkomponenten wie z.B. die Dimerisierung von Rezeptoren in der Plasmamembran übertragen lässt, bleibt abzuwarten.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der verschiedenen humanen Immunglobulin- klassen mit der letzten Domäne des Fc-Teiles (blau), den Disulfidbrücken (orange) und den J-Ketten (lila), in Anlehnung an [4].	2
1.2	Schematische Darstellung eines IgG1 mit Fc-, Fab- und F(ab') ₂ -Frag- menten und den Domänen V _H (blau), V _L (grün), C _L (braun) und C _H (schwarz), in Anlehnung an [9].	4
1.3	Röntgenkristallstruktur des Fab-Fragments von ABT-325. Die Abbildung wurde mit dem RCSB PDB Protein Workshop 3.9 und den Daten mit der PDB Kennnummer 2VXV erstellt.	10
1.4	Schema der Energieniveaus bei Fluoreszenz und Phosphoreszenz nach Jablonski. Gezeigt sind Singulett- (S ₀ bis S ₂) und Triplettzustand (T ₁) mit verschiedenen Schwingungsniveaus (v = 0 bis 3) in Anlehnung an [44].	12
1.5	Triplettlöschung eines Farbstoffes unter Entstehung von ¹ O ₂ nach [48]. . .	13
1.6	Besetzungsschema der Elektronenorbitale für ³ O ₂ (A) und ¹ O ₂ (B) nach der Molekülorbitaltheorie, modifiziert nach [49].	14
1.7	Strukturformel des Alexa Fluor [®] 532 Succinimidylesters nach [53]. . . .	15
1.8	Fokus eines konfokalen Mikroskops mit einem fluoreszierenden Teilchen.	16

1.9	Theoretische Geschwindigkeitsverteilung von monomeren (blau) und dimeren (rot) IgGs. in Grau ist der Bereich gezeigt, in dem sich die Geschwindigkeitsverteilungen der monomeren und dimeren IgGs überschneiden.	17
1.10	Schema des fluoreszenzmikroskopischen Setups in Anlehnung an [72] . .	18
1.11	Beispiel von Signalen, die nach ihrer Detektionszeit in Bins eingeteilt werden, was zu einer Liste von Signalen pro Bin führt ($\hat{=}$ Intensitätsspur). 24	24
1.12	Beispielhafter Abschnitt einer Intensitätsspur (blau), aus einer Messung von bei -80°C gelagertem Alexa-ABT-325. Der untere (2 Signale pro Bin) und obere Schwellenwert (4 Signale pro Bin) sind grün eingezeichnet. In rot sind einzelne Ereignisse dargestellt.	25
3.1	Schaltplan des Pulsformers mit dem Signaleingang bei RI und den Signalausgängen bei RA.	32
3.2	Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung eines IgGs über einen Lysinrest mit dem Alexa Fluor 532 [®] Succinimidylester	36
3.3	Strukturformel von Tetramethylrhodamin	41
4.1	Auftrennung des ABT-325 Markierungsansatzes in der Einlagerungsmatrix über eine Superdex [™] 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Fließmittel. Die Detektion erfolgte über die Absorption bei $\lambda = 280\text{nm}$ (blau) und 532nm (rot).	51
4.2	Normiertes Massenspektrum eines Fluoreszenzmarkierungsansatzes von ABT-325 in der Einlagerungsmatrix mit den Massenpeaks $[\text{M}^+]$ von Alexa-Histidin ($m/z = 765$) und Alexa-Methionin ($m/z = 759$).	52
4.3	Strukturformeln von Alexa-Histidin (R_1) und Alexa-Methionin (R_2). . . .	52
4.4	Isolierung von Alexa-ABT-325 über eine Superdex [™] 200 PC 3.2/30 Säule und mit PBS als Fließmittel. Detektion bei $\lambda = 280\text{nm}$ (blau) und 514nm (rot).	53

4.5	FCS-Messung von 1 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 60 s (blau) und Zweikomponenten Fit mit bei 35,4 μ s festgesetztem τ_{D_1} (rot).	54
4.6	Wahrscheinlichkeit $P_{\kappa}(n)$ für n Label pro Alexa-ABT-325 bei einer Label-effizienz von $\kappa = 4,6$	55
4.7	Anteile von ABT-325 ohne Fluoreszenzlabel $P_{\kappa}(0)$ bei verschiedenen Label-effizienzen κ . In Schwarz ist der Anteil an ungelabeltem ABT-325 bei der gefundenen Label-effizienz von $\kappa = 4,6$ gezeigt.	55
4.8	Normiertes Massenspektrum von Alexa-ABT-325 mit dem Massenpeak $[M^+]$ von $m/z = 151.853$	56
4.9	Isolierung von ABT-325-BS ³ Dimeren über eine Superdex TM 200 PC 3.2/30 Säule. Detektion bei $\lambda = 280$ nm. In Grau ist die verwendete Dimerfraktion hervorgehoben.	57
4.10	Normierte Massenspektren von ABT-325 Monomer (orange) und ABT-325-BS ³ Dimer (grün) mit den Massenpeaks $[M^+]$ und $[2M^+]$ des Monomers und den Massenpeaks $[M^+]$, $[M^{2+}]$ und $[2M^{3+}]$ des Dimers.	58
4.11	Vernetzung von zwei Alexa-ABT-325 Antikörpern mit BS ³ . Alexa-ABT-325 wurde als stilisierter Antikörper mit gelboranger Kreisfläche als Symbol für die Alexa Fluor [®] 532 Markierung dargestellt.	59
4.12	Isolierung von Alexa-ABT-325-BS ³ Dimeren über eine Superdex TM 200 PC 3.2/30 Säule mit PBS als Fließmittel. Detektion bei $\lambda = 280$ nm (blau) und 532 nm (rot). In Grau ist die verwendete Alexa-ABT-325-BS ³ Fraktion hervorgehoben.	60
4.13	Normiertes Massenspektrum des Alexa-ABT-325-BS ³ Dimers mit den $[M^+]$, $[M^{2+}]$ und $[2M^{3+}]$ Massenpeaks.	61
4.14	Wahrscheinlichkeit für n Label pro Antikörper $P_{\kappa}(n)$ bei einer Label-effizienz von $\kappa = 4,6$ für Alexa-ABT-325 (blau) und $\kappa = 9,2$ für Alexa-ABT-325-BS ³ Dimere (rot).	62

4.15	Normierte Absorptionsspektren von Alexa Fluor [®] 532 (grün) und Alexa-ABT-325 (blau).	64
4.16	Normierte Emissionsspektren von Alexa Fluor [®] 532 (grün) und Alexa-ABT-325 (blau). Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490nm aufgenommen.	65
4.17	Zählraten pro Molekül von 5nM Alexa Fluor [®] 532 in PBS bei verschiedenen Laserleistungen als Mittelwerte aus jeweils zehn Messungen von 60s Dauer.	66
4.18	Zehn Autokorrelationskurven von 5nM in PBS vermessenem Alexa Fluor [®] 532. Die Laserleistung betrug 1,44μW, die Messdauer war 60s.	67
4.19	Mittelwerte und Standardabweichungen aus zehn PCHs, die mit einer Binbreite von 100μs aus Messungen von 5nM Alexa Fluor [®] 532 in PBS bei einer Laserleistung von 1,44μW und einer Messdauer von jeweils 60s erstellt wurden.	67
4.20	Schematische Darstellung des um 90° nach rechts gekippten Versuchsaufbau von Z-Scans einer Alexa Fluor [®] 532 (A) und einer Alexa-ABT-325 (B) Probe in unbehandelten Kammerdeckgläsern mit dem sich bewegenden Fokus (gelb) und den sich in der Lösung befindlichen fluoreszenten Molekülen (rot).	69
4.21	Wasserfalldiagramm der Z-Scans von 12nM Alexa-ABT-325 in PBS in einem unbehandelten Lab-Tek [™] Kammerdeckglas nach 0min (rot), 5min (grün), 10min (blau) und 15min (orange) Inkubationszeit.	70
4.22	Wasserfalldiagramm der Z-Scans von 12nM Alexa-ABT-325 in PBS in einem mit 5% Milchpulver in PBS beschichteten Lab-Tek [™] Kammerdeckglas nach 0min (rot), 5min (grün), 10min (blau), 15min (orange) und 60min (dunkelgrün) Inkubationszeit.	70

4.23	Fluoreszenzintensitätsspuren von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS nach Lagerung bei -80°C (A), sieben Tage bei 4°C (B) und sieben Tage bei 50°C (C). Die Fluoreszenzintensität ist in Ereignisse pro Bin bei einer Binbreite von 1 ms angegeben ($\equiv\text{ kHz}$).	71
4.24	ACCs von 3 nM Alexa-ABT-325 (blau) und 3 nM Alexa-ABT-325-BS ³ Dimeren (rot) in PBS mit angedeuteten Diffusionszeitkonstanten.	72
4.25	Theoretischer Verlauf von ACF Werten für Alexa-ABT-325 (blaue Linie) und Alexa-ABT-325 mit 5% Dimeranteil (magenta gestrichelt), mit den angenommenen Diffusionszeitkonstanten $\tau_{D_1} = 313\text{ }\mu\text{s}$ (blau) und $\tau_{D_2} = 435\text{ }\mu\text{s}$ (rot).	73
4.26	PCH-Daten (schwarze Punkte) einer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 10 min und Einkomponenten PCH-Fit (blaue Linie) und zugehörigen Residuen.	74
4.27	PCH-Daten (schwarze Punkte) einer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS, mit einer Messdauer von 10 min und Zweikomponenten PCH-Fit (cyan-farbene Linie) und zugehörigen Residuen.	75
4.28	Die Abbildung zeigt mit 50% Monomer- und 50% Dimeranteil simulierte PCH-Daten (schwarze Punkte) und einen Zweikomponenten PCH-Fit (lila-farbene Linie) mit den sich ergebenden Residuen.	76
4.29	Verteilung der Intensitäten einzelner Ereignisse bei unterschiedlichen Schwellenwertkombinationen. Daten der Einzeleregniserkennung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit einer Messdauer von 10 min ($n = 10$). Die Alexa-ABT-325 Probe wurde bei -80°C gelagert.	79
4.30	Simulierte Autokorrelationskurve von 1 nM Alexa-ABT-325 mit 7% Dimeranteil für eine Messdauer von 10 min	81

4.31	Fraktionen der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zweiten Wendepunktes τ_{D_2} einer simulierten Alexa-ABT-325 Probe mit 2% (gelb), 3% (orange), 5% (blau), 7% (grün) und 10% (magenta) Dimeranteil. Für die Simulationen wurde eine Stoffmengenkonzentration von 1 nM und eine Messdauer von 10 min eingesetzt.	82
4.32	Kalibrierkurve aus simulierten Alexa-ABT-325 Datensätzen mit über den c Werten aufgetragenen unterschiedlichen Dimeranteilen (Messdauer = 10 min , $n = 30$ pro Punkt).	83
4.33	c Werte aus simulierten Alexa-ABT-325 Datensätzen ohne Hintergrundrauschen in Rot (Messdauer = 10 min , $n = 10$ pro Punkt) im Vergleich zur Kalibrierkurve (Messdauer = 10 min , $n = 30$ pro Punkt).	84
4.34	Normierte Autokorrelationskurven von $5 \times 10^{-4}\text{ g/L}$ Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor [®] 532 IgG vor (cyan) und nach (rot) Zugabe von 1% (Massenverhältnis) Hase-Anti-Ziege IgG in PBS bei einer Messdauer von 10 min	85
4.35	Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D_2} von $5 \times 10^{-4}\text{ g/L}$ Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor [®] 532 IgG vor (blau) und nach Zugabe von 1% (grün) und 2% (magenta) Hase-Anti-Ziege IgG. Die Messungen wurden in PBS mit einer Messdauer von 10 min durchgeführt.	86
4.36	Dimeranteile von $5 \times 10^{-4}\text{ g/L}$ Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor [®] 532 IgG vor (A und D) und nach Zugabe von 1% (B), 2% (C) und 3% (E) Hase-Anti-Ziege IgG in PBS ($p \leq 0,05$). Die Messdauer betrug 10 min ($n = 8$).	87
4.37	Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D_2} von 2 nM Alexa-ABT-325 gelagert bei 4°C nach einem (blau) und sieben (magenta) Tagen. Die Messdauer betrug 10 min	88

4.38	Gemittelte c Werte ($n = 10$) von $2nM$ Alexa-ABT-325 Kontrollproben und nach ein bis siebentägiger Lagerung bei $4^{\circ}C$ ($p \leq 0,05$).	88
4.39	Fraktion der zweiten Komponente $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit des zugehörigen zweiten Wendepunktes τ_{D_2} einer Messung von einem Tag bei $50^{\circ}C$ eingelagertem Alexa-ABT-325. Die vermessene Stoffmengenkonzentration war $2nM$ und die Messdauer $10min$	90
4.40	Autokorrelationskurve einer FCS Messung von $2nM$ Alexa-ABT-325 nach siebentägiger Lagerung bei $50^{\circ}C$. Die Messdauer betrug $10min$	90

Tabellenverzeichnis

1.1	Monoklonale Antikörperpräparate mit einer Zulassung nach Paul-Ehrlich-Institut.	5
1.2	Immunglobulinpräparate nach Paul-Ehrlich-Institut, die eine Zulassung besitzen.	7
3.1	Verwendete Chemikalien	28
3.2	Zusammensetzung der Sinapinsäurematrix	29
3.3	Bestandteile der wässrigen Einlagerungsmatrix	30
3.4	PBS Bestandteile	30
3.5	Für die Simulationen der Kalibrierkurve verwendete variable Konzentrationen von Monomeren (c_{Mo}) und Dimeren (c_{Di})	48
4.1	Wahrscheinlichkeit für n Label pro Antikörper $P_{\kappa}(n)$ bei $\kappa = 4,6$ (Monomer) und $\kappa = 9,2$ (Dimer).	62
4.2	Bestrahlungsdauer t , normierte Absorptionswerte bei $\lambda = 532\text{ nm}$ nach der Bestrahlung mit der Leistung $P_{532\text{ nm}} = 40,3\text{ mW}$ und für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen bei der Leistung $P_{514\text{ nm}} = 1,44\text{ }\mu\text{W}$ korrigierten Bestrahlungsdauer t'	68

4.3	Ergebnisse der Zweikomponenten PCH-Auswertung einer fluoreszenz- mikroskopischer Messung von 2 nM Alexa-ABT-325 in PBS mit den mitt- leren Teilchenzahlen \bar{N} , den molekularen Helligkeiten ε und dem Kor- rekturfaktor F , dem Verhältnis der Emission innerhalb und außerhalb des theoretischen Fokus.	75
4.4	PCH Auswertungen von simulierten Daten. Mit den mittleren Teilchen- zahlen \bar{N} und den molekularen Helligkeiten ε für Monomere, Dimere und einem Gemisch aus 50% Monomer und 50% Dimer.	77
4.5	Dimeranteile und zugehörige c Werte aus simulierten Datensätzen ($n =$ 30).	83
4.6	Dimeranteile und zugehörige c Werte aus simulierten Datensätzen ohne Hintergrundrauschen ($n = 10$).	84
4.7	c Werte und Dimeranteile von eingelagerten Alexa-ABT-325 Proben . . .	89

Literaturverzeichnis

- [1] G. M. Bernier. Structure of human immunoglobulins: myeloma proteins as analogues of antibody. *Prog Allergy*, 14:1–36, 1970.
- [2] C. Wingren, U. Alkner, and U.-B. Hansson. Antibody classes. In *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, pages 1–8. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2001.
- [3] A. H. Lucas. Antibody function. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 2001.
- [4] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, and D. Myrtek. *Der Experimentator Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- [5] P. M. Rudd and R. A. Dwek. Glycosylation: heterogeneity and the 3d structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 32(1):1–100, 1997.
- [6] M. Reth. Antigen receptors on b lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 10:97–121, 1992.
- [7] B. J. Sutton and H. J. Gould. The human ige network. *Nature*, 366(6454):421–8, 1993.
- [8] A. C. Davis and M. J. Shulman. Igm–molecular requirements for its assembly and function. *Immunol Today*, 10(4):118–22; 127–8, 1989.
- [9] D. R. Burton, L. Gregory, and R. Jefferis. Aspects of the molecular structure of igg subclasses. *Monogr Allergy*, 19:7–35, 1986.
- [10] T. E. Michaelsen, P. Garred, and A. Aase. Human igg subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur J Immunol*, 21(1):11–6, 1991.
- [11] K. H. Roux, L. Strelets, and T. E. Michaelsen. Flexibility of human igg subclasses. *J Immunol*, 159(7):3372–82, 1997.
- [12] L. J. Harris, E. Skaletsky, and A. McPherson. Crystallographic structure of an intact igg1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 275(5):861–72, 1998.
- [13] H. Zola. Monoclonal antibodies: Therapeutic uses. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, pages 1–7, 2001.
- [14] M. Braddock, A. Quinn, and J. Canvin. Therapeutic potential of targeting il-1 and il-18 in inflammation. *Expert Opin Biol Ther*, 4(6):847–60, 2004.
- [15] G. Bamias, K. Sugawara, C. Pagnini, and F. Cominelli. The th1 immune pathway as a therapeutic target in crohn’s disease. *Curr Opin Investig Drugs*, 4(11):1279–86, 2003.
- [16] S. B. Hanauer, B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, and P. Rutgeerts. Maintenance infliximab for crohn’s disease: the accent i randomised trial. *Lancet*, 359(9317):1541–9, 2002.

- [17] D. H. Present, P. Rutgeerts, S. Targan, S. B. Hanauer, L. Mayer, R. A. van Hogezand, D. K. Podolsky, B. E. Sands, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and S. J. van Deventer. Infiximab for the treatment of fistulas in patients with crohn's disease. *N Engl J Med*, 340(18):1398–405, 1999.
- [18] S. R. Targan, S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and P. J. Rutgeerts. A short-term study of chimeric monoclonal antibody ca2 to tumor necrosis factor alpha for crohn's disease. crohn's disease ca2 study group. *N Engl J Med*, 337(15):1029–35, 1997.
- [19] B. L. Bartlett and S. K. Tying. Ustekinumab for chronic plaque psoriasis. *Lancet*, 371(9625):1639–40, 2008.
- [20] J. Sageshima, G. Ciancio, L. Chen, and 3rd Burke, G. W. Anti-interleukin-2 receptor antibodies-basiliximab and daclizumab-for the prevention of acute rejection in renal transplantation. *Biologics*, 3:319–36, 2009.
- [21] P. Gronski, T. Haas, E. J. Kanzy, W. Lang, J. Roder, K. Ruhwedel, and K. Simshauser. Indications of neutralising anti-idiotypic antibodies and selective proteolytic fragmentation in polyclonal anti-d igg preparations. *Biologics*, 31(3):191–201, 2003.
- [22] K. Cichutek. Bekanntmachung nr. 360 über die zulassung von impfstoffen und biomedizinischen arzneimitteln sowie andere amtshandlungen. *Bundesanzeiger*, 100:2428, 2011.
- [23] C. B. Wu, H. Ying, C. Grinnell, S. Bryant, R. Miller, A. Clabbers, S. Bose, D. McCarthy, R. R. Zhu, L. Santora, R. Davis-Taber, Y. Kunes, E. Fung, A. Schwartz, P. Sakorafas, J. J. Gu, E. Tarcsa, A. Murtaza, and T. Ghayur. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnology*, 25(11):1290–1297, 2007.
- [24] M. A. Argiriadi, T. Xiang, C. B. Wu, T. Ghayur, and D. W. Borhani. Unusual water-mediated antigenic recognition of the proinflammatory cytokine interleukin-18. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36):24478–24489, 2009.
- [25] Abbott Laboratories, Chicago, Il, USA. *ABT-325 Scientific info*, 1 edition, 2005.
- [26] R. M. Fesinmeyer, S. Hogan, A. Saluja, S. R. Brych, E. Kras, L. O. Narhi, D. N. Brems, and Y. R. Gokarn. Effect of ions on agitation- and temperature-induced aggregation reactions of antibodies. *Pharm Res*, 26(4):903–13, 2009.
- [27] F. Baert, M. Noman, S. Vermeire, G. Van Assche, D' Haens G, A. Carbonez, and P. Rutgeerts. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infiximab in crohn's disease. *N Engl J Med*, 348(7):601–8, 2003.
- [28] R. L. West, Z. Zelinkova, G. J. Wolbink, E. J. Kuipers, P. C. Stokkers, and C. J. van der Woude. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 28(9):1122–6, 2008.
- [29] S. Hermeling, D. J. Crommelin, H. Schellekens, and W. Jiskoot. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res*, 21(6):897–903, 2004.
- [30] A. S. Rosenberg. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *Aaps J*, 8(3):E501–7, 2006.
- [31] U. B. Hansson. Aggregation of human immunoglobulin g upon freezing. *Acta Chem Scand*, 22(2):482–9, 1968.

- [32] J. M. Sarciaux, S. Mansour, M. J. Hageman, and S. L. Nail. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine igg during freeze-drying. *J Pharm Sci*, 88(12):1354–61, 1999.
- [33] B. S. Bhatnagar, R. H. Bogner, and M. J. Pikal. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5):505–523, 2007.
- [34] A. W. Vermeer and W. Norde. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J*, 78(1):394–404, 2000.
- [35] L. A. Kueltz, W. Wang, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter. Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(5):1801–1812, 2008.
- [36] G. B. Strambini and E. Gabellieri. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophys J*, 70(2):971–6, 1996.
- [37] H. C. Mahler, R. Müller, W. Friess, A. Delille, and S. Matheus. Induction and analysis of aggregates in a liquid igg1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 59(3):407–17, 2005.
- [38] D. Ejima, K. Tsumoto, H. Fukada, R. Yumioka, K. Nagase, T. Arakawa, and J. S. Philo. Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins*, 66(4):954–62, 2007.
- [39] W. Jiskoot, M. Bloemendal, B. van Haeringen, R. van Grondelle, E. C. Beuvery, J. N. Herron, and D. J. Crommelin. Non-random conformation of a mouse igg2a monoclonal antibody at low ph. *Eur J Biochem*, 201(1):223–32, 1991.
- [40] A. Hawe, J. C. Kasper, W. Friess, and W. Jiskoot. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(2):79–87, 2009.
- [41] J. Steensgaard. The mechanism of immune precipitation. *Immunology Today*, 5(1):7–10, 1984.
- [42] E. M. Yoo, L. A. Wims, L. A. Chan, and S. L. Morrison. Human igg2 can form covalent dimers. *J Immunol*, 170(6):3134–8, 2003.
- [43] K. Maninger, M. Weblacher, K. Zatloukal, W. Estelberger, K. Schauenstein, and E. Schauenstein. Igg1—as the only subclass of human serum igg—spontaneously undergoes o2(-)-induced, noncovalent self- aggregation upon storage at room temperature. *Free Radic Biol Med*, 20(3):263–70, 1996.
- [44] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, April 1998.
- [45] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8):3597–3619, 2003.
- [46] F. Wilkinson, D. J. Mcgarvey, and A. F. Olea. Excited triplet-state interactions with molecular-oxygen - influence of charge-transfer on the bimolecular quenching rate constants and the yields of singlet oxygen (o_2^* , $^1\delta_g$) for substituted naphthalenes in various solvents. *Journal of Physical Chemistry*, 98(14):3762–3769, 1994.

-
- [47] J. B. Pawley. *HANDBOOK OF BIOLOGICAL CONFOCAL MICROSCOPY*. Springer, 3 edition, 2006.
- [48] F. Stracke, M. Heupel, and E. Thiel. Singlet molecular oxygen photosensitized by rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 126(1-3):51–58, 1999.
- [49] M. A. Fox and J. K. Whitesell. *Organische Chemie; Grundlagen, Mechanismen, bioorganische Anwendungen*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg u.a., 1995.
- [50] S. A. Soper, E. B. Shera, J. C. Martin, J. H. Jett, J. H. Hahn, H. L. Nutter, and R. A. Keller. Single-molecule detection of rhodamine 6g in ethanolic solutions using continuous wave laser excitation. *Analytical Chemistry*, 63(5):432–437, 1991.
- [51] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenko, and M. Orrit. Photobleaching of rhodamine 6g in poly(vinyl alcohol) at the ensemble and single-molecule levels. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(10):1657–1665, 2004.
- [52] Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA. *Alexa Fluor[®] Succinimidyl Esters*, mp 10168 edition, 2009.
- [53] Invitrogen. Alexa fluor[®] 532 carboxylic acid, succinimidyl ester. Homepage; <http://products.invitrogen.com>, 2011.
- [54] M. Kinjo and R. Rigler. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, 23(10):1795–9, 1995.
- [55] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29–61, 1974.
- [56] R. Brock. Fluoreszenz-korrelations-mikroskopie-analyse molekularer funktion in der lebenden zelle. *Bioforum*, 5:330–334, 2000.
- [57] S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry*, 41(3):697–705, 2002.
- [58] R. Rieger, C. Röcker, and G.U. Nienhaus. Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory. *Am. J. Phys.*, 73(12):1129–1134, 2005.
- [59] N. L. Thompson, A. M. Lieto, and N. W. Allen. Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 12(5):634–41, 2002.
- [60] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background - analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 22(3):169–175, 1993.
- [61] L. Guo, J. Y. Har, J. Sankaran, Y. M. Hong, B. Kannan, and T. Wohland. Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: A comparative study. *Chemphyschem*, 9(5):721–728, 2008.
- [62] Y. Chen, A. C. Munteanu, Y. F. Huang, J. Phillips, Z. Zhu, M. Mavros, and W. Tan. Mapping receptor density on live cells by using fluorescence correlation spectroscopy. *Chemistry*, 15(21):5327–36, 2009.
- [63] C. Maier, D. Rünzler, J. Schindelar, G. Grabner, W. Waldhäusl, G. Köhler, and A. Luger. G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *J Cell Sci*, 118(Pt 15):3353–61, 2005.

- [64] L. Wawrezynieck, H. Rigneault, D. Marguet, and P. F. Lenne. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J*, 89(6):4029–42, 2005.
- [65] O. Hegener, L. Prenner, F. Runkel, S. L. Baader, J. Kappler, and H. Häberlein. Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry*, 43(20):6190–9, 2004.
- [66] D. Grünwald, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, and V. Buschmann. Diffusion and binding properties investigated by fluorescence correlation spectroscopy (fcs). *Curr Pharm Biotechnol*, 6(5):381–6, 2005.
- [67] V. Vukojević, A. Pramanik, T. Yakovleva, R. Rigler, L. Terenius, and G. Bakalkin. Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Cell Mol Life Sci*, 62(5):535–50, 2005.
- [68] M. Weiss, H. Hashimoto, and T. Nilsson. Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 84(6):4043–52, 2003.
- [69] S. Maiti, U. Haupts, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22):11753–7, 1997.
- [70] R. Rigler. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. applications in biotechnology. *J Biotechnol*, 41(2-3):177–86, 1995.
- [71] K. M. Berland, P. T. So, Y. Chen, W. W. Mantulin, and E. Gratton. Scanning two-photon fluctuation correlation spectroscopy: particle counting measurements for detection of molecular aggregation. *Biophys J*, 71(1):410–20, 1996.
- [72] Carl Zeiss Jena GmbH; EVOTEC BioSystems GmbH, Jena; Hamburg. *Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer ConfoCor®*, 227200-7044.101 edition, 1997.
- [73] M. Eigen and R. Rigler. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13):5740–7, 1994.
- [74] D. Magde, W. W. Webb, and E. Elson. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, 1972.
- [75] Y. Chen, J. D. Müller, P. T. So, and E. Gratton. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J*, 77(1):553–67, 1999.
- [76] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, and K. Gall. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24):13756–13761, 1999.
- [77] T. D. Perroud, B. Huang, and R. N. Zare. Effect of bin time on the photon counting histogram for one-photon excitation. *Chemphyschem*, 6(5):905–12, 2005.
- [78] O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2):251–297, 2002.
- [79] M. Fujiwara, A. Tanaka, S. Takahashi, K. Yoshino, Y. Nambu, A. Tajima, S. Miki, T. Yamashita, Z. Wang, A. Tomita, and M. Sasaki. Afterpulse-like phenomenon of superconducting single photon detector in high speed quantum key distribution system. *Opt Express*, 19(20):19562–71, 2011.

-
- [80] L. N. Hillesheim and J. D. Müller. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy with non-ideal photodetectors. *Biophys J*, 85(3):1948–58, 2003.
- [81] J. D. Müller, Y. Chen, and E. Gratton. Resolving heterogeneity on the single molecular level with the photon-counting histogram. *Biophys J*, 78(1):474–86, 2000.
- [82] T. D. Perroud, B. Huang, M. I. Wallace, and R. N. Zare. Photon counting histogram for one-photon excitation. *Chemphyschem*, 4(10):1121–3, 2003.
- [83] T. D. Perroud. *PHOTON COUNTING HISTOGRAM FOR PROTEIN CONFORMATIONAL ANALYSIS*. PhD thesis, STANFORD UNIVERSITY, 2006.
- [84] B. Huang, T. D. Perroud, and R. N. Zare. Photon counting histogram: one-photon excitation. *Chemphyschem*, 5(10):1523–31, 2004.
- [85] T. Kohl and P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy with autofluorescent proteins. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 95:107–42, 2005.
- [86] K. Bacia and P. Schwille. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods*, 29(1):74–85, 2003.
- [87] M.H. Groschup and H.A. Kretzschmar. *Prion diseases: diagnosis and pathogenesis*. Springer, 2000.
- [88] N. Lermer, M. D. Barnes, C. Y. Kung, W. B. Whitten, and J. M. Ramsey. High efficiency molecular counting in solution: Single-molecule detection in electrostatically focused microdroplet streams. *Analytical Chemistry*, 69(11):2115–2121, 1997.
- [89] K. Dörre, J. Stephan, M. Lapczynska, M. Stuke, H. Dunkel, and M. Eigen. Highly efficient single molecule detection in microstructures. *J Biotechnol*, 86(3):225–36, 2001.
- [90] A. Benda, M. Hof, M. Wahl, M. Patting, R. Erdmann, and P. Kapusta. Tcspec upgrade of a confocal fcs microscope. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, 76, 2005.
- [91] C. Gell, A. Smith, and D. Brockwell. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. New York, NY [u.a.]: Oxford Univ. Press, 2006.
- [92] M. Wahl, F. Koberling, M. Patting, H. Rahn, and R. Erdmann. Time-resolved confocal fluorescence imaging and spectroscopy system with single molecule sensitivity and sub-micrometer resolution. *Curr Pharm Biotechnol*, 5(3):299–308, 2004.
- [93] L. Kågedal, B. Engström, H. Ellegren, A. K. Lieber, H. Lundström, A. Sköld, and M. Schenning. Chemical, physical and chromatographic properties of superdex-75 prep grade and superdex-200 prep grade gel-filtration media. *Journal of Chromatography*, 537(1-2):17–32, 1991.
- [94] I. Drevin and B. L. Johansson. Stability of superdex-75 prep grade and superdex-200 prep grade under different chromatographic conditions. *Journal of Chromatography*, 547(1-2):21–30, 1991.
- [95] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen. A practical approach to crosslinking. *Mol Biol Rep*, 17(3):167–83, 1993.
- [96] R. B. Gennis and C. R. Cantor. Use of nonspecific dye labeling for singlet energy-transfer measurements in complex systems. a simple model. *Biochemistry*, 11(13):2509–17, 1972.

- [97] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W. Y. Leung, and R. P. Haugland. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9):1179–1188, 1999.
- [98] R. Rigler and J. Widengren. Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. In *BioScience*, pages p.180–183, 1990.
- [99] J. Widengren, Mets. Ü, and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99:13368–13379, 1995.
- [100] C. B. Müller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold, W. Richtering, and J. Enderlein. Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Epl*, 83(4):46001–p1–p5, 2008.
- [101] S. W. Lee and P. E. Laibinis. Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo(ethylene glycol)-terminated alkytrichlorosilanes. *Biomaterials*, 19(18):1669–75, 1998.
- [102] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, T. Dertinger, and U. B. Kaupp. Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *Chemphyschem*, 6(11):2324–2336, 2005.
- [103] T. D. Perroud, M. P. Bokoch, and R. N. Zare. Cytochrome c conformations resolved by the photon counting histogram: watching the alkaline transition with single-molecule sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49):17570–5, 2005.
- [104] L. M. Davis and G. Q. Shen. Accounting for triplet and saturation effects in fcs measurements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(4):287–301, 2006.
- [105] J. Enderlein, D. L. Robbins, W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, and R. A. Keller. Statistics of single-molecule detection. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(18):3626–3632, 1997.
- [106] M. Rankl, T. Ruckstuhl, M. Rabe, G. R. Artus, A. Walser, and S. Seeger. Conformational reorientation of immunoglobulin g during nonspecific interaction with surfaces. *Chemphyschem*, 7(4):837–846, 2006.
- [107] U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys J*, 76(3):1619–31, 1999.
- [108] M. A. Medina and P. Schwill. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. *Bioessays*, 24(8):758–64, 2002.
- [109] H. C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, and S. Kiese. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*, 98(9):2909–34, 2009.
- [110] A. Litzen, J. K. Walter, H. Krischollek, and K. G. Wahlund. Separation and quantitation of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography. *Anal Biochem*, 212(2):469–80, 1993.
- [111] Y. Wan, S. Vasan, R. Ghosh, G. Hale, and Z. Cui. Separation of monoclonal antibody alemtuzumab monomer and dimers using ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng*, 90(4):422–32, 2005.
- [112] U. B. Hansson. Inhibition and reversal of aggregation of immunoglobulin g by freezing. *Acta Chem Scand*, 22(2):490–6, 1968.

-
- [113] G. W. Seegan, C. A. Smith, and V. N. Schumaker. Changes in quaternary structure of igg upon reduction of the interheavy-chain disulfide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(2):907–11, 1979.
- [114] K. H. Roux and D. W. Metzger. Immunolectron microscopic localization of idiotypes and allotypes on immunoglobulin molecules. *J Immunol*, 129(6):2548–53, 1982.
- [115] K. H. Roux, W. J. Monafo, J. M. Davie, and N. S. Greenspan. Construction of an extended three-dimensional idiotope map by electron microscopic analysis of idiotope-anti-idiotope complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(14):4984–8, 1987.
- [116] K. H. Roux. Immunolectron microscopy of idiotope-anti-idiotope complexes. *Methods Enzymol*, 178:130–44, 1989.
- [117] K. H. Roux and D. L. Tankersley. A view of the human idiotypic repertoire. electron microscopic and immunologic analyses of spontaneous idiotope-anti-idiotope dimers in pooled human igg. *J Immunol*, 144(4):1387–95, 1990.
- [118] K. H. Roux. Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*, 120(2):85–99, 1999.
- [119] U. B. Hansson. Ultracentrifugal studies of the aggregation of human immunoglobulin g by freezing and by heating. *Acta Chem Scand*, 22(3):953–60, 1968.
- [120] J. W. Li, W. J. Xie, N. Fang, and E. S. Yeung. Single-molecule immunosorbent assay as a tool for human immunodeficiency virus-1 antigen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(2):489–497, 2009.
- [121] G. T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2nd edition, 2008.
- [122] M. Tan, R. S. Hegde, and X. Jiang. The p domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol*, 78(12):6233–42, 2004.
- [123] A. Leisner, A. Rohlfing, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, and K. Dreisewerd. Infrared laser post-ionization of large biomolecules from an ir-mald(i) plume. *J Am Soc Mass Spectrom*, 15(6):934–41, 2004.
- [124] A. J. Alexander and D. E. Hughes. Monitoring of igg antibody thermal stability by micellar electrokinetic capillary chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 67(20):3626–32, 1995.
- [125] J. Ries and P. Schwille. New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *Phys Chem Chem Phys*, 10(24):3487–97, 2008.
- [126] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, and J. Fitter. Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol*, 5(2):155–61, 2004.
- [127] G. Nishimura and M. Kinjo. Systematic error in fluorescence correlation measurements identified by a simple saturation model of fluorescence. *Anal Chem*, 76(7):1963–70, 2004.
- [128] S. Saffarian and E. L. Elson. Statistical analysis of fluorescence correlation spectroscopy: The standard deviation and bias. *Biophysical Journal*, 84(3):2030–2042, 2003.
- [129] T. Jøssang, J. Feder, and E. Rosenqvist. Photon-correlation spectroscopy of human-igg. *Journal of Protein Chemistry*, 7(2):165–171, 1988.

- [130] F. W. Putnam and B. Udin. Proteins in multiple myeloma. i. physicochemical study of serum proteins. *J Biol Chem*, 202(2):727–43, 1953.
- [131] J. D. Müller. Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J*, 86(6):3981–92, 2004.
- [132] E. Thews, M. Gerken, R. Eckert, J. Zäpfel, C. Tietz, and J. Wrachtrup. Cross talk free fluorescence cross correlation spectroscopy in live cells. *Biophys J*, 89(3):2069–76, 2005.
- [133] Z. Földes-Papp, U. Demel, W. Domej, and G. P. Tilz. A new dimension for the development of fluorescence-based assays in solution: from physical principles of fcs detection to biological applications. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227(5):291–300, 2002.
- [134] W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf, and C. Biskup. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy Research and Technique*, 63(1):58–66, 2004.
- [135] Y. Chen, M. Tekmen, L. Hillesheim, J. Skinner, B. Wu, and J. D. Müller. Dual-color photon-counting histogram. *Biophys J*, 88(3):2177–92, 2005.
- [136] M. Böhmer, M. Wahl, H. J. Rahn, R. Erdmann, and J. Enderlein. Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 353(5-6):439–445, 2002.
- [137] T. A. Laurence, A. N. Kapanidis, X. X. Kong, D. S. Chemla, and S. Weiss. Photon arrival-time interval distribution (paid): A novel tool for analyzing molecular interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(9):3051–3067, 2004.
- [138] S. Bollmann, M. Löllmann, M. Sauer, and S. Doose. Dimer formation of organic fluorophores reports on biomolecular dynamics under denaturing conditions. *Phys Chem Chem Phys*, 2011.
- [139] S. A. Sanchez, Y. Chen, J. D. Müller, E. Gratton, and T. L. Hazlett. Solution and interface aggregation states of crotoalus atrox venom phospholipase a(2) by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry*, 40(23):6903–6911, 2001.
- [140] S. T. Hess and W. W. Webb. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(4):2300–2317, 2002.

6 Anhang

6.1 Weitere Formeln, die den Verlauf des zweiten Anteils beschreiben

Bei der neuen Auswertungsmethode für Autokorrelationskurven ergibt sich bei dem Zweikomponentenfit ein zweiter Anteil $F(\tau_{D_2})$ in Abhängigkeit von dem zweiten Wendepunkt τ_{D_2} . Der Zusammenhang zwischen $F(\tau_{D_2})$ und τ_{D_2} kann auch mit folgenden Formeln beschrieben werden (Formeln 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 und 6.8).

Bei den gezeigten Formeln ist $F(\tau_{D_2})$ die Fraktion des zweiten Anteils, τ_{D_2} der zweite Wendepunkt, τ_n ein Intervall für die Korrelationen der zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen, τ_{tot} größtes Intervall für die Korrelationen der zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen, γ der Exponent, a_n eine Variable für die Multiplikation der Amplitudenwerte und s eine Variable für die Addition zu den Amplitudenwerten.

Trigonometrische Funktionen

$$F(\tau_{D_2}) = a \cdot \tanh(\tau_{D_2}/\tau) \quad (6.1)$$

$$F(\tau_{D_2}) = -\tanh(\tau_{D_2}/\tau) + s \quad (6.2)$$

$$F(\tau_{D_2}) = a_1 \cdot \tanh\left(-\frac{\tau_{D_2} - \tau_{tot}}{\tau_1}\right) + a_2 \cdot \tanh\left(-\frac{\tau_{D_2} - \tau_{tot}}{\tau_2}\right) \quad (6.3)$$

Exponentialfunktionen

$$F(\tau_{D_2}) = a \cdot \tau_{D_2} + \left(1 - e^{-\tau_{D_2}/\tau}\right) + s \quad (6.4)$$

$$F(\tau_{D_2}) = a \cdot \tau_{D_2} + \left(\left(1 - e^{-\tau_{D_2}/\tau_1}\right) - \left(1 - e^{-\tau_{D_2}/\tau_2}\right)\right) + s \quad (6.5)$$

Potenzfunktionen

$$F(\tau_{D_2}) = \frac{a_1}{a_2 \cdot \tau_{D_2}^\gamma} \quad (6.6)$$

$$F(\tau_{D_2}) = \frac{a}{(s + \tau_{D_2})^\gamma} \quad (6.7)$$

$$F(\tau_{D_2}) = a_1 \cdot \tau_{D_2}^{-\gamma} + a_2 \cdot (s - \lg(\tau_{D_2}))^2 \quad (6.8)$$

6.2 Publikationen

1. D. Jakobs, T. Sorkalla and H. Häberlein Ligands for Fluorescence Correlation Spectroscopy on G Protein-Coupled Receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 2012 angenommen
2. C. Cabalero-George, T. Sorkalla, D. Jakobs, J. Bolaños, H. Raja, C. Shearer, E. Bermingham and H. Häberlein Fluorescence Correlation Spectroscopy in Drug Discovery: Study of Alexa532-endothelin 1 binding to the endothelin ETA receptor to describe the pharmacological profile of natural products. *ScientificWorldJournal*, 2012, doi: 10.1100/2012/524169
3. R. Veith, T. Sorkalla, E. Baumgart, J. Anzt, H. Häberlein, S. Tyagi, J.P. Siebrasse and U. Kubitscheck Balbiani ring mRNPs diffuse through and bind to clusters of large intranuclear molecular structures. *Biophys J* 99(8):2676-85, 2010.
4. A. Sieben, L. Prenner, T. Sorkalla, A. Wolf, D. Jakobs, F. Runkel and H. Häberlein α -Hederin, but not hederacosid C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of β_2 -adrenergic receptor. *Biochemistry* 46(17):5106-5113, 2007.
5. A. Yaghootfam, T. Sorkalla, H. Häberlein, V. Gieselmann, J. Kappler and M. Eckhardt Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. *Biochemistry* 46(32):9260-9269, 2007.
6. A. Yaghootfam, T. Sorkalla, H. Häberlein, V. Gieselmann, J. Kappler and M. Eckhardt Detection of cerebroside sulfotransferase homodimers in living cells. *Journal of Neurochemistry* 99:33, 2006.

Poster

1. C. Cabalero-George, T. Sorkalla, E. Bermingham and H. Häberlein Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) a powerful biophysical method for drug discovery: study of Alexa532-endothelin 1 binding on the endothelin ETA receptor on living cells. *Planta Medica* 74(9):1156-1157, 2008.

6.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Thomas Sorkalla, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben. Ich habe noch keinen Promotionsversuch unternommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an den aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht.

Bonn,
Thomas Sorkalla

6.4 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. Häberlein für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. G.M. König für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr J. Enderlein danke ich für die Hilfe bei der Simulation der fluoreszenzmikroskopischen Daten und deren Verarbeitung.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Ferrari für den guten Rat bei den mathematischen Fragen der Arbeit.

Bei Herrn Ph.D. T. Perroud für die Überlassung des „PCH Data Processing Plugin“ und die Hilfe bei der Anwendung.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Gratton für die Hilfe bei der Suche nach den richtigen Parametern für die PCH-Versuche.

Bei Herrn Dipl.-Phys. Y. Gensterblum für die Unterstützung bei allen Computer Fragen und die Unterstützung bei allen physikalischen Fragestellungen.

Bei Frau Dr. D. Henseler für das kritische Durchlesen meiner Arbeit.

Bei meinen Kollegen, Anne Hage-Hülsmann, Dr. Anne Wolf, Dr. Anne Sieben und Daniel Jakobs für die gute Atmosphäre im Arbeitskreis, die große Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit und ganz besonders Dr. Lars Prenner für die Einführung in die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie und des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie für ihre Hilfsbereitschaft.

Bei den Abbott Laboratories mit Sitz in Chicago bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Mein besonderer Dank geht an meinen Eltern die mich immer unterstützen und ganz besonders meiner Freundin Julia.