

Assayentwicklung für das Therapeutische Drug Monitoring von Immunsuppressiva

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Kathrin Freudenberger
aus Stuttgart

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	14.03.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Günter Gauglitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Carolin Huhn

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Dank sagen, ohne die es nicht möglich gewesen wäre diese Arbeit zu verfassen und all jenen, die mich unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz. Ihm danke ich dafür, dass er es mir ermöglicht hat dieses interessante Thema zu bearbeiten und für die Betreuung, aber auch für die vielen Gelegenheiten an Projekttreffen sowie nationalen und internationalen Tagungen und Konferenzen teilzunehmen.

Bei Frau Prof. Dr. Carolin Huhn möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe Gauglitz, der Arbeitsgruppe Huhn und Biometrics für die gute Atmosphäre während all der Zeit. Julia Stüb, Patricia Weber und Dr. Dominik Furin danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und bei fachlichen Fragen, aber auch für die Feierabende, die wir im Ruheraum zusammen haben ausklingen lassen. Urs Hilbig danke ich für die gute Teamarbeit im Projekt NANODEM und seinen unermüdlichen Optimismus. Dr. Lothar Leidner möchte ich für die leckeren Kuchen und die Unterstützung bei physikalischen Fragen danken. Vielen Dank auch an Johannes Riedt für die Hilfe bei formellen Abwicklungen und für die Versorgung des Arbeitskreises mit Milch zum Kaffee. Dr. Peter Fechner danke ich für die Unterstützung bei den iRIfS-Messungen und die fachlichen Diskussionen und Gespräche. Dr. Florian Pröll danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Felix Kolarov danke ich für die Einweisung in die Kalorimetrie. Bei meiner ehemaligen Bürokollegin Dr. Katrin Krieg möchte ich mich für die fachlichen Gespräche, das Korrekturlesen von Postern und für die Freundschaft bedanken.

Meiner Familie gilt mein Dank für die Unterstützung während der vergangenen Jahre und ihr großes Vertrauen in mich.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Matthias Ernst bedanken, der mir immer zur Seite stand und Rückhalt gegeben hat, wenn es im Labor gerade nicht so gut lief.

INHALTSVERZEICHNIS

1	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	1
2	THEORETISCHER TEIL	4
2.1	LICHT UND MATERIE	4
2.1.1	<i>Reflexion und Brechung</i>	4
2.1.2	<i>Interferenz an dünnen Schichten</i>	6
2.1.3	<i>Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) und 1-λ-Reflektometrie</i>	6
2.1.4	<i>Fluoreszenz</i>	8
2.2	BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN	10
2.2.1	<i>Antikörper</i>	10
2.2.2	<i>Bindungskinetik</i>	12
2.2.3	<i>Kinetik in homogener Phase</i>	12
2.2.4	<i>Kinetik an heterogener Phase</i>	14
2.2.5	<i>Kinetisch kontrollierte Reaktionen</i>	14
2.2.6	<i>Diffusionslimitierte Reaktionen</i>	14
2.2.7	<i>Testformate</i>	15
2.2.8	<i>Matrix 2 (M2)-Protonenkanal des Influenza A-Virus</i>	17
2.3	THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING	19
2.4	IMMUNSUPPRESSIVA	21
2.5	NANOMATERIALIEN UND NANOPARTIKEL	24
2.6	THERMODYNAMIK	26
2.6.1	<i>Thermodynamische Betrachtungen bei Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor</i>	29
2.6.2	<i>Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)</i>	30
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	OBERFLÄCHENPRÄPARATION	32
3.1.1	<i>Glasoberfläche</i>	32
3.1.2	<i>Magnetische Partikel</i>	35
3.2	ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE (ITC)	36
3.2.1	<i>Statische und dynamische Kalibrierung</i>	36
3.2.2	<i>Auswertung der ITC-Messungen</i>	37
3.2.3	<i>Strukturformeln</i>	38
3.2.4	<i>Durchführung der ITC-Messungen mit dem M2TM</i>	38
3.3	RIFS-MESSUNGEN	39
3.4	FLUORESZENZMESSUNG	40
3.5	SOFTWARE	41
3.6	CHEMIKALIEN	41
3.6.1	<i>Partikel</i>	43
3.6.2	<i>Antikörper</i>	44
3.6.3	<i>Lösungen und Puffer</i>	45
3.7	GERÄTE	46
3.7.1	<i>Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)</i>	46
3.7.2	<i>RIFS</i>	46
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
4.1	IMMUNOASSAYS IN RIFS/IRIFS	49
4.1.1	<i>Tacrolimus</i>	49
4.1.2	<i>Cyclosporin A</i>	61
4.1.3	<i>Mycophenolsäure</i>	65
4.1.4	<i>Kurzzusammenfassung des Kapitels 4.1</i>	69

4.2	MAGNETISCHE (NANO)PARTIKEL	70
4.2.1	<i>Immobilisierung des Antikörpers auf der Partikeloberfläche</i>	70
4.2.2	<i>Immobilisierung des Antigens auf der Partikeloberfläche</i>	76
4.2.3	<i>Kurzzusammenfassung des Kapitels 4.2.....</i>	83
4.3	M2-PROTONENKANAL.....	84
4.3.1	<i>Udorn</i>	86
4.3.2	<i>S31N.....</i>	94
4.3.3	<i>Temperaturabhängigkeit</i>	95
4.3.4	<i>Kurzzusammenfassung</i>	97
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	98
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	98
5.2	AUSBLICK.....	100
6	LITERATUR.....	101
7	ANHANG.....	106
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHIS	106
7.2	PARAMETER DER NICHT-LINEAREN ITC-ANPASSUNG	107
7.3	THERMODYNAMISCHE PROFILE BEI UNABHÄNGIGER ANPASSUNG	108
7.4	VERÖFFENTLICHUNGEN	109
7.4.1	<i>Publikationen</i>	109
7.4.2	<i>Vorträge</i>	109
7.4.3	<i>Poster</i>	110
7.5	AKADEMISCHE LEHRER.....	110

1 Motivation und Zielsetzung

Die Wechselwirkung von Arzneistoffen mit den jeweiligen Zielstrukturen im Organismus, die auch Targets genannt werden, bildet die Grundlage ihrer Wirkung. Nach der Aufnahme eines Arzneistoffs wird dieser im Körper verteilt und gelangt schließlich zum Wirkort. Die dabei stattfindenden Prozesse werden durch die Pharmakokinetik beschrieben. Die Wechselwirkung des Arzneistoffs am Wirkort mit der Zielstruktur ruft einen pharmakologischen Effekt hervor. Die Pharmakodynamik umfasst diese Effekte, die sowohl die klinische Wirkung als auch unerwünschte Wirkungen beinhalten. Die Interaktion zwischen Arzneistoff und Target stellt also den Schnittpunkt zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Prozessen dar und ist deshalb von zentraler Bedeutung [1]. Typische Targets der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe sind Enzyme oder Rezeptoren, etwas weniger häufig Ionenkanäle, Transporter oder Nucleinsäuren. Die Mehrheit der heutzutage zugelassenen Arzneistoffe sind niedermolekulare Verbindungen, die auch als „small molecules“ bezeichnet werden. Eine klare Definition ist in der Literatur nicht zu finden, meist wird jedoch als Obergrenze die molare Masse $800-1000 \frac{g}{mol}$, teilweise auch bis zu $1500 \frac{g}{mol}$ angegeben. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Wirkstoff ein Naturstoff ist, vollsynthetisch oder teilsynthetisch gewonnen wurde [2]. Arzneistoffe mit einer großen molaren Masse sind die in den letzten Jahren immer stärker vertretenen Biopharmazeutika, wie zum Beispiel therapeutische Antikörper und Proteine oder Nucleinsäuren.

Sowohl in der Diagnostik, als auch bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe kann das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und Target genutzt werden. In der Diagnostik werden Biosensoren eingesetzt, um bestimmte Analyten in einer Probe zu identifizieren und zu quantifizieren. Ein solcher Biosensor besteht aus einer sensitiven Schicht, die eine biologische Erkennungsstruktur für den Analyten, hier für den Arzneistoff, enthält und einem Transducer, der die durch die Wechselwirkung mit dem Analyten hervorgerufene physikalische Änderung in ein messbares Signal umwandelt. In der Arzneistoffentwicklung kann die Untersuchung der Wechselwirkung ausgewählter Substanzen mit klassischen Targets dazu verwendet werden potentielle Arzneistoffkandidaten zu identifizieren.

In der hier vorgestellten Arbeit werden beide Aspekte anhand zweier Beispiele dargestellt und diskutiert; zum einen die Entwicklung eines Biosensors für den Einsatz in der Diagnostik zur Bestimmung von Immunsuppressiva als Beispiel kleiner Moleküle, zum anderen die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen der Transmembrandomäne des M2-Protonenkanals des Influenza A-Virus und Aminoadamantan-Derivaten als potentielle Arzneistoff-Kandidaten.

In den letzten Jahren hat der Einsatz von Biosensoren in der Diagnostik insbesondere für das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) an Bedeutung gewonnen. Therapeutisches Drug Monitoring ist notwendig, wenn Arzneistoffe eine geringe therapeutische Breite besitzen und dadurch nur geringe Unterschiede zwischen der therapeutischen Konzentration und einer Konzentration, die toxische Effekte hervorruft, bestehen. Voraussetzung ist, dass ein Zusammenhang zwischen der Konzentration im Blut und deren Effekt gegeben ist. Neben einigen Antibiotika, Psychopharmaka, Zytostatika und Hormonen sind Immunsuppressiva eine Arzneistoffgruppe, für die eine Überwachung der Blutspiegel empfohlen wird [3]. Im Jahr 2015 wurden in Deutschland fast 3800 Organtransplantationen durchgeführt [4]. Der Erfolg einer Organtransplantation hängt entscheidend von der anschließenden immunsuppressiven Therapie ab, die verhindert, dass das fremde Organ vom Körper abgestoßen wird [5]. Vor allem direkt nach der Transplantation ist es deshalb wichtig, dass die Blutspiegel der verabreichten immunsuppressiven

Medikamente regelmäßig kontrolliert werden und die Dosierung angepasst wird. Ein Biosensor ist hierbei gut geeignet, da er die Analytik direkt am Patientenbett (*engl. Point-Of-Care Testing (POCT)*, patientennahe Labordiagnostik) ermöglicht [6]. Auf diese Weise wird Zeit eingespart, da der Transport der Probe in ein Zentrallabor genauso entfällt wie die dort durchgeführte meist aufwendige Analytik inklusive der notwendigen Aufreinigungsschritte. So können viele Messungen innerhalb kurzer Zeit durchgeführt und dabei genaue Informationen über den bei jedem Patienten individuellen Verlauf des Blutspiegels erhalten werden. Zusätzlich ist die Analytik in einem Point-of-care Gerät meist kostengünstiger als die Analytik mittels LC-MS, wie sie zur Bestimmung der Blutspiegel von Immunsuppressiva heutzutage meist durchgeführt wird [7]. Als biologische Erkennungsstrukturen für den Analyten eignen sich spezifische Antikörper. Neben den oben genannten Vorteilen, bestehen die Nachteile dieser immunanalytischen Verfahren (Immunoassays) hauptsächlich in einer geringeren analytischen Leistungsfähigkeit mit geringfügig höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verglichen mit LC-MS-Methoden und einer geringeren Selektivität, da teilweise Kreuzreaktivitäten zwischen dem Arzneistoff und dessen strukturell nur leicht veränderten aktiven bzw. inaktiven Metaboliten auftreten [8]. Seit den späten 1980er Jahren wurden zahlreiche Immunoassays für das Therapeutische Drug Monitoring entwickelt und vermarktet. Als Markierungsmolekül werden in diesen Assays meist Fluorophore, aber auch Enzyme oder Radioisotope eingesetzt. Magnetische Partikel im Mikrometerbereich werden häufig genutzt, um gewünschte von unerwünschten Probenbestandteilen abzutrennen.

Die Überwachung der Blutspiegel wird insbesondere für die Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus und Cyclosporin A empfohlen [9]. Auch für die Mycophenolsäure beziehungsweise deren Prodrug Mycophenolat-Mofetil hat sich bei der Durchführung eines TDM ein Nutzen für den Patienten herausgestellt [10]. Kommerzielle Immunoassays für die vier erstgenannten Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus und Cyclosporin A werden im Vollblut als Matrix durchgeführt, Immunoassays für Mycophenolsäure im Plasma [11]. Dabei werden nicht nur Arzneistoffmoleküle erfasst, die frei im Blut vorkommen, an das Target binden können und dort einen pharmakologischen Effekt hervorrufen, sondern auch Arzneistoffmoleküle, die an Blutzellen oder Plasmaproteine gebunden sind. Die Bestimmung des freien Arzneistoffs im Blut kann unter Umständen bessere Informationen über den Status der aktuellen Immunsuppression des Patienten liefern, wird aber bisher aus Mangel an Studiendaten nicht angewendet. Die Entwicklung eines POCT-Geräts, das die Bestimmung der Konzentration des freien Arzneistoffs ermöglicht ist daher ein innovatives Vorhaben, welches dazu beitragen kann, den Zusammenhang zwischen freiem Arzneistoff und dessen Effekt besser zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Immunoassays für die Anwendung in einem POCT-Gerät, mit dem die freie Immunsuppressiva-Konzentration im Blut online bestimmt werden kann. Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen des von der EU geförderten Projekts NANODEM (European Union Seventh Framework Programme ([FP/2007-2013], Nr. 31837)) durchgeführt. Im Fokus dieses Projektes stand die Entwicklung eines POCT-Geräts, bestehend aus einer Probenahme-Einheit und einem Analysegerät, das unmittelbar nach einer Organtransplantation eingesetzt werden kann und die im Blut frei vorliegenden Konzentrationen der verabreichten Immunsuppressiva in kurzen Zeitintervallen erfasst. Der Patient soll dabei über einen Venenkatheter mit einer auf dem Markt erhältlichen Mikrodialyseeinheit verbunden werden. Die Membran hält Blutzellen und große Proteine zurück, sodass nur kleine Blutbestandteile und Arzneistoffe passieren können und in der Probe vorliegen [12,13].

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung von Immunoassays zur Konzentrationsbestimmung der Arzneistoffe Tacrolimus, Cyclosporin A und Mycophenolsäure in einem auf Laser-induzierter-Fluoreszenz basierenden Messaufbau vorgestellt. Oberflächeneigenschaften und die Erkennung der Arzneistoffe durch Antikörper, sowie Kreuzreaktivitäten und unspezifische Wechselwirkungen werden dazu mithilfe der markierungsfreien Detektionsmethode Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) charakterisiert. Im Folgenden wird der Assay für Mycophenolsäure als Modellsystem auf die Oberfläche magnetischer Partikel übertragen. Dies birgt den Vorteil einer einfachen Regeneration, da die Partikel während der notwendigen Waschschriffe durch einen Magneten festgehalten und nach der Durchführung des Assays verworfen werden können. Bei der Detektion ist es möglich die Partikel bei Bedarf an einer bestimmten Stelle nahe der Detektionseinheit festzuhalten und dadurch das Signal zu verstärken. Fluoreszenzmoleküle werden zur Markierung der Erkennungsstruktur verwendet, um die Detektion der markierten Struktur in sehr niedrigen Konzentrationen zu ermöglichen. Das verwendete Analysegerät macht sich die Laser-induzierte-Fluoreszenz (LIF) zu Nutze. Dabei werden die fluoreszierenden Moleküle im Volumen des Flusskanals durch einen Laser angeregt und die Fluoreszenz durch Photodioden detektiert.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung molekularer Wechselwirkungen zwischen der Transmembrandomäne des M2-Protonenkanals als Rezeptor und einem „small molecule“ als Liganden. Aminoadamantane, wie zum Beispiel Amantadin bzw. Rimantadin, sind Moleküle, die durch Blockade des Protonenkanals des Influenza A Virus die Replikation hemmen und deshalb als Arzneistoffe gegen die durch Influenza-A-Viren verursachte Grippe eingesetzt werden. Sowohl kleine strukturelle Änderungen des Liganden als auch Punktmutationen im Protonenkanal führen zu einem Verlust der Affinität oder der hemmenden Eigenschaft am Protonenkanal. Amantadin ist bei vielen der heutzutage vorkommenden Influenza A-Stämme wirkungslos, da diese Resistenzen aufweisen. Mit der isothermen Titrationskalorimetrie können thermodynamische Parameter erfasst und Rückschlüsse auf enthalpische bzw. entropische Anteile der Wechselwirkung und den Bezug zur Struktur des Liganden gezogen werden. Dadurch sollen Zusammenhänge der Bindung der Liganden am Protonenkanal besser verstanden werden, um letztendlich Strukturen zu finden, die gegen Amantadin-resistente Stämme wirksam sind.

2 Theoretischer Teil

2.1 Licht und Materie

2.1.1 Reflexion und Brechung

Eine elektromagnetische Welle breitet sich im Vakuum mit Lichtgeschwindigkeit aus. Die Ausbreitung der elektromagnetischen Wellen wird mit den Maxwell-Gleichungen beschrieben. Diese bilden die Basis der Elektrodynamik.

- 1) Eine zeitlich veränderliche magnetische Induktion erzeugt ein elektrisches Wirbelfeld (Induktionsgesetz).
- 2) Ein Magnetfeld entsteht durch ein zeitlich veränderliches elektrisches Feld oder durch eine Stromdichte.

Sichtbares Licht bezeichnet die elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 380 und 780 nm. Der Brechungsindex n als dimensionslose Größe gibt an, wie schnell sich die elektromagnetische Welle in der Materie im Vergleich zum Vakuum ausbreitet [14], [15]. c_m und c_0 sind die Ausbreitungsgeschwindigkeiten des Lichts in Materie und im Vakuum.

$$n = \frac{c_0}{c_m} \quad \text{Gl. 2-1}$$

Die Phasengeschwindigkeit v des Lichts beim Durchdringen von Materie ist abhängig von der Frequenz. Der Brechungsindex ist für nicht ferromagnetische Medien, deren magnetische Permeabilität μ ungefähr 1 beträgt, mit der relativen Dielektrizitätskonstante ϵ_r verknüpft. μ und μ_0 stehen für die magnetische Permeabilität in Materie und in Vakuum, ϵ und ϵ_0 für die dielektrische Leitfähigkeit in Materie und in Vakuum.

$$n = \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\mu \cdot \epsilon}{\mu_0 \cdot \epsilon_0}} = \sqrt{\frac{\epsilon}{\epsilon_0}} = \sqrt{\epsilon_r} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zweier transparenter Medien unterschiedlicher optischer Dichte, so wird er, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, reflektiert und transmittiert (gebrochen). Die Absorption wird dabei vernachlässigt. Beim reflektierten Strahl entspricht der Einfallswinkel α dem Ausfallswinkel α' .

$$\alpha = \alpha' \quad \text{Gl. 2-3}$$

Der Ausfallswinkel des transmittierten Strahls wird nach dem Brechungsgesetz von Snellius zusätzlich zum Einfallswinkel auch von den Brechungsindizes n_1 und n_2 der beiden angrenzenden Medien bestimmt.

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \quad \text{Gl. 2-4}$$

Dabei wird der Lichtstrahl beim Übergang in ein optisch dichteres Medium zum Lot hin und beim Übergang in ein optisch dünneres Medium vom Lot weg gebrochen.

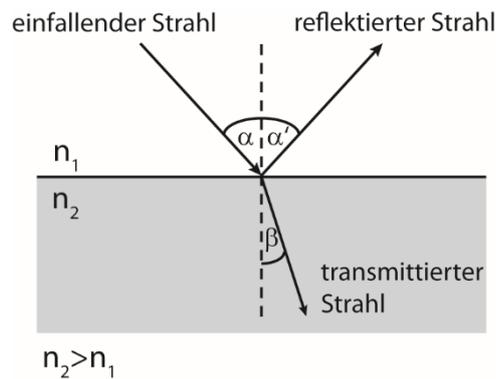


Abbildung 2.1: Reflexion und Brechung an einer planaren Grenzfläche

Aus den Fresnelschen Gleichungen lässt sich der reflektierte bzw. transmittierte Anteil des Lichts ableiten. Sie beschreiben die Amplitudenverhältnisse des elektrischen Feldes des reflektierten bzw. des transmittierten Lichts (E_r , E_t) in Bezug auf das einfallende Licht (E_e).

$$\left(\frac{E_r}{E_e}\right)_s = \rho_s = \frac{n_1 \cos \alpha - n_2 \cos \beta}{n_1 \cos \alpha + n_2 \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-5}$$

$$\left(\frac{E_t}{E_e}\right)_s = \tau_s = \frac{2n_1 \cos \alpha}{n_1 \cos \alpha + n_2 \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-6}$$

$$\left(\frac{E_r}{E_e}\right)_p = \rho_p = \frac{n_2 \cos \alpha - n_1 \cos \beta}{n_2 \cos \alpha + n_1 \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-7}$$

$$\left(\frac{E_t}{E_e}\right)_p = \tau_p = \frac{2n_1 \cos \alpha}{n_2 \cos \alpha + n_1 \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-8}$$

ρ_s und ρ_p sind dabei die Reflexionskoeffizienten, τ_s und τ_p die Transmissionskoeffizienten für senkrecht (s) bzw. parallel (p) zur Einfallsebene polarisierte Komponenten des Lichts.

Das Reflexionsvermögen R bezeichnet das Verhältnis der mittleren Intensität I der einfallenden Welle (e) und der reflektierten Welle (r).

$$R = \frac{\bar{I}_r}{\bar{I}_e} = \rho^2 \quad \text{Gl. 2-9}$$

Diese Gleichung kann bei senkrechtem Lichteinfall vereinfacht werden. Reflexionsvermögen $R(\alpha)$ und der Reflexionskoeffizient $\rho(\alpha)$ sind für die senkrecht und für die parallel polarisierte Komponente (R_s und R_p) gleich.

$$R(\alpha = 0) = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 \quad \text{Gl. 2-10}$$

2.1.2 Interferenz an dünnen Schichten

Die Überlagerung mehrerer Teilwellen wird als Interferenz bezeichnet. Interferenz tritt bei kohärenten Wellen auf, die zum Beispiel aus demselben Wellenzug durch Reflexion oder Brechung aufgespalten werden. Ein Gangunterschied von λ führt zu konstruktiver Interferenz (Verstärkung der Amplitude), wobei ein Gangunterschied von $\lambda/2$ zu destruktiver Interferenz (Auslöschung) führt.

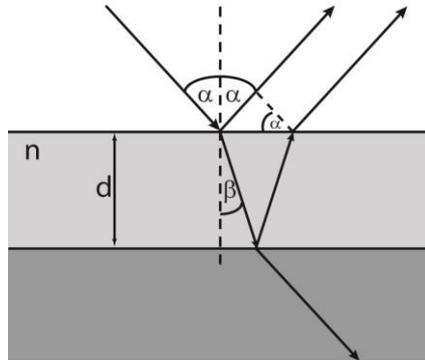


Abbildung 2.2: Interferenz an dünnen Schichten; an einem dünnen Film der Dicke d mit dem Brechungsindex n interferieren die reflektierten Teilstrahlen miteinander.

Der Gangunterschied Δs lässt sich durch geometrische Überlegungen, die in Abbildung 2.2 dargestellt sind, und durch Einbeziehen des Brechungsgesetzes berechnen:

$$\Delta s = 2d\sqrt{n^2 - \sin^2\alpha} = 2nd \cdot \cos\alpha \quad \text{Gl. 2-11}$$

Wird ein Lichtstrahl am optisch dichteren Medium reflektiert, tritt eine Phasenverschiebung $\Delta\Phi$ von π auf. Bei der Reflexion am optisch dünneren Medium tritt keine Phasenverschiebung auf. Konstruktive Interferenz tritt auf für

$$2nd \cdot \cos\alpha = \left(m + \frac{\Delta\Phi}{2\pi}\right) \cdot \lambda, \quad m = 1, 2, \dots$$

Bei senkrecht einfallendem Licht treten im reflektierten Licht Interferenzmaxima bei halbzahligen Vielfachen von $\frac{2nd}{\lambda}$ und Interferenzminima bei ganzzahligen Vielfachen von $\frac{2nd}{\lambda}$ auf.

Bei senkrecht einfallendem Licht gilt für die Intensität I des gesamten reflektierten Lichts:

$$I = I_1 + I_2 + 2 \cdot \sqrt{I_1 \cdot I_2} \cos\left(\frac{4\pi nd}{\lambda}\right) \quad \text{Gl. 2-12}$$

2.1.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) und 1- λ -Reflektometrie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) basiert auf der Interferenz von Licht an dünnen Schichten. Sie ermöglicht eine zeitaufgelöste, markierungsfreie Detektion von Wechselwirkungen an der Oberfläche eines transparenten Transducers [16].

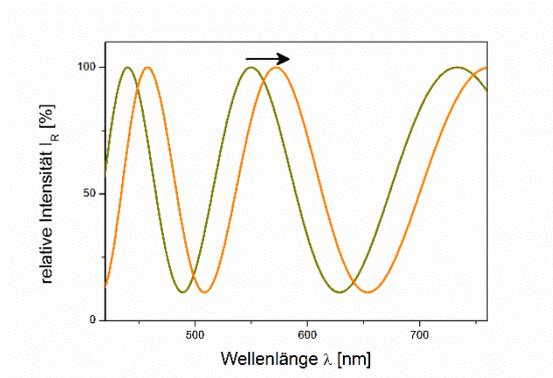
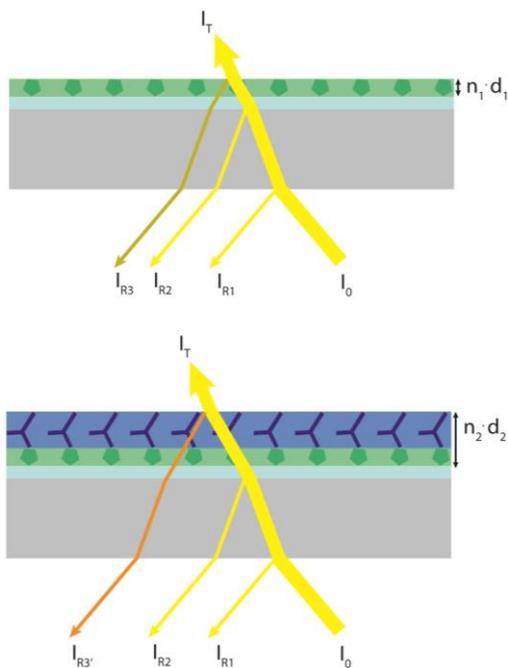


Abbildung 2.3: Schemazeichnung des Prinzips der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Licht wird senkrecht eingestrahlt und an jeder Grenzfläche teilweise reflektiert und transmittiert. Das Interferenzspektrum aus überlagerten reflektierten Teilstrahlen ändert sich bei einer Änderung der optischen Schichtdicke. Zur besseren Übersicht sind die senkrecht eingestrahlenen Lichtstrahlen im Schaubild schräg dargestellt.

Die oberste Schicht des Transducers ist chemisch modifiziert (sensitive Schicht). Weißlicht wird nun senkrecht von unten eingestrahlt und an jeder Grenzfläche zwischen den Schichten des Transducers teilweise reflektiert und transmittiert. Es entstehen Mehrfachreflexionen an jeder Grenzschicht, wobei bei kleinen Reflektivitäten ($<0,05$) nur die erste Reflexion eine nennenswerte Rolle spielt. Dies ist in Abbildung 2.3 links dargestellt. Zwischen den reflektierten Teilstrahlen tritt eine Phasendifferenz $\Delta\varphi$ auf:

$$\Delta\varphi = \frac{2nd}{\lambda} + \varphi_{rel} \quad \text{Gl. 2-13}$$

φ_{rel} stellt dabei die Phasenänderung bei der Reflexion an der Grenzfläche dar.

Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich zu einem Interferenzspektrum, das für ein bestimmtes Schichtsystem charakteristisch ist (siehe Abbildung 2.3 rechts). Moleküle, die mit der sensitiven Schicht interagieren verändern deren optische Schichtdicke, die sich aus dem Brechungsindex und der physikalischen Schichtdicke zusammensetzt ($n \cdot d$). Die optische Weglänge eines der Teilstrahlen ändert sich, was zu einer Verschiebung des Interferenzspektrums führt. Verfolgt man die Verschiebung eines Extremums (z.B. Maximum) des Interferenzspektrums, so kann dadurch eine zeitabhängige Bindung eines Zielmoleküls an die sensitive Schicht beobachtet werden.

Bei der $1-\lambda$ -Reflektometrie wird Licht einer Wellenlänge eingestrahlt, zum Beispiel unter Verwendung einer LED als Lichtquelle. Statt der Beobachtung eines Extremums des Interferenzspektrums, wird hier die Änderung der Intensität bei einer Wellenlänge durch eine Photodiode detektiert. Der Platzbedarf sinkt dadurch enorm, was den Einsatz portabler Geräte ermöglicht. Allerdings muss der Schichtaufbau des Transducers für eine bestimmte Wellenlänge optimiert sein, um eine gute Signaldynamik zu erhalten.

Beim imaging Reflectometric Interference Sensing (iRIFS) wird genauso wie bei der 1- λ -Reflektometrie Licht einer Wellenlänge eingestrahlt. Als Lichtquelle dient eine LED, die Änderung der Intensität wird von einer CMOS-Kamera detektiert (siehe Abbildung 2.4). Dadurch werden Interaktionen an der Oberfläche eines Transducers orts aufgelöst sichtbar. Die Transducer werden hier im Vergleich zur RIFS nicht flächig mit der Erkennungsstruktur beschichtet, sondern punktförmig auf die Oberfläche gespottet (vgl. Microarrays). Dadurch wird das Referenzieren auf den Hintergrund möglich [17].

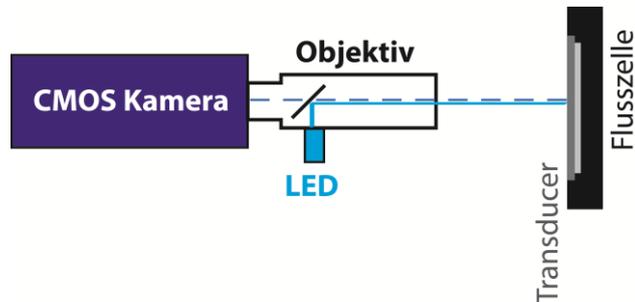


Abbildung 2.4: Funktionsprinzip des iRIFS

Für beide Arten der Reflektometrie, RIFS und 1- λ -Reflektometrie, werden besondere Gläser verwendet. Bei Interferenzglas ist auf ein Glassubstrat aus D263-Glas eine 10 nm dicke Tantalpentoxid-Schicht aufgedampft, worauf wiederum 330 nm Siliciumdioxid aufgedampft sind. Dieser Schichtaufbau ist optimiert für die Einstrahlung von Weißlicht, da hier bei Messungen in Wasser bzw. Puffer eine hohe Reflektivität erreicht wird. Für die 1- λ -Reflektometrie bzw. für iRIFS-Messungen ist ein etwas anderer Schichtaufbau von Vorteil, um eine gute Reflektivität zu erhalten: Auf ein Glassubstrat aus BK7-Glas ist eine 45 nm dicke Tantalpentoxid-Schicht aufgedampft. Auf diese ist wiederum eine zweite aus 20 nm Siliciumdioxid aufgedampft. Gläser zum Referenzieren beider Transducerarten, weisen einen identischen Schichtaufbau auf, bei dem allerdings die oberste Siliciumdioxid-Schicht fehlt.

2.1.4 Fluoreszenz

Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern ist heutzutage in der Analytik, insbesondere in den Biowissenschaften, weit verbreitet. Die Detektion, die entweder in einem System von Natur aus vorhanden ist (intrinsische Fluoreszenz) oder künstlich eingebracht wird (extrinsische Fluoreszenz) ist hoch sensitiv. Dadurch können in vielen Fällen schwierig handhabbare und kostenintensive radioaktive Markierungen durch Fluoreszenzsonden ersetzt werden. Eingesetzt werden diese in den Lebenswissenschaften beispielsweise in der Durchflusszytometrie zur Markierung bestimmter Zellen [18], in der Sequenzierung von DNA [19] und in fluoreszenzbasierten Assays zur Beobachtung biologischer Prozesse und Interaktionen [20].

Lumineszenz beschreibt die Emission von Licht durch eine Substanz. Um Licht zu emittieren, muss ein Molekül zunächst in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt werden. Die Prozesse, die dabei ablaufen, sind im Folgenden genauer beschrieben.

Eine Änderung der inneren Anregung von Molekülen kann auf drei Arten geschehen: elektronische Anregung, Vibrationsanregung der Atomkerne und Rotationsanregung des Moleküls. Jeder elektronische Zustand kann so in verschiedene Vibrationszustände unterteilt werden. Die Rotation des Moleküls spielt dabei eine geringe Rolle. In der Quantenmechanik können nur diskrete Zustände eingenommen werden.

Diese werden in Form einer Wellenfunktion dargestellt. Mithilfe des Franck-Condon-Prinzips lassen sich Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Übergangs zu den verschiedenen Schwingungszuständen des elektronisch angeregten Moleküls treffen. Der Übergang eines Elektrons vom Grundzustand in den angeregten Zustand (vibronische Anregung) ist umso wahrscheinlicher, je größer das Überlappungsintegral der Wellenfunktionen ist [21]. Die Relaxation des angeregten Zustandes kann durch verschiedene Prozesse geschehen. Diese sind im Jablonski-Termschema veranschaulicht, das in Abbildung 2.5 gezeigt ist.

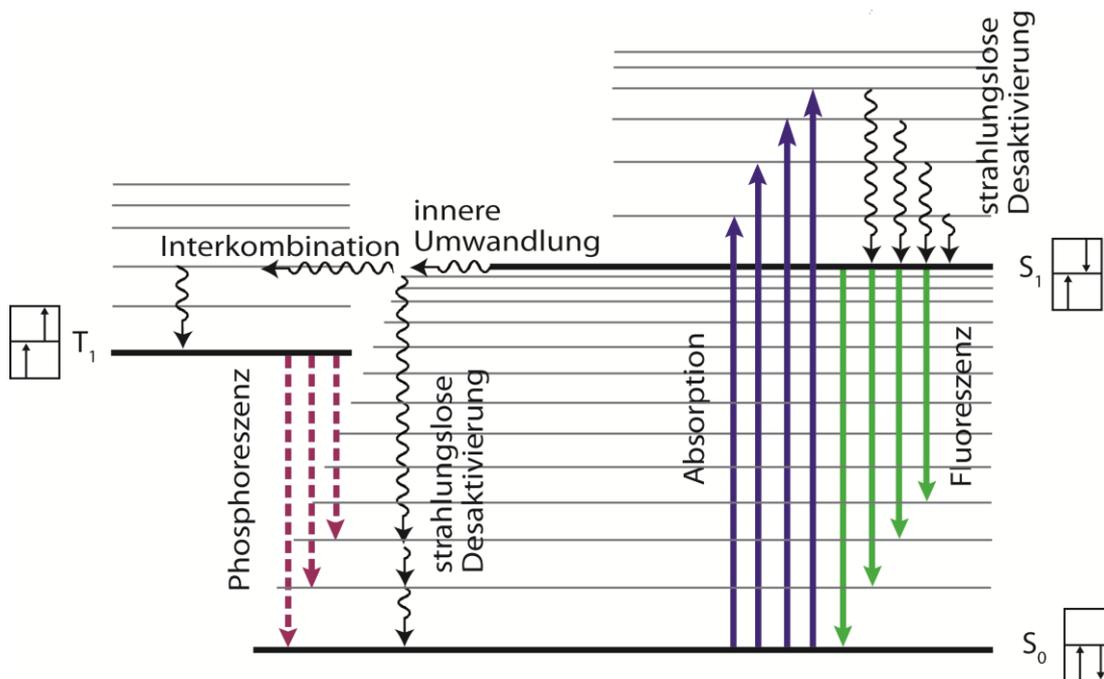


Abbildung 2.5: Jablonski Termschema mit den Prozessen Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Durch die Absorption von Licht gehen Valenzelektronen eines Moleküls innerhalb von ca. 10^{-15} s vom Grundzustand (S_0) in einen Schwingungszustand des angeregten Elektronenzustands S_1 bzw. S_2 über [22]. Durch strahlungslose Desaktivierung gelangt das angeregte Molekül sehr schnell (10^{-13} bis 10^{-12} s) in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Systems. Die Energie wird an Moleküle in der Umgebung in Form von Translations-, Rotations- und Schwingungsenergie abgegeben (vibronische Relaxation). Der Grundzustand von S_1 bzw. S_2 ist mit ca. 10^{-11} bis 10^{-7} s vergleichsweise langlebig, weshalb von hier aus mehrere Prozesse möglich sind. Aus dem Schwingungsgrundzustand kann die Relaxation entweder durch eine strahlende Desaktivierung oder strahlungslos erfolgen. Bei der strahlenden Desaktivierung wird der elektronische Grundzustand S_0 durch Emission von Fluoreszenz erreicht. Die Lebensdauer der Fluoreszenz liegt typischerweise im Bereich von 10^{-8} s (10 ns) kann aber bei einigen Fluorophoren auch länger oder kürzer andauern (10^{-11} bis 10^{-7} s). Damit ist die Fluoreszenzemission langsamer als die zuvor genannten Umwandlungen [23]. Bei der Relaxation durch strahlungslose Desaktivierung kommt es zunächst zur inneren Umwandlung (*engl. internal conversion*), bei der eine isoenergetische Umwandlung in einen höheren Schwingungszustand eines tieferliegenden elektronischen Zustands stattfindet. Von hier wird der Grundzustand durch strahlungslose Desaktivierung erreicht. Seltener kommt es zur Interkombination (*engl. Inter system crossing (ISC)*), in dem der Singulettzustand (z.B. S_1) in den Triplettzustand (z.B. T_1) und umgekehrt übergeht. Auch dieser Übergang ist isoenergetisch. Durch strahlungslose Desaktivierung wird der Schwingungsgrundzustand des Triplettzustandes erreicht. Bei der folgenden strahlenden

Desaktivierung spricht man von Phosphoreszenz. Da die Spintumkehr quantenmechanisch einen verbotenen Übergang darstellt, ist der angeregte Zustand (Tripletzustand) meist sehr langlebig und dauert 10^{-4} s oder deutlich länger an.

Bei der strahlenden Desaktivierung in Form von Fluoreszenz tritt eine Verschiebung des emittierten Lichts zu höheren Wellenlängen im Vergleich zum absorbierten Licht auf, die Stokes-Verschiebung (*engl. Stokes shift*) genannt wird. Sie kommt durch den Verlust an Energie durch strahlungslose Desaktivierung (zum vibronischen Grundzustand) und durch Lösemittelrelaxation zustande. Eine große Stokes-Verschiebung kann bei der Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen von Vorteil sein. Einerseits kann dadurch störendes Anregungslicht durch passende Filter, die nur für längerwelliges Licht durchlässig sind, vom Detektor ferngehalten werden, andererseits wird die Eigenabsorption des Fluoreszenzlichts durch den Fluorophor so vermindert.

Neben der Lebensdauer ist die Quantenausbeute eines Fluoreszenzfarbstoffs ein wichtiges Charakteristikum. Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl der emittierten Photonen zu der Anzahl der absorbierten Photonen. Farbstoffe mit einer Quantenausbeute nahe 1 zeigen eine sehr helle Fluoreszenz. Fluorophore können in drei Gruppen eingeteilt werden: organische Fluoreszenzfarbstoffe, biologische Fluoreszenzfarbstoffe und Quantenpunkte [24]. Beispiele für organische Fluoreszenzfarbstoffe sind Xanthenfarbstoffe wie Fluorescein oder Rhodamin oder Phenoxazinfarbstoffe, wie Nilblau. Vorteil dieser kleinen Moleküle ist, dass sie als Fluoreszenzmarker z.B. für Antikörper eingesetzt werden können und dabei die Wechselwirkung zum Antigen nur wenig beeinflussen. Biologische Fluorophore, wie GFP (green fluorescent protein) lassen sich relativ einfach durch Einschleusen eines Plasmids in Bakterien oder Zellen exprimieren. Dadurch können Vorgänge in der Zelle beobachtet werden. Quantenpunkte zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Photostabilität und Quantenausbeute aus, sind aber toxisch.

2.2 Biochemische Grundlagen

2.2.1 Antikörper

Antikörper sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors und kommen in gelöster Form im Körper in relativ hohen Konzentrationen vor. Die fünf wichtigsten Hauptklassen sind die Immunglobuline IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. IgG ist dabei mit Abstand die am häufigsten vorkommende Antikörperklasse. Die Grundstruktur eines IgG-Antikörpers ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Sie besteht aus einer Y-Form mit drei ungefähr gleich großen globulären Proteinabschnitten, die miteinander verbunden sind [25]. Am Stamm befindet sich der Carboxy-Terminus (C-Terminus), an den zwei Armen jeweils Amino-Termini (N-Termini). Die molekulare Masse beträgt ungefähr 150 kDa. Zwei schwere Aminosäureketten (je ca. 50 kDa) sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Eine leichte (ca. 25 kDa) ist wiederum mit einer der schweren Aminosäureketten über eine Disulfidbrücke verbunden. Durch diesen Aufbau ergeben sich zwei identische Antigenbindungsstellen pro IgG-Molekül. An den N-Termini des Immunglobulins befinden sich jeweils die variablen Regionen der leichten Kette (V_L , *engl. Variable region of the Light chain*) und schweren Kette (V_H , *engl. Variable region of the Heavy chain*), die zwischen verschiedenen Antikörpern stark variieren und die die CDR (*Complementary Determining Region*) enthalten, wodurch die Antigenbindung bestimmt wird. Alle weiteren Regionen sind innerhalb der Immunglobulin-Subtypen

konstant (C_L , C_{H1} bis 3, engl. *Constant*). Durch den Verdau mit Proteasen, kann das Antikörpermolekül in Fragmente mit unterschiedlichen Funktionen gespalten werden. Papain spaltet den Antikörper in drei Fragmente, zwei Fab-Fragmente (engl. *Fragment antigen binding*), die den Armen des Y entsprechen und ein Fc-Fragment (engl. *Fragment crystallizable*), das dem Stamm des Y zugeordnet wird. Die Fab-Fragmente sind die funktionelle Einheit zur Erkennung der Antigene, das Fc-Fragment interagiert mit Effektormolekülen und -zellen.

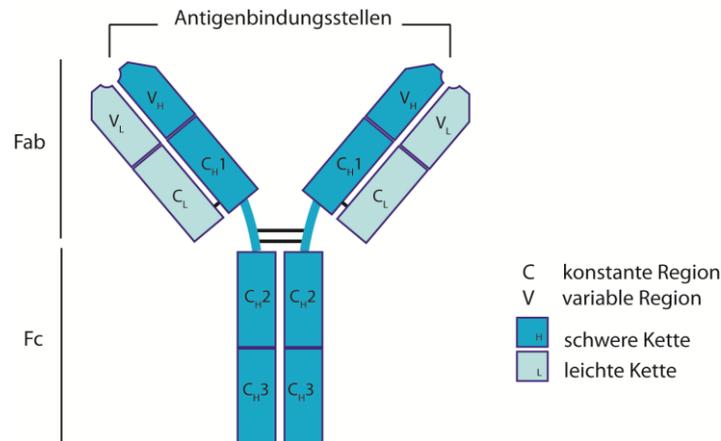


Abbildung 2.6: Struktur eines IgG-Antikörpers: schematische Darstellung

IgM und IgA sind Multimere des IgG, wobei eine zusätzliche J-Kette die Polymerisation der Monomere unterstützt. Zusätzliche Disulfidbrücken stabilisieren die Struktur. IgM-Antikörper werden vor allem in der frühen Phase der Immunantwort gebildet und aktivieren das Komplementsystem. Das IgA-Dimer kommt hauptsächlich in externen Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel in der Muttermilch oder auf Schleimhäuten vor und bildet dort eine Barriere gegen Krankheitserreger.

Für die Produktion von Antikörpern für biochemische Anwendungen gibt es unterschiedliche Verfahren. Bei der Produktion polyklonaler Antikörper werden Tiere immunisiert (z.B. Mäuse, Hasen, Ziegen, Esel oder Schafe), indem ihnen das Antigen injiziert wird. Bei der Immunisierung mit kleinen Molekülen (z.B. Arzneistoffen) ist es häufig notwendig diese zur besseren Erkennung durch das Immunsystem an ein Carrierprotein wie beispielsweise Rinderserumalbumin (BSA) zu koppeln. Im Tier werden daraufhin Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens gebildet. Das Antikörper enthaltende Serum wird meist mithilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt. Eine Mischung verschiedener Antikörper für die Erkennung verschiedener Epitope wird aus dem Serum erhalten. Polyklonal bedeutet, dass die Antikörper von mehreren B-Zell-Klonen gebildet werden. Ein großer Nachteil ist die Heterogenität der gebildeten Antikörper.

Monoklonale Antikörper erkennen nur ein einziges Epitop. Für die Produktion werden hier nach der Immunisierung des Tieres, meist einer Maus, die B-Lymphozyten aus der Milz entnommen. Die B-Lymphozyten werden jeweils mit einer Myelomzelle (Tumor einer Plasmazelle) fusioniert und bilden eine Hybridomzelle. Dadurch wird ein B-Lymphozyt mit begrenzter Lebensdauer potentiell unsterblich und produziert Antikörper. Fusionieren zwei B-Lymphozyten, sterben sie aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer. Bei zwei fusionierten Myelomzellen sind diese gegenüber Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium empfindlich, da ihnen das Gen für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase fehlt, das bei den Hybridomzellen vom B-Lymphozyten beigesteuert wird. Hybridomzellen mit der höchsten Spezifität für das Antigen werden kloniert und kultiviert, sodass große

Mengen an Antikörpern erhalten werden. Jedes Hybridom einer Linie stammt von einem B-Lymphozyten ab und produziert somit dieselben Antikörpermoleküle.

Seltener werden Antikörper gentechnisch mittels Phagen-Display-Bibliotheken hergestellt.

Neben der Spezifität eines Antikörpers für ein bestimmtes Antigen, ist auch die Affinität eine wichtige Eigenschaft. Sie bezeichnet die Bindungsstärke einer einzigen Antikörperbindungsstelle mit einem monovalenten Antigen. Die Gesamtbindungsstärke bei einem Molekül mit mehreren Bindungsstellen, z.B. bei einem IgM-Pentamer, wird Avidität genannt [26,27].

2.2.2 Bindungskinetik

Wechselwirkungen zwischen einem Liganden (im Folgenden Antikörper, Ak) und einem Rezeptor (im Folgenden Antigen, Ag) an der Oberfläche, werden als zwei Teilschritte angesehen. Wie in Abbildung 2.7 gezeigt, spielt einerseits die Geschwindigkeit der Diffusion der Antikörper-Moleküle zur Oberfläche eine Rolle und andererseits die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der Wechselwirkungen der Reaktionspartner.

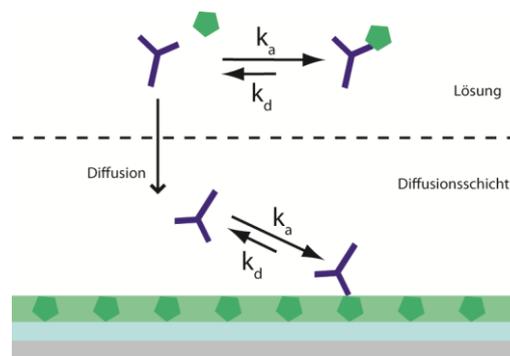
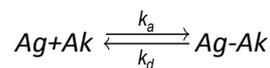


Abbildung 2.7: Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper in homogener und an einer heterogenen Phase. k_a und k_d sind die Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstanten der Bildung bzw. des Zerfalls des Antigen-Antikörper-Komplexes.

2.2.3 Kinetik in homogener Phase

Bei der Wechselwirkung zwischen einem Antigen mit einem Antikörper in homogener Phase kann folgende Gleichgewichtsreaktion aufgestellt werden:



Die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d bezeichnen die Geschwindigkeit der Assoziation bzw. der Dissoziation.

Die Gleichgewichtskonstante K ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz und kann durch Einsetzen der Anfangskonzentrationen an Antigen ($c_{0,Ag}$) und Antikörper ($c_{0,Ak}$) und der Gleichgewichtskonzentration an Antigen-Antikörper-Komplex (c_{Ag-Ak}) berechnet werden. Sie wird auch Affinitätskonstante genannt und ist ein Maß für die Stärke der Bindung zwischen den Bindungspartnern im Komplex.

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{Ag-Ak}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak}} = \frac{c_{Ag-Ak}}{(c_{0,Ag} - c_{Ag-Ak})(c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak})} \quad \text{Gl. 2-14}$$

Durch Umformen und Lösen der quadratischen Gleichung ergibt sich eine sinnvolle Lösung für die Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes:

$$c_{Ag-Ak} = \frac{c_{0,Ag} + c_{0,Ak} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0,Ag} + c_{0,Ak} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0,Ag} \cdot c_{0,Ak}} \quad \text{Gl. 2-15}$$

Die Konzentration an freiem Antikörper lässt sich durch $c_{Ak} = c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak}$ wie folgt berechnen:

$$c_{Ak} = \frac{c_{0,Ak} - c_{0,Ag} - \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0,Ag} \cdot c_{0,Ak}} \quad \text{Gl. 2-16}$$

Durch Messungen bei diffusionslimitierten Bedingungen, die in Abschnitt 2.2.6 näher beschrieben sind, kann eine Titrationskurve für verschiedene Antigenkonzentrationen erstellt werden. Aus dieser lässt sich die Affinitätskonstante K ermitteln. Die Konzentration an freiem Antikörper in der Lösung ist proportional zur Antikörpermenge, die an die Oberfläche gebunden ist [28].

Für IgG-Antikörper mit zwei Bindungsstellen wird für die Besetzung der Antikörper-Bindungsstellen mit Antigen eine Binomialverteilung angenommen. Dabei wird vorausgesetzt, dass die beiden Bindungsstellen unabhängig voneinander sind [29].

$$c_{Ak,v} = \frac{c_{Ag-Ak}^2}{2 c_{0,Ak}} \quad \text{Gl. 2-17}$$

$c_{Ak,v}$ ist die Konzentration an vollständig besetzten Antiköpermolekülen. Solange noch mindestens eine Bindungsstelle des Antikörpers frei ist, kann dieser an die Oberfläche binden. Am Testmittelpunkt ist die Hälfte der Antikörper besetzt. Der Anteil der vollständig besetzten Moleküle beträgt dann ein Viertel der Antikörperbindungsstellen.

$$c_{Ak,v} = \frac{c_{0,Ak}}{4} \quad \text{Gl. 2-18}$$

Die Konzentration an Antigen-Antikörper Komplex am Testmittelpunkt ermittelt sich aus Gl. 2-17 und Gl. 2-18 zu:

$$c_{Ag-Ak TM} = \frac{c_{0,Ak}}{\sqrt{2}} \quad \text{Gl. 2-19}$$

Gl. 2-19 eingesetzt in Gl. 2-15 ergibt für die Affinitätskonstante K [30]:

$$K = \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2} \cdot c_{0,Ag TM} - c_{0,Ak}} \quad \text{Gl. 2-20}$$

$c_{0,Ag TM}$ ist dabei die Antigenkonzentration am Testmittelpunkt.

Bei polyklonalen Antikörpern unterschiedlicher Affinitäten ergibt sich eine mittlere Affinität der verschiedenen Antikörper.

2.2.4 Kinetik an heterogener Phase

Findet eine Wechselwirkung an einer Grenzfläche statt, muss, wie bereits erwähnt, zusätzlich zur eigentlichen Wechselwirkungskinetik auch die Diffusion zur Oberfläche berücksichtigt werden. Der langsamere Schritt dieser beiden Phänomene kann gemessen werden und ist abhängig von der Durchführung der Messung [31].

2.2.5 Kinetisch kontrollierte Reaktionen

Liegt an der Oberfläche wenig gebundener Rezeptor vor und im Verhältnis dazu viel Ligand in der Lösung, so ist die Wechselwirkungskinetik zwischen den Reaktionspartnern an der Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Diffusion zur Grenzfläche ist dabei nicht limitierend. Man spricht von einer kinetisch kontrollierten Reaktion. Bleibt die Konzentration an Rezeptor konstant, zum Beispiel bei Messung im Durchfluss, kann die Beladung der Oberfläche im zeitlichen Verlauf $\Gamma(t)$ durch eine Kinetik *pseudo*-erster Ordnung beschrieben werden:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{k_s \cdot t}) \quad \text{Gl. 2-21}$$

Γ_{GG} ist die Beladung im Gleichgewicht.

Die scheinbare Ratenkonstante k_s ist konzentrationsabhängig und setzt sich aus Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante zusammen:

$$k_s = k_a \cdot c + k_d \quad \text{Gl. 2-22}$$

Die Beladung der Oberfläche im Gleichgewicht ergibt sich aus der Maximalbeladung Γ_{max} der Oberfläche. Als Sorptionsmodell wird die Langmuir-Isotherme zu Grunde gelegt, wobei c die Konzentration an freiem Ligand ist.

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \cdot \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad \text{Gl. 2-23}$$

2.2.6 Diffusionslimitierte Reaktionen

Liegt an der Oberfläche viel gebundener Rezeptor vor und im Verhältnis dazu wenig Ligand in der Lösung, so ist die Diffusion des Liganden zur Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Da jedes

Molekül an Ligand sofort eine Bindungsstelle findet und dann neuer Ligand durch Diffusion nachgeliefert werden muss, stellt sich ein Konzentrationsgradient zwischen Oberfläche und Lösung ein. Eine an Ligand verarmte Diffusionsgrenzschicht entsteht.

Bei Messung im Durchfluss ist der Massentransport J_D des Liganden zur Oberfläche nach dem ersten Fick'schen Gesetz proportional zum Konzentrationsgradienten:

$$J_D = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad \text{Gl. 2-24}$$

2.2.7 Testformate

Einige wichtige Testformate sind in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt und werden im Folgenden erklärt.

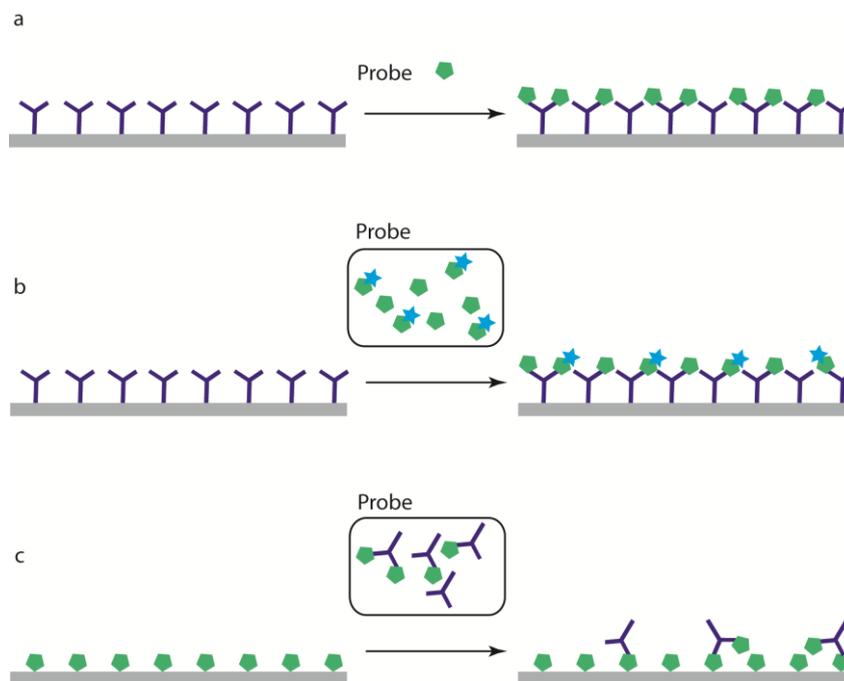


Abbildung 2.8: Assayformate im Vergleich. In a ist das Prinzip des direkten Testformats dargestellt. Der Analyt in der Probe bindet an die Erkennungsstruktur (hier Ak) auf der Sensoroberfläche. In b wird das Prinzip eines kompetitiven Assays gezeigt. Die Probe wird mit einer definierten Menge an markiertem Analyten gemischt. Analyt und markierter Analyt konkurrieren um die Bindungsstellen auf der Oberfläche. In c ist der Bindungsinhibitionstest veranschaulicht. Die Probe wird mit einer definierten Menge an Antikörper vorinkubiert. Nur Antikörper, die noch mindestens eine freie Bindungsstelle besitzen, binden an das an der Oberfläche immobilisierte Analytderivat.

2.2.7.1 Direktes Testformat

Beim direkten Testformat wird die Erkennungsstruktur auf der Oberfläche immobilisiert. Die Probe, die den Analyt enthält, wird über die Oberfläche geführt und die Anbindung direkt gemessen. Das Bindungssignal ist proportional zur Analytkonzentration [32].

Dieses Testformat ist für den Einsatz bei markierungsfreien Immunoassays für relativ große Analyten (>>1000 Da) geeignet, da nur geringe Änderungen an der Sensoroberfläche auftreten. Bei kleinen Analyten eignen sich die im Folgenden beschriebenen Testformate.

2.2.7.2 Bindungsinhibitionstest

Beim Bindungsinhibitionstest wird der Analyt bzw. ein Derivat des Analyten auf der Oberfläche immobilisiert. Die Probe wird mit einer definierten Konzentration an Antikörper vorinkubiert. Die Antikörper binden an den Analyt in der Probe. Anschließend wird die vorinkubierte Probe über die Oberfläche gegeben, wobei nur noch freie Antikörper (bei IgG mit ein oder zwei freien Bindungsstellen) mit der Oberfläche wechselwirken. Der Arbeitsbereich dieses Testformats ist durch die Anzahl der Bindungsstellen der eingesetzten Antikörper vorgegeben. Das Signal ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration der Probe.

2.2.7.3 Kompetitives Testformat

Beim kompetitiven Testformat wird der Analyt wie beim Bindungsinhibitionstest indirekt bestimmt. Zur Probe wird eine definierte Menge an markiertem Analyt zugesetzt und sofort über die Oberfläche gegeben. Analyt und markierter Analyt in der Probe konkurrieren um die Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers an der Oberfläche. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz ist die Menge an gebundenem markiertem Analyt abhängig von der eingesetzten Menge an markiertem Analyt und Analyt in der Probe. Außerdem bestimmen die Affinitäten der beiden Spezies das Verhältnis, in dem diese an den Antikörper binden. Auch hier ist das Bindungssignal umgekehrt proportional zur Analytkonzentration in der Probe [33].

2.2.7.4 Kalibrierung von Immunoassays

Typische Kalibrierkurven von Immunoassays zeigen einen sigmoidalen Verlauf und lassen sich mit folgendem 4-Parameter logistischen Fit anpassen.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad \text{Gl. 2-25}$$

A_1 und A_2 bilden die obere bzw. untere Asymptote, x die Analytkonzentration, x_0 gibt die Analytkonzentration am Wendepunkt (=Testmittelpunkt) an, bei der die Signalhöhe noch 50% des Ausgangssignals beträgt (EC50). Die Variable p definiert die Steigung der Tangente im Wendepunkt. Der Kurvenverlauf ist spiegelsymmetrisch zum Wendepunkt.

Bei Kalibrierkurven mit asymmetrischem Verlauf, führt teilweise die Einführung eines fünften Parameters zu einer besseren Anpassung des Kurvenverlaufs [34].

$$y = \frac{A_1 - A_2}{\left[1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right]^a} + A_2 \quad \text{Gl. 2-26}$$

2.2.8 Matrix 2 (M2)-Protonenkanal des Influenza A-Virus

Laut der Statistik der Gesundheitsberichtserstattung des Bundes starben in Deutschland in den Jahren 2004 bis 2014 pro Jahr ca. 50 bis 300 Menschen an einer Influenza-Infektion [35]. Da oft nicht die Influenza-Infektion sondern eine Grunderkrankung als Todesursache genannt wird, liegt die tatsächliche Sterblichkeit jedoch mit geschätzten 5 000 bis 15 000 Todesfällen pro Jahr deutlich höher. Trotz Gripeschutzimpfung und antiviraler Arzneistoffe ist die Bekämpfung der Influenza schwierig. Dies liegt vor allem am metastabilen Genom dieses Virus, was zu einer hohen genetischen Variabilität und genetischen Reassortierung verschiedener Influenzastämme führt. Zwei Gruppen von Arzneistoffen sind für die antivirale Therapie der Influenza A zugelassen: M2-Protonenkanal-Inhibitoren (Amantadin und Rimantadin, gezeigt in Abbildung 2.9) und Neuramidase-Inhibitoren (Oseltamivir und Zanamivir). Teilweise mangelnde Wirksamkeit der Neuramidase-Inhibitoren und eine fast vollständige Resistenz der im Umlauf befindlichen Influenza-Viren gegen Amantadin, verlangen nach der Entwicklung neuer Wirkstoffe. Das Verständnis der Wechselwirkung von Amantadin und dessen Derivaten zum Wildtyp des M2-Protonenkanals ist dafür ein wichtiger Ansatz. Die drei am häufigsten vorkommenden Mutanten sind momentan V27A, L26F und S31N, wobei überwiegend S31N vorliegt [36].

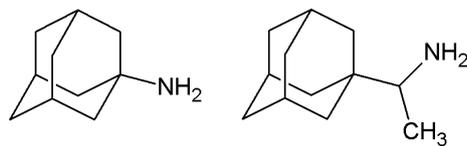


Abbildung 2.9: Aminoadamantan-Derivate aus der Gruppe der M2-Protonenkanal-Inhibitor: Amantadin (links), Rimantadin (rechts)

2.2.8.1 Aufbau und Funktion des M2-Protonenkanals

Das Matrixprotein M2 ist ein Transmembranprotein aus dem Influenza A-Virus bestehend aus 97 Aminosäuren, dessen N-Terminus nach außen und dessen C-Terminus zum Virusinneren gerichtet sind. Vier dieser Proteine lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden einen Protonenkanal. Dieser Protonenkanal ist wichtig für die Replikation der Viren, genauer für das Uncoating der Influenza A-Viren. Der Replikationszyklus kann in mehrere Phasen unterteilt werden: Die Adsorption des Virus an die Zelle über Hämagglutinin, die Penetration in die Wirtszelle durch Endozytose des Virus, das Uncoating, das die Freisetzung der RNA und der Virusproteine beinhaltet, die Transkription der Virus RNA und Translation der viralen Proteine und schließlich der Zusammenbau der Viren und deren Freisetzung [37].

Das Uncoating wird nach der Endozytose des Viruspartikels in die Wirtszelle vorbereitet. Dazu wird zunächst das Hämagglutinin durch eine Serinprotease aktiviert. Der pH-Wert sinkt. Bei einem niedrigen pH-Wert wird das Histidin 37 am M2-Protein protoniert und dieses dadurch aktiviert [38]. Protonen werden ins Virusinnere geschleust. Daraufhin dissoziiert virales Ribonucleoprotein vom Matrixprotein M1. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zur Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomenmembran. Es kommt zur Freisetzung der RNA und der Virusproteine ins Cytoplasma und zum anschließenden Transport in den Zellkern, wo im Folgenden die Transkription und die Replikation des Genoms stattfinden. Außerdem reguliert das M2-Protein den pH-Wert im *trans*-Golgi-Netzwerk und verhindert eine vorzeitige Konformationsänderungen des Hämagglutinins und die damit verbundene Induktion der Fusionsaktivität.

Das M2-Protein kann in vier funktionelle Untereinheiten eingeteilt werden: N-Terminus, Transmembran-Domäne, Cytoplasma-Domäne und C-Terminus. Die Transmembran-Domäne (TM) ist entscheidend für

die Bildung des Tetramers, das Einschleusen der Protonen und die Bindung des Wirkstoffs. Deshalb hat sich für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen M2 und einem potentiellen Wirkstoff ein Peptid aus 27 Aminosäuren (As 22-46) der Transmembrandomäne als sinnvolles Modell herausgestellt [39]. In Tabelle 2.1 sind die TM-Domänen des M2-Protonenkanals vom Wildtyp Udorn und der Mutante S31N dargestellt.

Tabelle 2.1: Unterteilung des M2-Protonenkanals. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz (blau) besteht aus der TM-Domäne und zwei bzw. drei anschließenden Aminosäuren aus N-Terminus bzw. Cytoplasma-Domäne. Die Resistenzbildung kommt durch eine Punktmutation (Serin→Asparagin) an Position 31 zu Stande.

Typ	N-Terminus (As 1-24)	Transmembran-Domäne (As 25-43)	Cytoplasma-Domäne (As 44-60)	C-Terminus (As 64-97)
Udorn (WT)	... dssd	plvvaa siigilhlil wil	drlf
S31N	... dssd	plvvaa niigilhlil wil	drlf

Vier helikale Peptidstränge lagern sich in einem geeigneten Detergenz (z.B. Dodecylphosphocholin) zu einem Homotetramer zusammen, das die Wirkstoff-Sensitivität des ursprünglichen Proteins besitzt. Die vier Helices bilden dabei ein linkshändiges, paralleles Bündel. Die Stöchiometrie der Bindung zwischen M2TM und Ligand sollte 1:1 sein. Die aus ITC-Experimenten erhaltene Stöchiometrie lässt allerdings vermuten, dass sich nicht aus der gesamten eingewogenen Menge an Peptid durch DPC stabilisierte funktionale Protonenkanäle bilden.

Für M2 sind zwei Konformationszustände bekannt. Einer bei niedrigem und einer bei hohem pH-Wert [40]. Beide Zustände unterscheiden sich in erster Linie im C-Terminus des Proteins. Bei niedrigem pH-Wert (pH 5,5) ist die Konformation des C-Terminus geweitet, bei pH 8 tritt die geschlossene Form auf [41]. Für die Funktion des Protonenkanals sind einige Aminosäurereste entscheidend: Histidin 37 (His37) sorgt für die Weiterleitung der Protonen ins Virusinnere. Tryptophan 41 (Trp41) „bewacht“ den Eingang der Pore. Protonen können bei niedrigem äußerem pH-Wert und vergleichsweise hohem inneren pH-Wert ins Virusinnere gelangen, bei umgekehrt hohem äußerem pH-Wert allerdings nicht mehr zurück strömen. Die Aminosäurereste Val27, Ala30, Ser31 und Gly34 befinden sich an dem Teil der TM-Domäne, die dem N-Terminus zugewandt ist. Dieser Teil der Pore ist mit Wasser gefüllt. Prinzipiell befinden sich in der Pore mehr Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren als Donatoren. Dadurch wird vor allem das Oxonium-Ion sehr gut stabilisiert. Eine Vermutung ist, dass Amantadin und Rimantadin, durch ihre positiv geladene Ammoniumgruppe ein analoges Substrat zu den Oxonium-Ionen bilden [42]. Molekulardynamische Simulationen zeigen, dass die Ammoniumgruppe des Amantadin von vier Wassermolekülen umgeben ist. Das Hydratwasser ist durch Carbonylgruppen des Ala30 stabilisiert [43].

2.2.8.2 Blockade des Protonenkanals durch Amantadin

Die Blockade des M2-Protonenkanals durch Amantadin wurde vielfach untersucht. Mittels Kristallstrukturanalyse und Simulationen konnte die Bindung von Amantadin in der Pore des Protonenkanals modelliert werden. Daraus geht hervor, dass die Inhibition des Protonenkanals aufgrund der positiv geladenen Aminogruppe elektrostatisch durch den Aufbau einer Potentialbarriere geschieht

[44]. Der hydrophobe Adamantanrest spielt für die Protonenweiterleitung keine Rolle. Ob die Aminogruppe des Amantadin bei der Bindung zum C-terminalen Ende (amine-down) oder zum N-terminalen Ende der Pore zeigt (amine-up), ist nicht vollständig geklärt [45]. Simulationen lassen vermuten, dass die Aminogruppe frei rotiert und erst eingeschränkt wird, sobald sie durch die Aminosäurereste Ser22 und His37 eingeschränkt werden. Die Rotationsfrequenz wird dadurch langsamer. Zwischen Val27 und Gly34 überwiegt vermutlich die Orientierung zum Aminoende, ab His37, die Orientierung zum Carboxyende, damit die geladene Aminogruppe so weit wie möglich vom geladenen Histidin entfernt ist [44]. Molekulardynamische Simulationen zeigen außerdem, dass es weitere niedriger-affine Bindungsstellen außerhalb der Pore gibt [46].

Resistenzen gegenüber Amantadin bzw. Rimantadin können durch Mutation einzelner Aminosäuren auftreten. Die Bindungstaschen für die Arzneistoffe sind hier größer als beim Wildtyp. Bei Mutationen an Position 30 und 31, geht die Affinität zum Arzneistoff vollständig verloren. Die ursprünglichen Aminosäurereste werden gegen größere und polarere Reste ausgetauscht. Mutationen an Position 27 geschehen durch den Austausch durch kleinere Reste. Hier kann der Arzneistoff binden, der Protonentransport wird jedoch nicht behindert [47].

2.3 Therapeutisches Drug Monitoring

Oft kann der Erfolg einer Therapie anhand klinischer Parameter überwacht werden, was zum Beispiel durch Messung des Blutdrucks bei der Einstellung eines Patienten mit Antihypertensiva relativ schnell und einfach durchführbar ist.

Ist ein solcher klinischer Parameter nicht bestimmbar oder ist die Korrelation des Parameters mit dem Therapieerfolg nicht bekannt, so kann der Blutspiegel des Arzneistoffs überwacht werden. Die Voraussetzung für ein sinnvolles Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) ist, dass zwischen der verabreichten Dosis und der dadurch erreichten Konzentration im Blut ein Zusammenhang bestehen muss. Zusätzlich muss ein Zusammenhang zwischen dem Blutspiegel und der Wirkung bestehen. Besonders wichtig ist die Überwachung bei Arzneistoffen, die ein enges therapeutisches Fenster besitzen, da durch Unterdosierung der Therapieerfolg gefährdet wird und durch Überdosierung schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten können. Viele Arzneistoffe werden je nach Patient nach oraler Aufnahme unterschiedlich resorbiert und unterschiedlich metabolisiert. Einige beeinflussende Faktoren sind Alter, Geschlecht, Genetik und physischer Zustand. Bei Patienten mit mehreren Erkrankungen und bei Einnahme mehrerer Arzneistoffe, kann es zusätzlich zu Wechselwirkungen kommen. Wichtige Arzneimittelgruppen, bei denen TDM empfohlen wird sind: Antikonvulsiva, herzwirksame Glykoside, einige Antibiotika, psychotrope Arzneistoffe, zytotoxische Stoffe, Hormone und Immunsuppressiva. Letztere Arzneistoffgruppe wird im Folgenden näher betrachtet.

Für Immunsuppressiva wird ein TDM aus mehreren Gründen empfohlen: Einerseits besitzen diese Arzneistoffe ein sehr enges therapeutisches Fenster. Zu hohe Dosen können zu ernsthaften unerwünschten Wirkungen führen, wie zum Beispiel Nierenfunktionsstörungen, eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte, ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Tumoren, Auffälligkeiten im Blutbild, z.B. Anämie und viele andere [3]. Eine zu geringe Dosis kann zu einer Abstoßungsreaktion des transplantierten Organs führen. Andererseits liegen starke inter-individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik vor. Die

Bioverfügbarkeit variiert von Patient zu Patient genauso wie die anschließende Metabolisierung über Cytochrom P450 (CYP 3A4) in der Leber. Alle Immunsuppressiva weisen aufgrund ihrer hohen Lipophilie eine starke Plasmaproteinbindung auf. Der Anteil an freiem Arzneistoff liegt zum Teil unter 1%. Dadurch kann es, wie beispielhaft in Abbildung 2.10 gezeigt, zu sehr unterschiedlichen Verläufen der Plasmaspiegel kommen. Während ein Patient bei einer verabreichten Dosis Plasmaspiegel im toxischen Bereich entwickelt, liegen die Plasmaspiegel eines anderen Patienten mit derselben Dosis unterhalb des therapeutischen Bereichs.

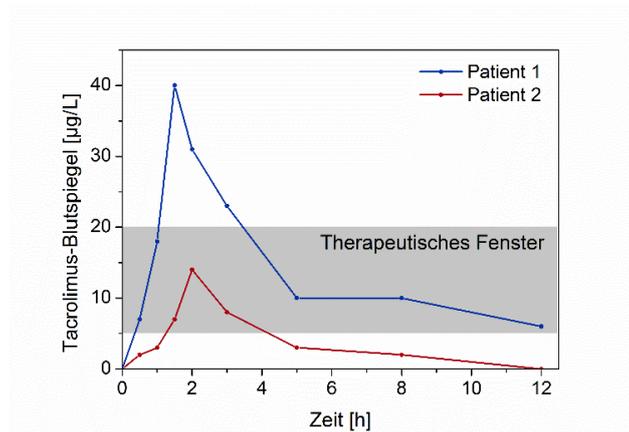


Abbildung 2.10: Therapeutisches Fenster von Tacrolimus: Während die Blutspiegel von Patient 1 zu Beginn vorübergehend im toxischen Bereich liegen, sich dann aber relativ lang im Therapeutischen Fenster befinden, fallen die Blutspiegel von Patient 2 schon nach kurzer Zeit unter den therapeutischen Bereich

Momentan ist es gängig, dass in den ersten Tagen nach einer Organtransplantation 1-2x täglich eine Blutprobe genommen wird und im Zentrallabor der Klinik mittels LC-MS analysiert wird. Auf Grund der sogenannten Talspiegel wird dann die nächste Dosis berechnet und verabreicht. Da der Verlauf der Blutspiegelkurve jedoch von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein kann, wäre es sinnvoll, mehr als nur einen einzigen Wert für die Berechnung der nächsten Dosis vorliegen zu haben. In den letzten Jahren hat sich in mehreren Studien gezeigt, dass bei einigen Immunsuppressiva die Bestimmung der Fläche unter der Blutspiegelkurve wichtige Anhaltspunkte liefert (siehe Abbildung 2.11). Immunoassays ermöglichen eine schnellere und kostengünstigere Alternative zu den LC-MS-Methoden. Wünschenswert wäre allerdings ein Biosensor, der es ermöglicht den Blutspiegel in kurzen Zeitintervallen direkt am Patientenbett zu bestimmen und damit ausführliche Informationen über den Verlauf der Kurve zu erhalten.

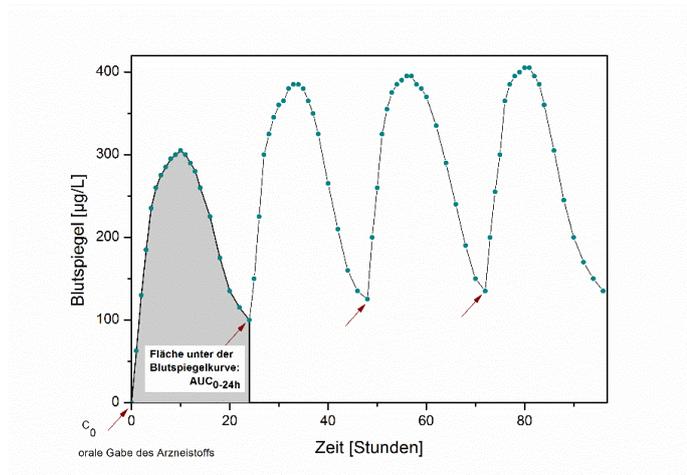


Abbildung 2.11: Verlauf der Blutspiegel eines Arzneistoffs, der alle 24 Stunden oral verabreicht wird. Es kommt zur Kumulation. Ein steady state stellt sich nach etwa fünf Halbwertszeiten ein.

2.4 Immunsuppressiva

Die Hauptaufgaben des Immunsystems bestehen darin, Krankheitserreger zu erkennen, diese einzudämmen oder wenn möglich abzuwehren. Das immunologische Gedächtnis schützt bei einem erneuten Kontakt mit dem Krankheitserreger, da nun dank des erworbenen (adaptiven) Immunsystems eine unmittelbare und starke Immunreaktion ausgelöst wird. Außerdem ist es wichtig für das Immunsystem, sich selbst zu regulieren, um dem Körper keinen Schaden zuzufügen [26].

Zur Abwehr von Krankheitserregern werden vom Immunsystem verschiedene Strategien angewendet. Die angeborene Immunantwort erfolgt sehr schnell nach Kontakt mit dem infektiösen Organismus und wird später durch das adaptive Immunsystem unterstützt, das den entsprechenden Krankheitserreger sehr wirksam bekämpfen kann. Die angeborene Immunität umfasst die Phagozytose von Krankheitserregern durch Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen.

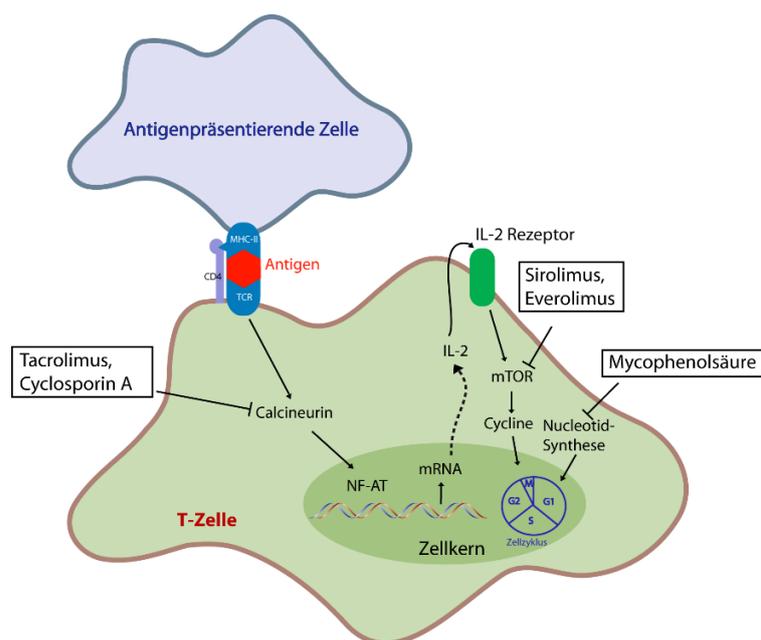
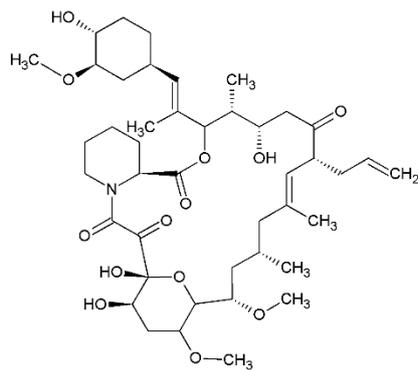


Abbildung 2.12: Wirkmechanismus der Immunsuppressiva (in Anlehnung an [1]).

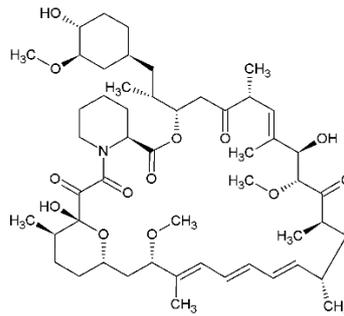
Die spezifische Abwehr von Krankheitserregern geschieht durch die erworbene Immunität. B- und T-Zellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Dem Körper unbekannte Peptide, die aus Proteinen aus intrazellulären Vesikeln stammen, werden von antigenpräsentierenden Zellen über Komplexe mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II, *engl. major histocompatibility complex II*) präsentiert (Abbildung 2.12). Diese Peptide stammen meist aus Bakterien oder Parasiten, die in eine Zelle eingedrungen sind. Eine T-Helferzelle, die CD4-Proteine an ihrer Oberfläche trägt, erkennt über den T-Zell-Rezeptor (TCR) dasselbe Antigen als fremd. Dieser doppelte Mechanismus schützt den Organismus vor einer falschen Erkennung körpereigener Peptide und einer Autoimmunreaktion. Die aktivierte T-Helferzelle aktiviert ihrerseits native B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Alle Zellen, die einen Zellkern besitzen, tragen MHC-I-Proteinkomplexe auf ihrer Oberfläche, MHC-II hingegen kommt nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen vor. MHC-I präsentiert im Gegensatz zu MHC-II Peptide von Proteinen aus dem Cytosol. Somit können Virusproteine präsentiert werden und zytotoxische T-Zellen, die das CD8 Protein tragen, zur Abwehr von Virusinfektionen aktiviert werden.

Spezifische Antikörper bekämpfen den fremden Organismus durch drei verschiedene Mechanismen: Sie neutralisieren ihn und verhindern damit die Wechselwirkung bzw. Infektion benachbarter Zellen. Sie opsonisieren ihn, woraufhin Phagozyten, die die Stammregion der Antikörper erkennen, den Krankheitserreger beseitigen. Außerdem aktivieren sie das Komplementsystem, indem sie Rezeptoren für das erste Protein des Komplementsystems bilden. Das Komplementsystem besteht aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen. Diese blockieren die Oberfläche des Krankheitserregers, dienen zusätzlich der Opsonisierung und ermöglichen dadurch eine effektive Phagozytose.

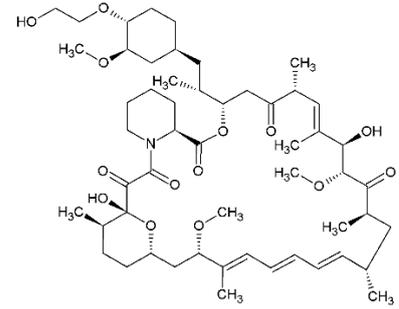
Adaptives und angeborenes Immunsystem arbeiten bei der Abwehr von Krankheitserregern effektiv zusammen. Die in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva greifen in Mechanismen der erworbenen Immunität, vor allem bei der Bildung von B- und T-Zellen, ein. Dies ist in Abbildung 2.12 schematisch gezeigt. Tacrolimus und Cyclosporin A sind zwei Wirkstoffe aus der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Sie binden in der T-Zelle an ein Immunophilin. Tacrolimus bindet an FKBP12 und Cyclosporin A an Cyclophilin. Dieser Komplex hemmt Calcineurin. Dadurch wird die Transkription und damit die Freisetzung von Cytokinen vermindert und damit die Proliferation und Aktivität der T-Zellen. Sirolimus und Everolimus sind strukturell eng verwandt mit Tacrolimus, besitzen aber einen anderen Angriffspunkt in der T-Zelle. Sie bilden einen Komplex mit FKBP12. Dieser inhibiert mammalian/mechanistic target of Rapamycin (mTOR) und greift damit in den Zellzyklus ein. Zusätzlich wird die Cytokin-gesteuerte Proliferation und Aktivität der T-Zellen vermindert. Das Prodrug Mycophenolat-Mofetil wird im Körper zum aktiven Wirkstoff Mycophenolsäure metabolisiert. Mycophenolsäure hat ein anderes Ziel in der T-Zelle als die vorher genannten Wirkstoffe. Sie hemmt reversibel die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, welche an der Guaninmonophosphat-Synthese in der *de novo* Purinsynthese beteiligt ist. Dadurch wird insbesondere die Proliferation von B und T-Zellen vermindert, da andere Zellen Purine über einen gesonderten Salvage-Pathway recyceln können [1].



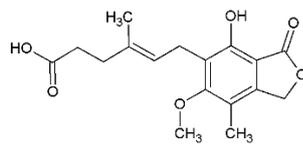
Tacrolimus



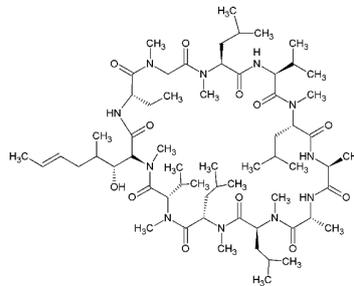
Sirolimus



Everolimus



Mycophenolsäure



Cyclosporin A

Abbildung 2.13: Strukturformeln der Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Mycophenolsäure und Cyclosporin A

Alle in Abbildung 2.13 gezeigten Immunsuppressiva sind Naturprodukte und wurden erstmals aus Bakterien oder Pilzen isoliert. Cyclosporin ist ein cyclisches Dekapeptid und stammt aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum*. Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus gehören zur Gruppe der Makrolidlaktone. Tacrolimus kommt im Bakterium *Streptomyces tsukakaensis* und Sirolimus in *Streptomyces hygroscopicus* vor. Everolimus bzw. 40-O-(2-Hydroxy)ethyl rapamycin ist ein Derivat des Sirolimus, das sich nur an einer Stelle durch eine Veretherung unterscheidet. Die Mycophenolsäure (MPA) war eines der ersten Antibiotika und wurde aus *Penicillium brevicompactum* extrahiert und auf seine Wirkung hin untersucht.

In der Therapie mit Immunsuppressiva, wird oft eine Kombination verschiedener Arzneistoffe mit unterschiedlichen Targets gewählt [48,49]. So kann ein Therapieschema zum Beispiel aus einem Calcineurin-Inhibitor, wie Tacrolimus und einem Purin-Synthese-Hemmer, wie der Mycophenolsäure bestehen. Zusätzlich werden Glucocorticoide, wie zum Beispiel Prednisolon, verabreicht. Seit einigen Jahren ist außerdem mit Basiliximab, ein rekombinanter monoklonaler Antikörper gegen die α -Kette des IL2-Rezeptors (Simulect) [50] zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung nach einer Nierentransplantation zugelassen. Auch hier werden Kombinationen mit Cyclosporin A und Glucocorticoiden, bei Bedarf auch mit Mycophenolsäure, verabreicht. Die Blutspiegel der Glucocorticoide und der therapeutischen Antikörper werden in der Regel nicht überwacht. Durch die Kombination mehrerer Wirkstoffe wird eine effektive Immunsuppression erzielt, wobei die Dosis jedes einzelnen Arzneistoffs so niedrig wie möglich

gehalten wird, um toxische Effekte zu minimieren. Dadurch steigt auch die Anforderung an das Therapeutische Drug Monitoring, da wie in Tabelle 2.2 gezeigt, sehr geringe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden müssen. Zusätzlich zu den Wirkstoffen kommen deren Metabolite im Blut vor. Vor allem bei Immunoassays entsteht dadurch das Risiko von Kreuzreaktivitäten der entsprechenden Antikörper und Miterfassung einiger Metabolite.

Tabelle 2.2: Therapeutische Blutspiegel und geforderte Nachweisgrenzen für die in Abbildung 2.12 gezeigten Immunsuppressiva.

Immunsuppressivum	Therapeutischer Bereich in Vollblut	Geforderte Nachweisgrenze in Vollblut
Cyclosporin A	150-350 µg/L	20 µg/L [51]
Tacrolimus	5-20 µg/L	0,5-1 µg/L [52]
Sirolimus	5-10 µg/L	1 µg/L [53]
Everolimus	3-8 µg/L	0,5-1 µg/L [54]
Mycophenolsäure	1-3,5 mg/L	0,2 mg/L [55]

Anhand der in Abbildung 2.13 gezeigten Strukturformeln wird klar, dass die in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva sehr lipophil sind und damit eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzen. Außerdem steigt bei diesen Arzneistoffen das Risiko für unspezifische Wechselwirkungen mit hydrophoben Oberflächen, beispielsweise während der Probenvorbereitung in Kunststoffbehältnissen oder bei der Messung im mikrofluidischen System.

2.5 Nanomaterialien und Nanopartikel

In den letzten Jahren haben der Einsatz und die Erforschung von Nanomaterialien stark zugenommen. Im Jahr 2011 verfasste die Europäische Kommission erstmals eine Definition von Nanomaterialien, die sich jedoch ausschließlich auf die Größe und nicht auf die zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend erforschten Risiken bezieht:

Ein Nanomaterial wird beschrieben als „ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben.“ [56]

Insbesondere magnetische Nanopartikel finden eine breite Anwendung zum Beispiel bei der gezielten Freisetzung von Arzneistoffen, in der Krebstherapie (Hyperthermie), in der Kernspinresonanztechnik und in Trenntechniken zur Probenvorbereitung vor allem bei biologischen Proben [57]. Aufgrund ihres großen Verhältnisses von Oberfläche- zu Volumenatomen zeichnen sich Nanopartikel durch besondere elektrische, optische und magnetische Eigenschaften aus. Magnetische Partikel werden meist aus Eisen, Kobalt, deren Legierungen oder Oxiden hergestellt. Am weitesten verbreitet sind sogenannte Magnetit-Partikel. Diese Partikel enthalten mit Eisen(II,III)oxid das am stärksten magnetische natürlich vorkommende Mineral.

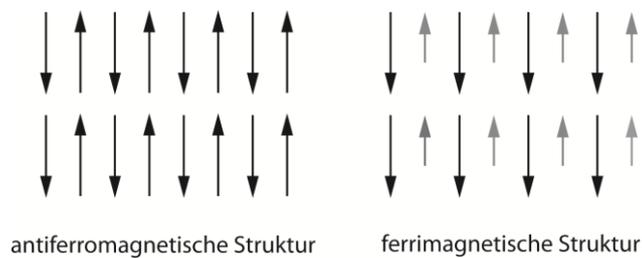


Abbildung 2.14: In einem ferrimagnetischen Kristall heben sich die antiparallel angeordneten magnetischen Momente, im Gegensatz zum Antiferromagneten, nicht vollständig auf

Magnetit besitzt ferrimagnetische Eigenschaften. Wie in Abbildung 2.14 gezeigt ist, heben sich antiparallel angeordnete magnetische Momente nicht vollständig auf. Bei sehr kleinen Partikeln im Bereich kleiner 20 nm tritt super-paramagnetisches Verhalten auf. Die Remanenz beträgt nach Entfernen des externen Magnetfelds Null. Das bedeutet, dass die Partikel dann wieder völlig entmagnetisiert vorliegen [58]. Die Hysteresekurve eines Super-Paramagneten ist in Abbildung 2.15 in Rot eingezeichnet.

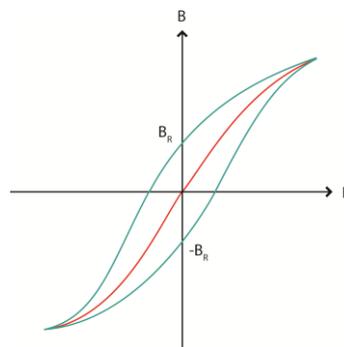


Abbildung 2.15: Die Hysteresekurve eines Ferro-bzw. ferrimagnetischen Systems ist in Grün, die Hysteresekurve eines Super-Paramagneten in Rot dargestellt. H gibt die magnetische Feldstärke, B die resultierende magnetische Flussdichte an. B_R bezeichnet die Remanenz. Bei Super-Paramagneten tritt keine Remanenz auf.

Mittlerweile sind viele verschiedene Arten der Synthese magnetischer Nanopartikel verbreitet [59]. Bei der Co-Präzipitation werden Fe^{2+} und Fe^{3+} -Salze in wässriger Lösung unter alkalischen Bedingungen gefällt. Eine andere Möglichkeit besteht in der thermischen Zersetzung metallischer Vorläufer wie zum Beispiel Metallcarbonylen bei hoher Temperatur und hohem Druck. Durch die Synthese in Mikroemulsionen kann die Größe der magnetischen Nanopartikel gesteuert werden.

Um die Aggregation der einzelnen Partikel zu verhindern, ist es notwendig deren Oberfläche zu stabilisieren. Meist wird dazu ein magnetischer Kern mit Biopolymeren (PEGs, Dextrane, Stärke, Glucosaminoglycan etc.), Kohlenstoff oder Edelmetallen umhüllt. Eine Alternative ist die Einbettung der Magnetkerne in eine inerte Matrix (z.B. Polystyren oder Silica). Die Kupplung von Biomolekülen an die Oberfläche der Partikel kann auf unterschiedliche Art und Weise geschehen: Entweder kovalent über funktionelle Gruppen der verwendeten Biopolymere (z.B. NH_2 oder COOH), über Affinitätsreaktionen (zum Protein G oder anti-IgG zur Kopplung von Antikörpern), oder über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen.

Auch nicht-magnetische Partikel finden Anwendungen in der Bioanalytik, vor allem in optischen Biosensoren und im Fluoreszenz-Imaging lebender Zellen. Eine Vielzahl an Materialien steht dafür zur Verfügung, unter anderem Silica oder organische Polymere, wie Polystyren [60]. Die Partikel können zum Beispiel mit Fluorophoren versehen und mit der entsprechenden Erkennungsstruktur auf der Oberfläche

als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Ist der Fluorophor im Inneren eines Silica-Partikels, wird eine hohe Photostabilität erreicht. Der räumliche Abstand zu Molekülen in der Umgebung minimiert das Auftreten von Quenching [61]. Allerdings neigen Silica-Partikel ohne modifizierte Oberfläche zur Aggregation und zum Ausbilden unspezifischer Wechselwirkungen mit Probenbestandteilen [62].

Übersteigt die Partikelgröße 100 nm handelt es sich streng genommen nach der Definition nicht mehr um Nanopartikel. Auch die superparamagnetischen Eigenschaften gehen bei Magnetit-Partikeln im Bereich zwischen 100 nm und mehreren μm in ferrimagnetische Eigenschaften mit einer gewissen Restmagnetisierung nach Entfernen des externen Magnetfelds über.

Beim Einstrahlen von Licht in Partikelsuspensionen treten außerdem Streueffekte auf. Diese sind stark abhängig vom Verhältnis der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts zur Partikelgröße. Bei Nanopartikeln bis ca. 100 nm kommt es bei Einstrahlung von sichtbarem Licht (ca. 600 nm) zur Rayleigh-Streuung. Die Streueffekte sind stark abhängig von der Wellenlänge des Lichts ($\frac{1}{\lambda^4}$) und vom Durchmesser der Partikel (d^6). Bei kolloidalen Lösungen mit Partikeldurchmessern im Bereich der Wellenlänge des Lichts tritt der durch die Mie-Streuung verursachte Tyndall-Effekt auf. Das eingestrahlte Licht wird seitlich aus der Lösung gestreut. Die Streuung ist schwach wellenlängenabhängig. Partikel, mit mehreren μm Durchmesser zeigen klassische Streueffekte, wie etwa die Brechung des Lichts an einer Kugel [15].

2.6 Thermodynamik

Die Thermodynamik wird auch als Wärmelehre bezeichnet. Sie betrachtet die Energie von Systemen, die sich zum Beispiel in Form von Wärme oder der Fähigkeit, Arbeit zu leisten, ausdrücken. Die Thermodynamik betrachtet makroskopische Systeme und erfasst deren Zustandsänderungen. Atomare Strukturen oder Bewegungen einzelner Atome bzw. Moleküle werden dabei vernachlässigt.

Der nullte Hauptsatz der Thermodynamik beschreibt das thermische Gleichgewicht. Er ist dadurch grundlegend für die folgenden Hauptsätze: Alle Systeme, die sich mit einem gegebenen System im Gleichgewicht befinden, befinden sich auch untereinander im Gleichgewicht.

Der erste Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass die innere Energie U eines isolierten Systems konstant ist. Die Änderung der inneren Energie des Systems geschieht in Form von Arbeit W und Wärme Q , die das System mit seiner Umgebung austauscht.

$$dU = \delta Q + \delta W \quad \text{Gl. 2-27}$$

Die innere Energie ist dabei als Zustandsfunktion vom Weg unabhängig.

Die geleistete Arbeit besteht häufig aus der Volumenarbeit pdV des Systems mit der Umgebung:

$$dU = \delta Q - pdV \quad \text{Gl. 2-28}$$

Bei isochoren Prozessen ($dV=0$) entspricht die Änderung der inneren Energie somit der Änderung der Wärme des Systems.

$$(dU)_v = (\delta Q)_v \quad \text{Gl. 2-29}$$

Bei isobaren Prozessen ($dp=0$) ergibt sich:

$$(dU)_p = \delta Q - pdV \quad \text{Gl. 2-30}$$

Die Enthalpie H wird für isobare Prozesse definiert:

$$\begin{aligned} dH &= dU + dpV && \text{Gl. 2-31} \\ &= dU + pdV + Vdp \\ &= \delta Q_p - pdV + pdV + Vdp \\ &= \delta Q_p + Vdp \\ &= \delta Q_p, (dp = 0) \end{aligned}$$

Auch die Enthalpie ist eine Zustandsfunktion.

Die drei verschiedenen Prozesse zum Austausch von Wärme zwischen dem System und der Umgebung sind möglich:

$dH = 0$: isenthalpisch

$dH > 0$: endotherm

$dH < 0$: exotherm

Die Reaktionsenthalpie ist abhängig von der Temperatur bei der eine Reaktion durchgeführt wird. Durch das Kirchhoff'sche Gesetz kann die aus einer bekannten Reaktionsenthalpie $\Delta_r H$ bei einer Temperatur T_1 , die Reaktionsenthalpie bei einer anderen Temperatur T_2 bestimmt werden. Bei kleinen Temperaturunterschieden kann die isobare Wärmekapazität C_p als konstant betrachtet werden. $\Delta_r C_p$ bezeichnet die Differenz der Wärmekapazitäten der an der Reaktion beteiligten Substanzen.

$$\Delta_r H(T_2) = \Delta_r H(T_1) + \int_{T_1}^{T_2} \Delta_r C_p dT \quad \text{Gl. 2-32}$$

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad \text{Gl. 2-33}$$

Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik trifft Aussagen über die Richtung, in welche ein Prozess abläuft. Dazu wird die Entropie S als neue Größe eingeführt. Diese steigt bei spontanen Vorgängen an.

$$dS_{\text{abgeschlossenes System}} \geq 0 \quad \text{Gl. 2-34}$$

Die Entropie ist definiert als:

$$dS = \frac{\delta Q_{rev}}{T} \quad \text{Gl. 2-35}$$

Bei reversiblen Prozessen ist $dS = 0$, bei irreversiblen ist $dS > 0$.

Durch Einsetzen der inneren Energie bzw. der Enthalpie in Gl. 2-35 wird der Bezug zur Entropie hergestellt:

$$dU = TdS - pdV \quad \text{Gl. 2-36}$$

$$dH = TdS + Vdp \quad \text{Gl. 2-37}$$

Gibbs und Helmholtz führten zur Verknüpfung des ersten und zweiten Hauptsatzes zwei neue Zustandsfunktionen ein, die Freie Energie A (isochore Prozesse) und die Freie Enthalpie G (isobare Prozesse).

$$A = U - TS \quad \text{Gl. 2-38}$$

$$G = H - TS \quad \text{Gl. 2-39}$$

Bei $\Delta G > 0$ ist die Reaktion endergonisch, bei $\Delta G < 0$ exergonisch. Ist $\Delta G = 0$ dann befindet sich das System im Gleichgewicht.

Bei konstanter Temperatur und konstantem Druck, wie es bei vielen Reaktionen im Labor der Fall ist, ergibt sich:

$$dG = dH - TdS \quad \text{Gl. 2-40}$$

Für spontane Vorgänge ist $(dG)_{T,p} \leq 0$.

Die Gleichgewichtskonstante setzt sich, wie in Gleichung Gl. 2-14 beschrieben, aus der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und der Rückreaktion zusammen. Um zwischen den Gleichgewichtskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion unterscheiden zu können, wird die Assoziationskonstante K_A , die meist als eigentliche Gleichgewichtskonstante bezeichnet wird, und die Dissoziationskonstante K_D eingeführt.

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{Gl. 2-41}$$

$\Delta_r G^0$ bezeichnet die freie Standardreaktionsenthalpie. Damit können Systeme beschrieben werden, die sich noch nicht im Gleichgewicht befinden.

Im Gleichgewicht ($\Delta_r G = 0$) gilt:

$$\Delta_r G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K_A \quad \text{Gl. 2-42}$$

R ist die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur.

Die freie Standardreaktionsenthalpie lässt sich auch aus der Standardreaktionsenthalpie und der Standardreaktionsentropie bei einer bestimmten Temperatur berechnen:

$$\Delta_r G^0 = \Delta_r H^0 - T \Delta_r S^0 \quad \text{Gl. 2-43}$$

Die Lage des Gleichgewichts einer Reaktion bei konstantem Druck ist abhängig von der Temperatur. Durch Messungen der Gleichgewichtskonstanten K_A bei verschiedenen Temperaturen, kann über die Van't Hoff'sche Reaktionsisobare die Reaktionsenthalpie bestimmt werden:

$$\left(\frac{\partial \ln K_A}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta_r H^0}{RT^2} \quad \text{Gl. 2-44}$$

2.6.1 Thermodynamische Betrachtungen bei Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor

Bei einem spontanen Bindungsvorgang ist die freie Reaktionsenthalpie immer kleiner 0. Durch diese Größe wird die Stabilität des Rezeptor-Ligand-Komplexes bestimmt, d.h. die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Sowohl die Entropie als auch die Enthalpie tragen zur Bindung zwischen Ligand und Rezeptor bei. Beim enthalpischen Beitrag ist in erster Linie die Spezifität und Stärke bzw. Art der Wechselwirkung entscheidend. In Tabelle 2.3 sind supramolekulare Wechselwirkungen der Stärke ihrer Interaktion nach aufgelistet.

Tabelle 2.3: Übersicht über nicht-kovalente Wechselwirkungen und deren Bindungsstärke [63]

Wechselwirkung	Stärke der Interaktion [kJ/mol]
Ion-Ion	200-300
Ion-Dipol	50-200
Dipol-Dipol	5-50
Wasserstoff-Brücken	4-120
Kation- π	5-80
π - π	0-50
Van-der-Waals	<5, abhängig von der Oberfläche
Hydrophobe	abhängig von Lösungsmittel-Interaktionen

Diese entstehenden und sich lösenden Wechselwirkungen können entweder intramolekular (innerhalb des Rezeptors) oder intermolekular (zwischen Rezeptor und Ligand) auftreten. Der entropische Beitrag setzt sich aus der Dynamik des gesamten Systems zusammen, aus Konformationsänderungen des Proteins

ΔS_{conf} oder Lösungsmittelleffekten ΔS_{solv} , wie Reorganisation oder Ablösung von Hydratwasser und aus einem Verlust an Freiheitsgraden für Translation und Rotation $\Delta S_{r/t}$, bedingt durch die Bildung des Komplexes [64].

$$\Delta S = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r/t} \quad \text{Gl. 2-45}$$

Bei biomolekularen Wechselwirkungen kommt es häufig zu einer Enthalpie-Entropie-Kompensation. Der enthalpische Beitrag zur freien Enthalpie durch Neu-Bildung nicht-kovalenter Wechselwirkungen wird durch entropische Beiträge, wie beispielsweise verminderte Beweglichkeit der Moleküle im Komplex, kompensiert. Vor allem bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist deshalb die Kenntnis des enthalpischen und entropischen Anteils zur freien Enthalpie der Wechselwirkung bedeutend. Ziel ist die Optimierung des enthalpischen bzw. entropischen Anteils, ohne dabei eine zu große Kompensation zu erhalten.

2.6.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Isothermale Titrationskalorimetrie eignet sich sehr gut zur Untersuchung der Prozesse der Wechselwirkung zwischen einem Ligand und dem entsprechenden Rezeptor. Ein Vorteil besteht darin, dass in einem einzigen Experiment sehr viele Informationen erhalten werden: Die Enthalpie, die freie Enthalpie, die Entropie, die Stöchiometrie und die Dissoziationskonstante. Dennoch stellt die ITC die einzige Technik dar, bei der die Enthalpie der Reaktion direkt gemessen und nicht aus anderen Parametern berechnet wird [65]. Durch Messung bei unterschiedlichen Temperaturen kann zudem die spezifische Wärmekapazität berechnet werden. Dabei ist keine Derivatisierung bzw. Markierung eines Reaktionspartners nötig wie bei Fluoreszenzmessungen. Da die Wechselwirkung in homogener Phase stattfindet, ist keine Immobilisierung eines Reaktionspartners an der Oberfläche notwendig. Aus diesem Grund wird die Affinität der Reaktionspartner nicht beeinflusst. Verglichen mit anderen Methoden zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor ist die Sensitivität sehr hoch und unabhängig von der Größe der verwendeten Moleküle. Nachteile der Methode sind lange Messzeiten und vor allem hohe Konzentrationen an Rezeptor bzw. Ligand, die häufig benötigt werden, um ausreichend große Wärmemengen messen zu können. Die Grenzen der ITC liegen in der Bestimmung sehr hoch- oder sehr niederaffiner Systeme. Außerdem wird bei der Bestimmung thermodynamischer Parameter eine globale Betrachtung des Systems vorausgesetzt. Zur Erfassung von Vorgängen auf atomarer Ebene werden ITC-Ergebnisse in Kombinationen mit NMR oder der Röntgen-Kristallstrukturanalyse betrachtet [66].

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie wird eine bestimmte Stoffmenge an Rezeptor vorgelegt und ein Ligand sukzessive dazu titriert. Kommt es zur Bindungsreaktion zwischen Rezeptor und Ligand, so kann die freiwerdende bzw. verbrauchte Wärme bestimmt werden. Aufgrund der erhaltenen Titrationskurven können energetische Betrachtungen der Wechselwirkung angestellt werden. Die Bindungsenthalpie und -affinität, sowie das stöchiometrische Verhältnis der Bindung lassen sich aus der Titrationskurve entnehmen. Daraus lassen sich die freie Bindungsenthalpie und die Bindungsentropie berechnen.

Die Änderung der Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplex $d[LR]$ während des ITC-Experiments ist nach Wiseman et al. [67] proportional zur Änderung der Wärmemenge dQ .

$$dQ = d[LR] \cdot \Delta H^0 \cdot V_0 \quad \text{Gl. 2-46}$$

ΔH^0 ist dabei die Standard Bindungsenthalpie und V_0 das Volumen der Messzelle.

Geht man von einem äquimolaren stöchiometrischen Verhältnis ($n=1$) bei der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor aus, so kann für die Gleichgewichtsreaktion und die Gleichgewichtskonstante formuliert werden:



$$K_A = \frac{[LR]}{[L] \cdot [R]} \quad \text{Gl. 2-48}$$

Folgende Gleichung wird in [67] in mehreren Schritten hergeleitet.

$$\frac{dQ}{V_0 \cdot dL_{ges}} = \Delta H^0 \cdot \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{L_V}{2}}{\sqrt{L_V^2 - 2L_V(1-r) + (1+r)^2}} \quad \text{Gl. 2-49}$$

L_V gibt das Verhältnis zwischen der gesamten Stoffmengen an Ligand und Rezeptor an (L_{ges}/R_{ges}).

Die Konstante r bzw. $1/c$ werden zur Vereinfachung eingeführt:

$$r = \frac{1}{K_A \cdot R_{ges}} = \frac{1}{c} \quad \text{Gl. 2-50}$$

Die registrierte Wärmemenge pro Injektion ist daher stark abhängig von der Enthalpie der Reaktion und der Konstante r bzw. deren Kehrwert $1/c$.

Daraus ist ersichtlich, welche Voraussetzungen für eine aussagekräftige Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand erfüllt sein sollten. Bei einer hohen Enthalpie der Reaktion nimmt die Wärmemenge pro Injektion zu. Durch die Konstante c wird die Form der Titrationskurve beeinflusst. Niedrige c -Werte führen zu einem Abflachen der Kurve, hohe c -Werte zu sehr steilen Kurven. Beides macht eine Auswertung der Messung praktisch unmöglich.

c -Werte im Bereich zwischen 1 und 1000 können bei hochaffinen Systemen nur durch Einsatz einer niedrigen Rezeptorkonzentration erreicht werden. Dadurch sinkt die registrierte Wärmemenge pro Injektion. Die Begrenzung ist hierbei das Rauschen der Messtechnik. Für niederaffine Systeme sollte eine möglichst hohe Rezeptorkonzentration gewählt werden, was zum Teil aus Löslichkeitsgründen, aber auch aus Kostengründen nicht möglich ist.

3 Material und Methoden

3.1 Oberflächenpräparation

Im Folgenden werden Methoden zur Modifizierung der sensitiven Schicht eines Biosensors beschrieben. Das Erkennungselement wird dabei meist kovalent auf einer Abschirmschicht immobilisiert, damit eine spezifische Erkennung des Analyten erfolgt, unspezifische Wechselwirkungen aber vermieden werden.

3.1.1 Glasoberfläche

Die verwendeten Mengen an Lösung richten sich nach der Größe des Glastransducers. Für RIfS-Transducer (ca. 1,2 x 1,2 mm) werden im Sandwichverfahren 12 μ L Lösung verwendet, zur Modifizierung der iRIfS-Transducer im Objektträgerformat 90 μ L. Beim Sandwichverfahren wird die Lösung auf die Oberfläche eines Transducers getropft und ein zweiter mit der zu modifizierenden Seite nach unten darauf gelegt.

3.1.1.1 Reinigung und Aktivierung

Die Oberfläche des Glastransducers wird zunächst zur Reinigung 1 Minute lang in 6 M KOH-Lösung gelegt. Da die Transducer mehrfach verwendet werden, können so Reste der vorherigen sensitiven Schicht entfernt werden. Der Transducer wird nun zuerst mit bidestilliertem Wasser gespült und dann 15 Minuten lang im Ultraschallbad mit frisch angesetzter Piranha-Lösung (96%ige H_2SO_4 /30%ige H_2O_2) im Verhältnis 3:2 (V/V) aktiviert. Die aktivierten Transducer werden gründlich mit Wasser abgespült, im Stickstoffstrom getrocknet und zügig weiterverarbeitet.

3.1.1.2 Silanisierung

Die aktivierte Oberfläche des Transducers wird im Sandwichverfahren mit (3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS) silanisiert. Die Transducer werden dazu in einer trockenen Glaskammer eine Stunde lang mit GOPTS inkubiert, anschließend mit wasserfreiem Aceton gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Auch hier sollte der Transducer zügig weiterverarbeitet werden, um eine Hydrolyse der Epoxidgruppen zu vermeiden.

Je nachdem, welche Moleküle im weiteren Verlauf an die Oberfläche gekoppelt werden sollen, kann statt GOPTS auch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) zur Silanisierung eingesetzt werden. Dadurch werden Amino- statt Epoxidgruppen auf der Oberfläche erhalten. Eine Lösung aus 5% APTES, 5% bidestilliertem Wasser und 90% Ethanol wird auf einen Transducer gegeben und im Sandwichverfahren silanisiert [68]. Nach einer Stunde in einer mit Ethanol dampf gesättigten Glaskammer werden die Transducer zunächst mit Ethanol, dann mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Transducer werden nun 5 Minuten bei 110°C im Ofen erhitzt.

3.1.1.3 Di-Epoxid-Polyethylenglykol

Auf den mit APTES silanisierten Transducern wird eine Lösung aus Di-Epoxid-PEG in DMSO (7,5 mg/mL) getropft und im Sandwichverfahren für 1 Stunde lang in einer mit DMSO-Dampf gesättigten Glaskammer inkubiert. Anschließend werden die Transducer mit DMSO gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.1.1.4 Kupplung von Liganden mit Hydroxy-Gruppe (z.B. Tacrolimus)

Aufgrund fehlender Amino- bzw. Carboxygruppen, werden Liganden, die Hydroxy-Gruppen besitzen, über diese kovalent auf GOPTS bzw. Di-Epoxid-PEG immobilisiert. 12 μL einer Tacrolimus-Lösung in Aceton (1 mg/mL) werden auf den RfS-Transducer getropft und im Sandwich über Nacht in einer trockenen Glaskammer inkubiert.

3.1.1.5 Diamino-Polyethylenglykol (DA-PEG)

Auf den mit GOPTS silanisierten Transducer wird eine Lösung aus Diamino-Polyethylenglykol (MW 2000 g/mol) in Dichlormethan (4 mg/mL) getropft. Der Transducer wird über Nacht bei 70°C inkubiert. Hierbei wird kein Sandwichverfahren verwendet. Der Transducer wird am nächsten Tag in warmes bidestilliertes Wasser gelegt, abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet, um überschüssiges DA-PEG zu entfernen.

Alternativ kann die DA-PEG-Lösung in bidestilliertem Wasser angesetzt und die Transducer über Nacht im Sandwichverfahren in einer mit Wasserdampf gesättigten Glaskammer inkubiert werden.

Über die Aminogruppen können nun Liganden, die eine Carboxygruppe enthalten, gekoppelt werden.

3.1.1.6 Kupplung von Liganden mit Carboxygruppe (z.B. Mycophenolsäure)

Die Carboxygruppe wird über einen Aktivester aktiviert (Abbildung 3.1) und an die Aminogruppe des DA-PEGs gekoppelt (Abbildung 3.2). Dazu wird eine Lösung aus 0,3 mg (0,9 μmol) Mycophenolsäure und 1,5 μL Diisopropylcarbodiimid (DIC) in 10 μL Dimethylformamid (DMF) hergestellt und auf den RfS-Transducer getropft. Im Sandwichverfahren werden die Transducer mindestens 6 Stunden lang in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer inkubiert. Anschließend werden die Transducer mit DMF, dann mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zum Anbinden der Immunsuppressiva Tacrolimus und Cyclosporin A werden mangels einer Carboxygruppe im Molekül Derivate verwendet, bei denen eine solche Gruppe mittels eines Linkers eingeführt wurde.

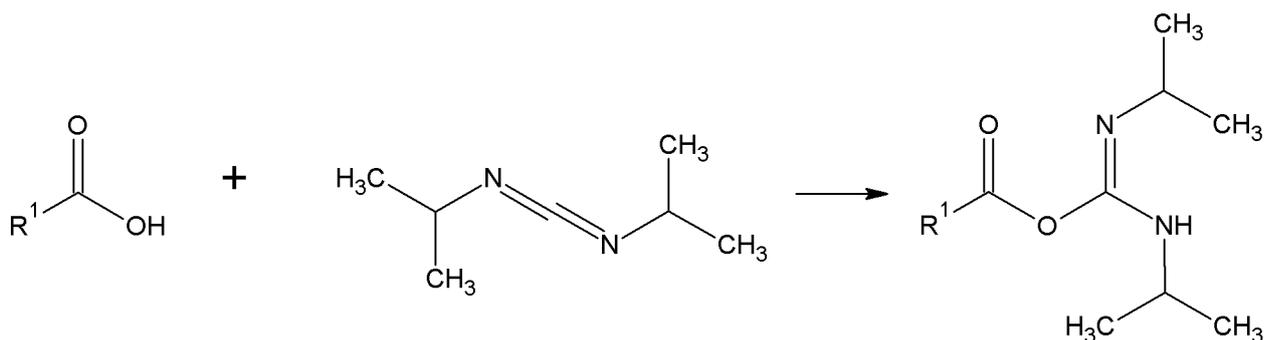


Abbildung 3.1: Aktivierung der Carboxygruppe mit DIC. O-Acylisoharnstoff entsteht.

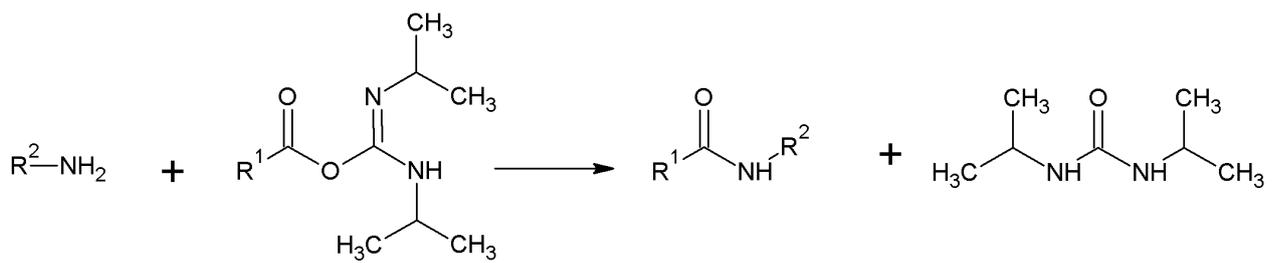


Abbildung 3.2: Reaktion der aktivierten Carboxygruppe mit einer Aminogruppe des DA-PEGs auf der Transducer-Oberfläche. Diisopropylharnstoff wird abgespalten und eine Amidbindung entsteht.

3.1.1.7 Kupplung von Liganden mit Aminogruppe (z.B. Antikörper)

Zur Kupplung von Liganden mit Aminogruppen, wird die Amino-Oberfläche mit Glutarsäureanhydrid (GA) umfunktionalisiert. Eine Lösung aus 2 mg/ μ L GA in DMF wird auf den Transducer gegeben und dieser im Sandwichverfahren in einer DMF-Dampf gesättigten Glaskammer mindestens 6 Stunden lang inkubiert. Anschließend wird erst mit DMF, dann mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die carboxy-funktionalisierte Oberfläche wird nun über die Erzeugung eines Aktivesters aktiviert (Abbildung 3.3). Eine Lösung aus 7,5 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 12 μ L DIC in 38 μ L DMF wird auf die Oberfläche getropft und 4 Stunden lang in einer DMF-Dampf gesättigten Glaskammer inkubiert. Der Transducer wird danach erst mit DMF, dann mit wasserfreiem Aceton gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine Lösung des Antikörpers wird möglichst zügig auf den Transducer getropft, da die Aktiv-Ester-Gruppen hydrolyseempfindlich sind. Aminogruppen des Antikörpers reagieren mit dem Aktivester unter Bildung einer Amidbindung (Abbildung 3.4). Dazu werden bei RfS-Transducern 5 μ L einer Lösung der Konzentration 1 mg/mL aufgetropft und im Sandwichverfahren in einer Wasserdampf gesättigten Glaskammer zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

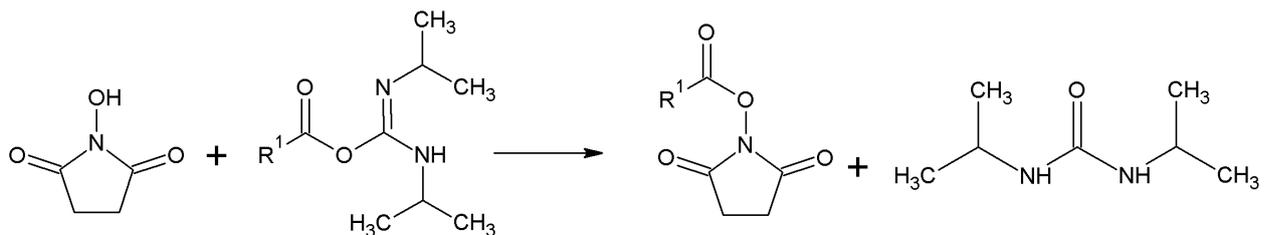


Abbildung 3.3: Die Aktivierung der Carboxygruppe zu einem Aktivester erfolgt wie in Abbildung 3.1 gezeigt. In einem zweiten Schritt ersetzt NHS das Carbodiimid und ein Harnstoff-Derivat wird freigesetzt. Ein zweiter Aktivester entsteht.

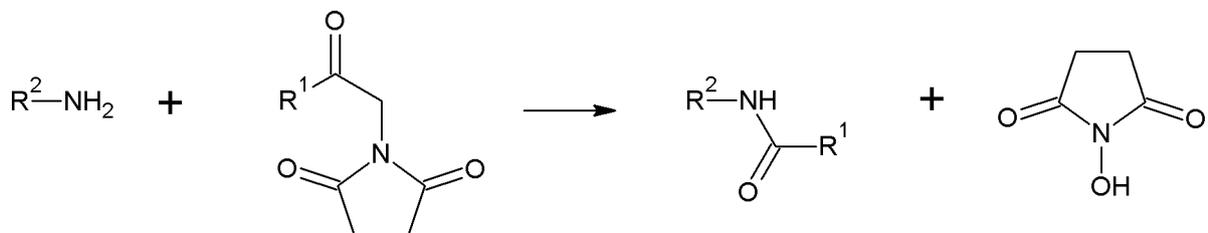


Abbildung 3.4: Bei der Reaktion mit einer Aminogruppe des Antikörpers wird NHS abgespalten und eine Amidbindung entsteht.

3.1.2 Magnetische Partikel

3.1.2.1 Immobilisierung von Antikörpern

Antikörper können über Aminogruppen im Protein kovalent an die Oberfläche magnetischer Partikel gebunden werden (vgl. Abschnitt 3.1.1.7). Carboxygruppen an der Partikeloberfläche werden durch einen Aktivester aktiviert und reagieren mit den Aminogruppen der Antikörper zu einem Amid.

Bei der direkten Immobilisierung der Antikörper werden die Antikörper an beliebigen Aminogruppen des Proteins an die Partikeloberfläche gekoppelt. Dadurch kann es passieren, dass die Antigen-Bindungsregion an der Oberfläche immobilisiert oder sterisch gehindert ist, sodass das Antigen nicht mehr binden kann.

3.1.2.2 Gerichtete Immobilisierung von Antikörpern über rekombinantes Protein A/G

Eine gerichtete Immobilisierung ist über Protein A bzw. Protein G möglich. Diese Proteine erkennen den Fc-Teil eines IgG-Antikörpers und binden ihn. Dadurch zeigen beide Arme des Y-förmigen Antikörpers nach oben und sind frei zugänglich. Protein A kommt ursprünglich in der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* vor und besitzt eine molare Masse von 40-60 kDa. Protein G ist mit 58-65 kDa etwas größer und ursprünglich in der Zellwand verschiedener *Streptococcus*-Stämme zu finden. Protein A bzw. Protein G besitzen jeweils unterschiedliche Affinitäten zu Antikörpern aus verschiedenen Spezies. Rekombinantes Protein A/G vereint Bindungsregionen für den Fc-Teil von Antikörpern aus beiden Proteinen [69].

Für die Immobilisierung von rekombinantem Protein A/G wurde das bereitgestellte Protokoll „Technote 200“ (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU) leicht verändert durchgeführt.

500 µL der Partikel (5 mg) werden zu einer frisch hergestellten Lösung aus 1,5 mg EDC und 3 mg NHS in 125 µL 0,5 M MES-Puffer pH 6,3 gegeben. Der Ansatz wird 45 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss werden die aktivierten Partikel zweimal mit 500 µL PBS gewaschen und in 450 µL PBS suspendiert. 50 µL Protein A/G-Lösung (2 mg/mL) werden dazu pipettiert und 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nun werden die Partikel zweimal mit PBS gewaschen und zum Blocken unter Schütteln 30 Minuten mit 25 mM Glycin-Lösung in PBS inkubiert. Die Partikel werden zum Schluss dreimal mit PBS gewaschen und in 250 µL PBS suspendiert.

125 µg IgG-Antikörper (zum Beispiel MPA-Ak) wird zu den Partikeln gegeben und 20 Minuten lang unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Partikel in PBS suspendiert.

Sie können nun ca. eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.1.2.3 Immobilisierung von Liganden mit Carboxy-Gruppe (z.B. MPA)

500 µL Amino-funktionalisierte Partikel werden dazu zweimal mit DMSO gewaschen, in 410 µL DMSO suspendiert und zu einer Lösung aus 6 mg NHS, 2 mg MPA und 11,7 µL DIC in 90 µL DMSO gegeben. Der Ansatz wird für 3 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird einmal mit DMSO und zweimal mit PBS gewaschen und in 500 µL PBS suspendiert. Die Partikel können mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

In der Kalorimetrie werden ganz allgemein Wärmeänderungen gemessen.

Bei Kalorimetern wird zwischen zwei Bauarten unterschieden, den Einfach- und den Zwillingskalorimetern. In einem Einfachkalorimeter wird die Temperatur in der Messzelle gegen die Umgebungstemperatur gemessen. Das Zwillingskalorimeter hat im Gegensatz dazu eine zweite Messeinheit. Zusätzlich zur Messzelle, die die Probe enthält, wird eine Referenzzelle mit gleicher Wärmekapazität mit einer Referenzsubstanz gefüllt. Der Differenzwärmestrom zwischen Probe und Referenz wird erfasst. Dadurch werden thermische Effekte der Umgebung minimiert und die Sensitivität erhöht. Das Kalorimeter kann in zwei Bereiche unterteilt werden; in das Messsystem und die Umgebung. Je nach Temperatur des Messsystems, der Umgebung und des Wärmewiderstands zwischen Messsystem und Umgebung, werden drei verschiedene Betriebsarten unterschieden. Bei adiabatischem Betrieb findet kein Austausch von Wärme zwischen Messsystem und Umgebung statt. Bei exothermen Prozessen wird die Umgebung beheizt, bei endothermen gekühlt. Der Wärmewiderstand muss dafür sehr groß sein. Beim isoperibolen Betrieb verändert sich die Temperatur der Probe im Laufe der Reaktion. Die Umgebungstemperatur ist dabei konstant, der Wärmewiderstand muss definiert sein. Die Temperaturdifferenz zwischen Messsystem und Umgebung wird erfasst. Wird das Kalorimeter isotherm betrieben, so ist die Temperatur von Messsystem und Umgebung gleich groß und konstant. Der Wärmewiderstand ist sehr klein. Verbrauchte oder freigesetzte Wärme kann dadurch sehr schnell durch die Umgebung ausgeglichen werden. Absolut isothermer oder adiabatischer Betrieb ist in der Praxis nicht zu erreichen.

Wärmeänderungen während der Reaktion können entweder durch Messung der Temperaturdifferenz oder durch Kompensation durch thermoelektrische Effekte erfasst werden. Bei der Kompensationsmessung werden exotherme Effekte durch Kühlung mit Peltier-Elementen, endotherme mit Heizwiderständen kompensiert. Die elektrische Leistung, die aufgebracht werden muss um die thermischen Effekte zu kompensieren, entspricht der Wärmeänderung ΔQ des Systems. Sie ist das Produkt aus der zeitabhängigen Änderung des Stroms I und der Spannung U , integriert im Zeitintervall zwischen t_1 und t_2 .

$$\Delta Q = \int_{t_1}^{t_2} I(t) \cdot U(t) dt \quad \text{Gl. 3-1}$$

3.2.1 Statische und dynamische Kalibrierung

Zu Beginn einer Messreihe, wenn zum Beispiel die Pufferzusammensetzung, die Temperatur oder der Messbereich des Kalorimeters verändert wurden, wird eine statische Kalibrierung durchgeführt. Dabei wird die Messzelle mit einer bestimmten Wärmeleistung beheizt, die dem gewählten Messbereich entspricht. Die registrierte Wärmeleistung am Detektor wird dabei mit der tatsächlichen Wärmeleistung abgeglichen und eingestellt.

Die Messwerte einer Titrationskurve kommen dadurch zustande, dass die Temperatur zwischen Mess- und Referenzzelle immer im Gleichgewicht gehalten wird. Findet in der Messzelle eine Reaktion statt bei

der Wärme verbraucht bzw. frei wird, wird dies ausgeglichen. Die dazu benötigte Leistung (μW) wird als Messsignal aufgezeichnet. Das Kalorimeter reagiert träge auf Temperaturschwankungen (thermische Trägheit), verursacht durch die Wärmekapazität und den Wärmetransport von der Messzelle zum Detektor. Dort wird die Temperaturschwankung registriert und das Kalorimeter reagiert darauf. Vor jeder Messung wird deshalb eine dynamische Kalibrierung durchgeführt, um die Zeitkonstanten des Systems, bestehend aus Kalorimeter und jeweiliger Probe, zu erfassen. Dazu wird die Messzelle direkt hintereinander mit zwei kurzen Pulsen konstanter Wärmeleistung beheizt. Aus dem registrierten Signal werden bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kalorimeter TAM2277 mithilfe der Gl. 3-2 zwei Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 ermittelt.

$$P_{dyn.korr.} = \Phi + (\tau_1 + \tau_2) \frac{d\Phi}{dt} + \tau_1 \cdot \tau_2 \frac{d^2\Phi}{dt^2} \quad \text{Gl. 3-2}$$

Φ bezeichnet dabei die nicht korrigierte Wärmeleistung.

Die bei der Titration erhaltenen Rohdaten werden dynamisch korrigiert, was zu höheren und besser abgegrenzten Spikes führt. So können viele Titrationsschritte in kurzen Zeitintervallen durchgeführt werden.

3.2.2 Auswertung der ITC-Messungen

Für die Auswertung wird die Kalorimeter-Software „Digitam for Windows“ verwendet. Diese führt eine Basislinienkorrektur über den Messzeitraum durch und integriert die Peaks der Titrationskurve. Die erhaltenen Werte (q-Werte) werden mithilfe der Software Origin ausgewertet. Dazu wird zunächst ein Korrekturfaktor für Mischungswärme, die bei jeder Injektion frei wird, von jedem Wert abgezogen und die freigesetzte Wärmemenge pro Injektion auf die injizierte Stoffmenge umgerechnet. Anschließend wird eine nichtlineare Kurvenanpassung nach der im Theorieteil beschriebenen Gl. 2-49 durchgeführt.

Die Anpassungsfunktion für die Auswertung der Wechselwirkung zwischen dem M2TM-Tetramer und den Aminoamantant-Derivaten enthält einen zusätzlichen Parameter b und ist in Gl. 3-3 dargestellt.

$$y = a \cdot \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{x}{b} - r}{2 \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{x}{b} + r\right)^2 - 4 \cdot \frac{x}{b}}} \right) \quad \text{Gl. 3-3}$$

Der Parameter b ist notwendig, da sich die Konzentration an Peptid (Tetramer) nach der Einwaage von der Konzentration an tatsächlich gebildetem M2TM-Tetramer unterscheidet. Nicht alle Peptidstränge lagern sich zu funktionalen M2TM-Tetrameren zusammen. Sowohl die Wechselwirkungsenthalpie ΔH_i als auch die Dissoziationskonstante K_D lassen sich aus den Parametern a , b und r berechnen.

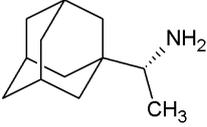
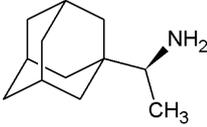
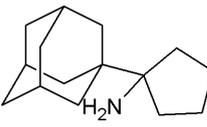
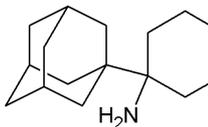
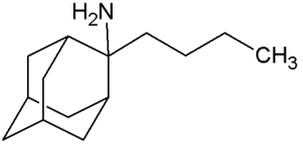
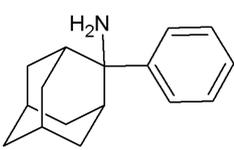
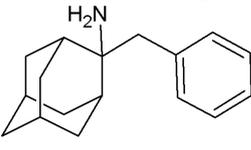
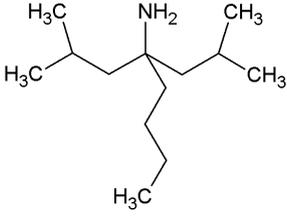
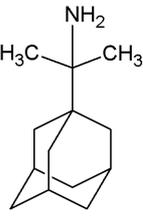
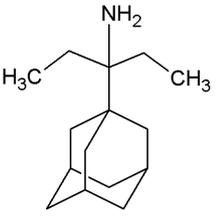
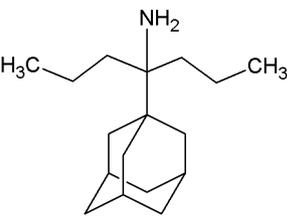
$$\Delta H_i = -a \quad \text{Gl. 3-4}$$

$$K_D = r \cdot b \cdot c_R \quad \text{Gl. 3-5}$$

c_R gibt dabei die experimentell vorgegebene Konzentration an Rezeptor an.

3.2.3 Strukturformeln

Mit Hilfe der ITC wurden die Wechselwirkungen der folgenden Amantadin-Derivate mit dem M2TM-Protein untersucht.

R-Rimantadin	S-Rimantadin	Ligand 35	Ligand 36
HCl 	HCl 	HCl 	HCl 
Ligand 37	Ligand 39	Ligand 40	Ligand 54
Fumarat 	HCl 	HCl 	Fumarat 
Ligand 59	Ligand 60	Ligand 61	
HCl 	HCl 	HCl 	

3.2.4 Durchführung der ITC-Messungen mit dem M2TM

Alle Messungen wurden in Phosphatpuffer pH 8 (siehe Abschnitt 3.6: ITC-Puffer) durchgeführt, da die Inhibition des M2-Protonenkanals in der geschlossenen Form effektiver ist als bei geöffnetem Kanal [70]. Typischerweise liegt die verwendete Rezeptorkonzentration einer ITC-Messung zwischen 10-100 μM . Der Ligand wird bis zum Erreichen eines doppelten Überschusses dazu titriert. Bei Messungen der hier verwendeten Liganden gegen Udorn wurden meist 250 μM des Peptids (Monomer) in frisch zubereiteter DPC-Lösung (6,5 mM) angesetzt. DPC bildet Mizellen aus und stabilisiert so die aus vier Peptidsträngen gebildete Transmembran-Domäne des M2-Protonenkanals. Da die erwartete freigesetzte Wärme bei der Mutante S31N deutlich geringer ausfällt, wurden hier 550 μM Peptid in 22 mM DPC verwendet. Das Peptid wurde durch vortexen und kurze Intervalle im Ultraschallbad gelöst bis eine klare Lösung erhalten wurde. In der Messzelle wurden bei allen Messungen 2 mL Peptidlösung vorgelegt. Die Konzentration des

Liganden lag bei allen Messungen zwischen 0,7 mM und 1,75 mM. Pro Injektion wurden 7,6 μ L der Lösung injiziert, was 5,3-13,3 nmol Ligand pro Injektion entspricht. Insgesamt wurden 19 Injektionen durchgeführt. Vor jeder Messung wurde eine dynamische Kalibrierung, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Nach dieser Kalibrierung wurde abgewartet bis sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte und die Messung dann gestartet. Die Injektionen erfolgten im Abstand von ca. 10 Minuten.

3.3 RIfS-Messungen

Die theoretischen Grundlagen der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) und der 1- λ -Reflektometrie sind in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Für die in dieser Arbeit gezeigten RIfS-Messungen wurde eine automatisierte Fluidik (ASIA) verwendet, die genauso wie der Detektor und die verwendete Lichtquelle in Abschnitt 3.7.2 dargestellt ist. Für die 1- λ -Reflektometrie bzw. iRIfS-Messungen wurde keine automatisierte Fluidik verwendet. Hier wurden Puffer-, Probe- und Regenerationslösung mithilfe einer Peristaltikpumpe über die Flusszelle gepumpt. Der zeitliche Ablauf einer Messung ist in Abbildung 3.5 zu sehen.

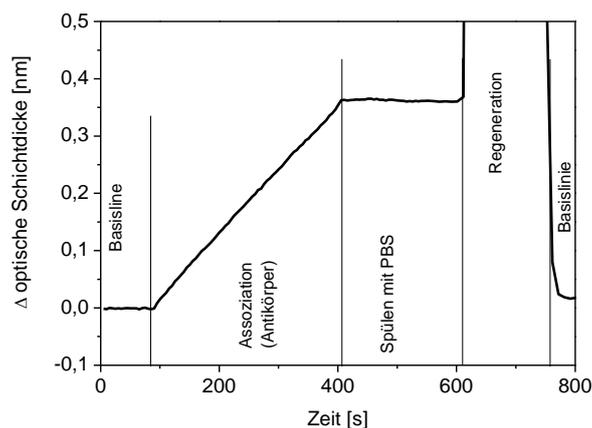


Abbildung 3.5: Ablauf einer RIfS-Messung (Massentransport-kontrollierte Messung)

Der Messablauf setzt sich aus vier Sequenzen zusammen. Zu Beginn wird Puffer über die Transduceroberfläche gespült, danach folgt durch Überleiten der Probe (z.B. Antikörper-Lösung) die Assoziationsphase. Nach der Assoziation wird mit Puffer gespült, wobei es bei niederaffinen Wechselwirkungen zu einer sichtbaren Dissoziation der Probenmoleküle von der Oberfläche kommen kann. Nach Überleiten eines geeigneten Regenerationsmittels und dem erneuten Spülen mit Puffer wird die Basislinie wieder erreicht.

Das Programm MEASURE steuert die ASIA-Fluidik und das Spektrometer. Die Spektren werden durch das Programm IFZ ausgewertet. Für die Auswertung der Bindungssignale wird der der zehnte aufgenommene Wert der Basislinie von jedem Messwert abgezogen.

Das Auslesen der Kamerabilder des iRIfS erfolgte mithilfe einer Routine für das Programm ImageJ (geschrieben von Peter Fechner und David Lämmle). Um die Basislinie auf Null zu setzen, wird in Excel die aktuelle Intensität des auszuwertenden Spots auf den Hintergrund referenziert und im Folgenden der Mittelwert der ersten 100 Messpunkte subtrahiert.

Bei diffusionslimitierten Messungen wird die Steigung des gesamten linearen Signals während der Assoziationsphase für die Auswertung herangezogen, bei kinetisch-kontrollierten Messungen der lineare Teil zu Beginn der Bindungskurve.

3.4 Fluoreszenzmessung

Die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenz sind in 2.1.4 beschrieben. Die in dieser Arbeit gezeigten Fluoreszenzmessungen wurden entweder im Fluoreszenzspektrometer in einer Küvette oder in einem auf Laser-induzierter Fluoreszenz basierenden Aufbau durchgeführt. Der LIF-Aufbau beinhaltet ein mikrofluidisches System, in dem Probe, Puffer und Spüllösungen über die Flusszelle gepumpt werden können.

Bei der Laser-induzierten Fluoreszenz wird ein Fluorophor durch Laserlicht einer Wellenlänge angeregt, die im Absorptionsbereich des Fluorophors liegt, und emittiert daraufhin längerwelliges Fluoreszenzlicht.

Der in dieser Arbeit verwendete LIF-Aufbau ist in der Veröffentlichung von Berner et al. beschrieben [71] und in Abbildung 3.6 gezeigt. Das Laserlicht wird mit einer Wellenlänge von 593,5 nm zu einer Linie aufgefächert und seitlich in die Flusszelle eingestrahlt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt durch Photodioden im Boden der Flusszelle. Anregungslicht wird von emittiertem Fluoreszenzlicht durch einen geeigneten Kantenfilter (Langpassfilter) abgetrennt. Während der Messung werden eventuelle Schwankungen der Laserleistung über einen Strahlenteiler überwacht und das erhaltene Signal somit ständig referenziert. Die Mikrofluidik besteht aus einer Hamilton-Fluidik mit Spritzenpumpen, die über eine Probenschleife mit der Flusszelle verbunden ist.

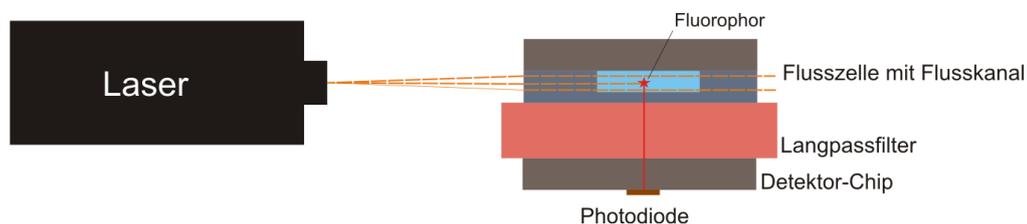


Abbildung 3.6: Schematische Zeichnung des LIF-Aufbaus (in Anlehnung an [71]). Laserlicht wird seitlich in die Flusszelle eingekoppelt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt durch Photodioden unterhalb des Kantenfilters.

3.5 Software

Tabelle 3.1: Verwendete Software

ACD/ChemSketch (Freeware)	ACD/Labs, Version C10E41, 2015
Digitam	SciTech Software AB Thermometric AB, Version 4.1
IFZ	Andreas Brecht & Gerolf Kraus, Version 3.0
ImageJ 1.47	ImageJ, National Institutes of Health
Measure	Gerolf Kraus, Version 8.0
Origin 8.1G	OriginLab, Version 8.1.13.88
Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems

3.6 Chemikalien

Neben den in der folgenden Tabelle 3.2 aufgeführten Chemikalien, wurden Standardchemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Merck (Darmstadt) bezogen. Das zum Abspülen der Transducer verwendete Dimethylformamid (DMF) und Aceton sind von ACS Qualität und das DMF zum Ansetzen der Reaktionslösungen ist nahezu wasserfrei (abs.).

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Lieferant	Abkürzung
Aminodextran (50%)	Innovent e.V., Jena, DEU	AMD
Aminoadamantane und andere M2-Protein-Liganden	AG Prof. Kolocouris, Athen, GRC	
Cyclosporin A	Sigma Aldrich, Steinheim, DEU	CsA
Cyclosporin-COOH Derivat	AG Prof. Orellana, Universidad Complutense de Madrid, ESP	CsA-S-COOH
Diamino-Polyethylenglykol, MW: 2000 g/mol	Rapp Polymere, Tübingen, DEU	DA-PEG
Di-Epoxid-Polyethylenglykol, MW: 2000 g/mol	Nanocs, New York, USA	Di-Epoxid-PEG
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	DIC

1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[carboxy(polyethylenglycol)-2000]	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, USA	DSPE-PEG
Dodecylphosphocholine	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA	DPC
Everolimus	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	EVE
Glutarsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	GA
Guanidiniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	GndCl
(3-Glycidyoxypropyl)-trimethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	GOPTS
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU	NHS
Mycophenolsäure	Alfa Aesar, Karlsruhe, DEU	MPA
Mycophenolsäure-Nilblau-Konjugat	AG Prof. Orellana, Universidad Complutense de Madrid, ESP	MPA-Nilblau
Natriumdodecylsulfat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	SDS
Protein A/G (recombinant, <i>E.coli</i>)	Biomol GmbH, Hamburg, DEU bzw. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	
Rapamycin (Sirolimus)	Alfa Aesar, Karlsruhe, DEU	Sir
S-Rimantadin/R-Rimantadin	Sia "Enamine", Riga, LVA	S-Rim/R-Rim
S31N (C-Amidierung, TFA-Salz)	Centic Biotec, Heidelberg, DEU	
Tacrolimus	Selleck Chemicals/ABSOURCE DIAGNOSTICS GmbH, München, DEU	Tac oder FK506
Tacrolimus-COOH Derivat	AG Prof. Orellana, Universidad Complutense de Madrid, ESP	Tac-COOH
Udorn (C-Amidierung, TFA-Salz)	Centic Biotec, Heidelberg, DEU	

3.6.1 Partikel

3.6.1.1 Core-Shell-Partikel

Bei den hier verwendeten Partikeln unter 500 nm handelt es sich um Core-Shell-Partikel (nanomag-D bzw. fluidMAG). Diese bestehen aus einem Magnetitkern und einer Dextranhülle. Die Dextranhülle wird mit funktionellen Gruppen z.B. Amino, Amino-PEG, Carboxy oder Carboxy-PEG versehen. Über diese funktionellen Gruppen können weitere Moleküle immobilisiert werden.

3.6.1.2 „Meatball“-Partikel

Partikel mit sogenannter „meatball“ Struktur werden bei Experimenten eingesetzt bei denen Partikel der Größen $> 2 \mu\text{m}$ verwendet werden. Hierbei werden meist micromer-M-Partikel verwendet. Hier ist nanoskaliges Eisenoxid in Form von Magnetit in eine Styrol-Maleinsäure-Copolymer-Matrix eingebettet. Abschließend sind die Partikel von einer Polymerschicht umhüllt und genauso wie die Core-Shell-Partikel mit Oberflächengruppen versehen. Auch bei den in einem Experiment verwendeten LodeStar $2,7 \mu\text{m}$ Carboxy-Partikeln handelt es sich um Polystyrolpartikel mit gleichmäßig eingebettetem Eisenoxid und Carboxygruppen auf der Oberfläche.

Tabelle 3.3: Verwendete Partikel

Partikel	Lieferant	Oberfläche
nanomag-D 130 nm (magnetische Dextran-Nanopartikel)	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU	PEG-COOH
nanomag-D 250 nm (magnetische Dextran-Nanopartikel)	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU	PEG-COOH
nanomag-D-spio 50 nm (magnetische Dextran-Nanopartikel)	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU	PEG-NH ₂
LodeStar $2,7\mu\text{m}$, Carboxyl (magnetische Polystyrenpartikel)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	COOH
micromer-M $3 \mu\text{m}$ (magnetische Polystyrolpartikel)	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU	PEG-COOH
micromer-M $3 \mu\text{m}$ (magnetische Polystyrolpartikel)	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, DEU	PEG-NH ₂
fluidMAG-Protein G, 100 nm (magnetische Stärke-Nanopartikel)	Chemicell GmbH, Berlin, DEU	Protein G
ScreenCORE/R-Protein G, $1 \mu\text{m}$ (fluoreszierende Silica-Partikel)	Chemicell GmbH, Berlin, DEU	Protein G

3.6.2 Antikörper

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper

Primärantikörper	
Tacrolimus	Mouse Anti-FK-506, monoklonaler Antikörper (Klon FK1), IgM, AbD Serotec, Puchheim, DEU
	Mouse Anti-FK-506, monoklonaler Antikörper (Klon FK1), IgM, Fitzgerald, North Acton, USA
	Mouse Anti-FK-506, monoklonaler Antikörper (Klon Y12), IgM, AbD Serotec, Puchheim, DEU
Mycophenolsäure	Sheep anti-Mycophenolic acid, polyklonaler Antikörper, IgG, Randox life science, Crumlin, UK
Cyclosporin A	Mouse anti-Cyclosporin A, monoklonaler Antikörper (Klon CSZ2.22), IgG1, GeneTex, Inc., Irvine, USA
	Mouse anti-Cyclosporin A, monoklonaler Antikörper (Klon CSZ2.22, 4A43), IgG1, AbD Serotec, Puchheim, DEU
Sekundärantikörper	
Anti-sheep	Rabbit Anti-Sheep IgG Fc, abcam, Cambridge, UK
	AlexaFluor 647-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
	AlexaFluor 647-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Sheep IgG, Fc fragment specific, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA

3.6.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3.5: Verwendete Lösungen und Puffer

KOH	6 M in Wasser
NaOH	6 M, 1 M in Wasser
Piranha	3:2 (v/v) H ₂ SO ₄ (konz.), H ₂ O ₂ (30%)
ITC-Puffer	100 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8
MES-Puffer	0.5 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, pH 6.3
10 facher PBS	26,8 g Na ₂ PO ₄ ·7 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl 2 g KCl mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt
1 facher PBS	10 fachen PBS mit bidestilliertem Wasser 1:10 verdünnen, pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 einstellen
PBS-T	10 mM PBS, 0,05% Tween (Sigma Aldrich)
GndCl	6 M, pH 1,5
Glycin (zum Blocken)	25 mM in PBS
BSA	10 g/L Rinderserumalbumin in PBS
OVA	10 g/L Ovalbumin in PBS

3.7 Geräte

3.7.1 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Bei der ITC wird einer der Interaktionspartner, der Titrand, in der Messzelle vorgelegt und der andere, auch Titrant genannt, dazu titriert. Die entstehende oder verbrauchte Wärme der Wechselwirkung wird detektiert. Bei dem verwendeten Kalorimeter handelt es sich um das Zwillingsskalorimeter „Thermal Activity Monitoring TAM2277“. Das Kalorimeter wird isotherm betrieben. Die Temperatur der Probe entspricht der Temperatur der Umgebung und wird während des Messprozesses konstant gehalten. Der Messeffekt wird dazu durch Erwärmen oder Kühlung kompensiert (thermoelektrische Kompensation). Die Messungen wurden in einem Mikroreaktionssystem durchgeführt. Der Titrand wurde dazu in einer 4 mL Titrationseinheit (Baureihe 2251-310) vorgelegt, die mit 2 mL befüllt wurde. Der Titrant wurde über eine separate Spritzenpumpe injiziert (6120 Lund Syringe Pump, Thermometric AB, Schweden), die über die Software angesteuert wird. Eine 250 μL Spritze (Hamilton, Schweiz), die mit einer Edelstahlkanüle verbunden ist, wurde dafür verwendet.

3.7.2 RfS

Weißes Licht wird von einer Halogenlampe (12 V, 20 W) mithilfe eines Y-Lichtleiters zu einem Transducer geleitet, der sich in einer Flusszelle befindet. Das reflektierte Licht wird im selben Lichtleiter über den zweiten Arm zum Spektrometer geleitet. Das Diodenzeilen-Spektrometer ermöglicht eine Detektion der Intensität mehrerer Wellenlängen zur selben Zeit. Hierbei werden Wellenlängen zwischen 420 und 750 nm detektiert. Die Probe, Regenerations- und Puffer-Lösungen werden durch eine ASIA-Fluidik zur Flusszelle geführt (Abbildung 3.7). Eine Peristaltikpumpe mit konstanter Geschwindigkeit (Fixpumpe) füllt die Probenschleife. Durch Drehen des 6-Wege-Ventils, kann Flüssigkeit aus verschiedenen Gefäßen entnommen werden. Zur gleichen Zeit pumpt eine zweite Peristaltikpumpe Puffer über die Flusszelle. Bei dieser Pumpe kann die Geschwindigkeit je nach Abschnitt im Messablauf variiert werden (Variopumpe). Durch Schalten des Injektionsventils kann, sobald die Probenschleife befüllt ist, deren Inhalt mithilfe der Variopumpe über die Flusszelle geschoben werden.

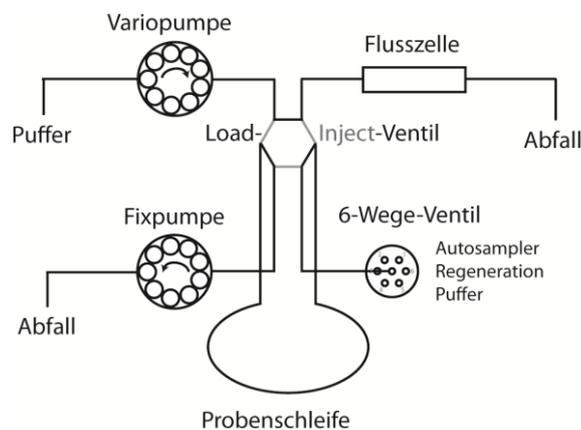


Abbildung 3.7: Schema der ASIA-Fluidik

3.7.2.1 RifS-Komponenten

Tabelle 3.6: Verwendete Komponenten für die RifS

Gerät	Bauteil	Typ	Firma
Weißlicht-RifS	Fluidik	ASIA Fließinjektionsanalyse (FIA)-System	ISMATC GmbH, Wertheim, D
	Flusszelle	aus PMMA, 50 µm eingefräßter Flusskanal, abgedichtet mit O- Ring	Werkstatt Universität Tübingen
	Schläuche	Teflonschlauch (0,8x1,5 mm), Tygon HC-Schlauch (Innendurchmesser: 0,25 mm)	ISMATC GmbH, Wertheim, D
	Diodenzeilen- Spektrometer	Spekol 1100	Analytik Jena AG, Jena, D
	Linsen, Positionieroptik		Spindler und Hoyer, Göttingen, DEU
	Lichtwellenleiter	PMMA, Faser- durchmesser: 1 mm, Y-Faserkoppler (50%/50%)	Laser Components GmbH, Olching, DEU
imaging-RifS	CMOS-Kamera	pco.edge 5.5	PCO, Kelheim, DEU
	Objektiv	Telezentrisches koaxiales Objektiv mit normaler Auflösung	Sill Optics GmbH und Co. KG, Wendelstein, DEU
	LED	Atlas Light Engine, 470 nm	LightingScience, West Warwick, USA
	Peristaltikpumpe	Reglo Digital	ISMATC GmbH, Wertheim, DEU

1- λ -Reflektometrie	Detektor	ESE-LOG USB (ESM001-MB-1033)	Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, DEU
	Peristaltikpumpe	Reglo Digital	ISMATC GmbH, Wertheim, DEU

3.7.2.2 Sonstige Geräte

Tabelle 3.7: Sonstige verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
Bidest-Anlage	PURELAB Classic	ELGA Labwater VWS Dtschl., Celle, DEU
Fluoreszenz-Spektrometer	Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Kalorimeter	Thermal Activity Monitor TAM2277	TA Instruments, New Castle, USA; ehemals Thermometric AB, SWE
Kontaktwinkel-Messgerät	CAM 200	KSV NIMA, Espoo, FIN
Mini-Zentrifuge	Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, DEU
Magnetischer Separator (Partikel $\varnothing < 100$ nm)	OctoMACS™, MS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DEU
Magnetischer Separator (Partikel $\varnothing > 100$ nm)	MagnetoPURE	Chemicell GmbH, Berlin, DEU
pH-Meter	inoLab pH7110	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, DEU
Ultraschallbad	Sonorex Super 10P	Bandelin electronics, Berlin, DEU
UV/Vis-Spektrometer	Lamda 9	Perkin Elmer, Waltham, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage	XS 205 Dual Range	Mettler Toledo, Greifensee, CH
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau, DEU

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Immunoassays in RfS/iRfS

Die in dieser Arbeit verwendeten klassischen Immunsuppressiva sind kleine Moleküle. Mycophenolsäure ist das kleinste mit einer molaren Masse von $320 \frac{g}{mol}$ und Cyclosporin A das größte mit $1020,3 \frac{g}{mol}$. Ein Sandwichassay ist bei Analyten mit einer geringen molaren Masse meist nicht möglich, da keine zwei Bindungsstellen für Antikörper vorhanden sind. Bei einem direkten Assayformat führt die Anbindung eines kleinen Analyten an immobilisierten Antikörpern auf der Sensoroberfläche zu einer sehr geringen Änderung der optischen Schichtdicke, was die Detektion erschwert. Der Bindungshemmtest ist deshalb insbesondere für kleine Moleküle bei markierungsfreier Detektion ein geeignetes Assayformat. Der Analyt in der Probe wechselwirkt mit einer definierten Menge an zugesetztem Antikörper. Daraufhin wird die Anbindung des noch freien Antikörpers an die Oberfläche des Transducers detektiert. Da der Antikörper wesentlich größer ist als der Analyt, ruft dieser eine wesentlich größere Änderung der optischen Schichtdicke hervor als der relativ kleine Analyt.

4.1.1 Tacrolimus

4.1.1.1 Oberflächenchemie: Tacrolimus direkt auf Silan immobilisiert

Zur Immobilisierung eines Moleküls an einer Oberfläche sind funktionelle Gruppen wie freie Thiol-, Amino- oder Carboxygruppen besonders gut geeignet. Tacrolimus verfügt über keine dieser funktionellen Gruppen. Um das Makrolidlaktone dennoch kovalent an der Transduceroberfläche zu immobilisieren, wird es über eine Hydroxygruppe an das Epoxid des GOPTS (Epoxid-Silan) gebunden (vgl. Abschnitt 3.1.1.4).

Um den Erfolg der Immobilisierung zu überprüfen, wird reiner Tacrolimus-Antikörper (Tacrolimus-Ak) als Probe über die Oberfläche geleitet und mit der RfS vermessen. Verwendet wird dafür der in Abschnitt 3.7.2 beschriebene RfS-Aufbau. Der Ablauf einer Messung erfolgt wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

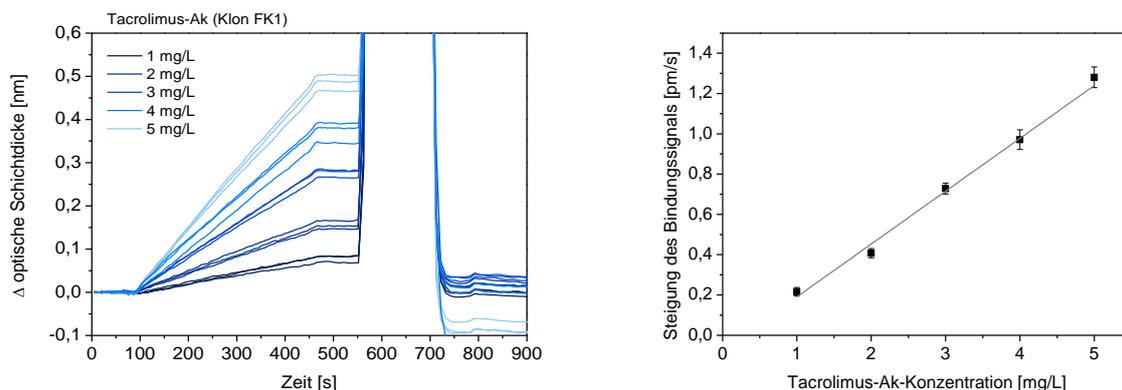


Abbildung 4.1: Konzentrationsabhängige Bindungssignale des Tacrolimus-Antikörpers (Klon FK1) auf der Tacrolimus/GOPTS-Oberfläche (links): Im gemessenen Konzentrationsbereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration und der Steigung des Bindungssignals (rechts).

Wie auf der linken Seite in Abbildung 4.1 zu sehen ist, sind die Bindungssignale dreier aufeinander folgender Messungen reproduzierbar. Zwischen den Messungen wird mit 6 M Guanidiniumchloridlösung

mit einem pH-Wert von 1,5 regeneriert. Guanidiniumchlorid, als chaotrope Verbindung, stört die Wasserstoffbrücken im Wasser und somit die Wasserstruktur. Gelöste Proteine wie zum Beispiel Antikörper werden in Folge dessen denaturiert und können somit von der Oberfläche gespült werden. Der saure pH-Wert unterstützt den denaturierenden Effekt. Die Basislinie nach der Regeneration liegt vor allem nach Messung hoher Antikörperkonzentrationen etwas niedriger als zu Beginn der Messung, was für eine leichte Degeneration der Oberfläche spricht. Das lineare Bindungssignal zeigt, dass die durchgeführten Messungen diffusionslimitiert sind, das heißt, dass die Diffusion des Antikörpers zur Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dies setzt eine hohe Beladung der Oberfläche mit Tacrolimus voraus. Durch die hohe Beladung ist eine leichte Degeneration durch die Regenerationslösung bezüglich der Reproduzierbarkeit nach wenigen Messungen nicht kritisch. Die Signalsteigung ist im Bereich zwischen 1-5 mg/L proportional zur eingesetzten Antikörperkonzentration (siehe Abbildung 4.1 rechts).

Bei markierungsfreien Detektionsmethoden wird jede Wechselwirkung detektiert. Sowohl spezifische als auch unspezifische Wechselwirkungen zur Oberfläche ergeben Bindungssignale. Deshalb ist es wichtig, die Oberflächenchemie so zu wählen, dass möglichst keine unspezifischen, sondern nur spezifische Wechselwirkungen zur Erkennungsstruktur auftreten. Dies kann mit Proteinen wie beispielsweise BSA oder OVA oder mit einem fremden Antikörper überprüft werden, was in Abbildung 4.2 gezeigt ist.

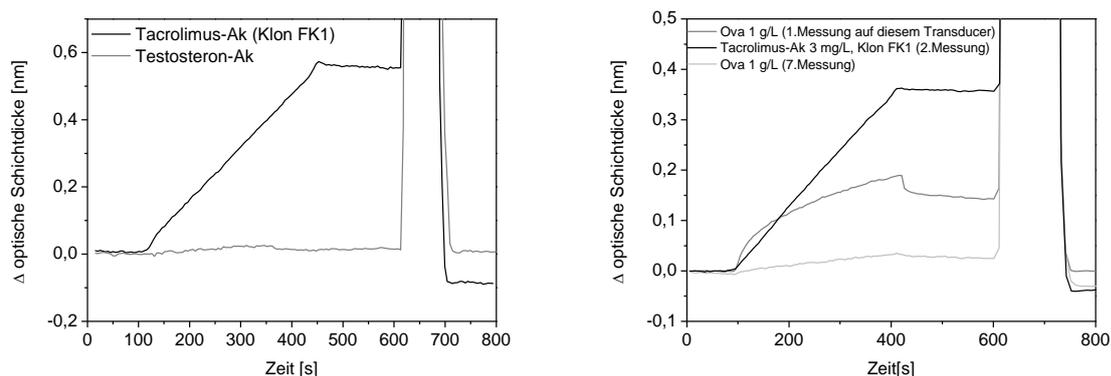


Abbildung 4.2: Untersuchung möglicher unspezifischer Wechselwirkungen an der Oberfläche zweier mit Tacrolimus modifizierter Transducer: Ein fremder Antikörper (Testosteron-Antikörper) zeigt kein Bindungssignal (links); die unspezifische Wechselwirkung von OVA nimmt im Laufe mehrerer Messungen auf einem Transducer ab (rechts)

Über die Oberfläche geleitete IgG-Antikörper (Testosteron-Antikörper) zeigen kaum Wechselwirkungen mit der Tacrolimus-Oberfläche. OVA bindet unspezifisch an die Oberfläche. Nach einigen Messungen nimmt die Stärke der unspezifischen Wechselwirkung deutlich ab. Die OVA-Bindungssignale sind von Transducer zu Transducer sehr unterschiedlich, teilweise ist sogar praktisch keine unspezifische Wechselwirkung zu beobachten. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Chemikalienreste von der Präparation der Oberfläche durch Spülen mit Regeneration nach einigen Messungen abgetragen sind und die unspezifische Wechselwirkung minimal wird. Der Tacrolimus-Antikörper zeigt ein hohes Bindungssignal.

Um gleich zu Beginn einer Messreihe gleichbleibend niedrige unspezifische Wechselwirkungen zu erhalten wurde eine abschirmende Schicht aus Di-Epoxid-Polyethylenglykol als Alternative zur direkten Anbindung von Tacrolimus an GOPTS in Erwägung gezogen.

4.1.1.2 Oberflächenchemie: Tacrolimus via Epoxid-Linker auf Amino-Silan immobilisiert

Tacrolimus wird, wie in Abschnitt 3.1.1.4 beschrieben, über Di-Epoxid-PEG als Linkermolekül an ein Amino-Silan (APTES) immobilisiert. Das eingesetzte Polyethylenglykol dient dazu die Oberfläche vor unspezifischen Wechselwirkungen abzuschirmen. Wie bei der direkten Anbindung von Tacrolimus an das Silan (GOPTS) wird auch hier die Reproduzierbarkeit der Bindungssignale durch dreimaliges Messen der Anbindung des Tacrolimus-Antikörpers an die Oberfläche gezeigt. In Abbildung 4.3 sind die Bindungssignale von BSA und von Tacrolimus-Antikörper dargestellt, die hintereinander über die Transduceroberfläche gespült werden.

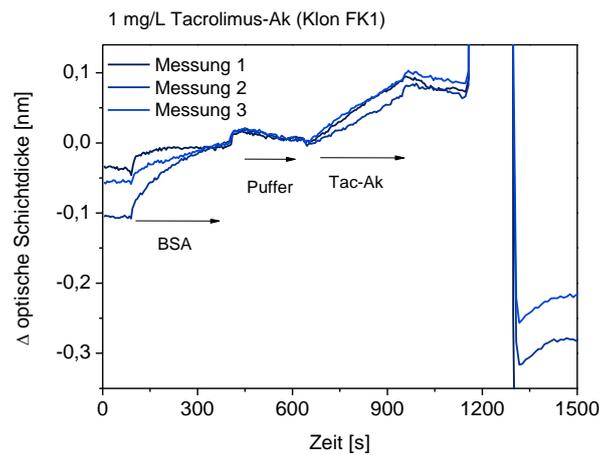


Abbildung 4.3: Bindung von BSA bzw. Tacrolimus-Antikörper an Tacrolimus, das über Epoxid-PEG als Abschirmschicht an der Transduceroberfläche immobilisiert ist.

Die Bindungssignale des Antikörpers sind linear und reproduzierbar, allerdings findet bei der Regeneration mit Guanidiniumchlorid-Lösung ein deutlicher Abbau der Oberfläche statt, was dazu führt, dass die Basislinie nach der Regeneration niedriger liegt als zu Beginn der Messung. Da die Messungen diffusionslimitiert sind, d.h. bei einer hohen Beladung der Oberfläche mit Rezeptor und einer vergleichsweise niedrigen Ligand-Konzentration in der Lösung durchgeführt werden, beeinflusst ein Abbau der Oberfläche die Bindungssignale zunächst nicht. Es stehen Bindungsstellen im Überschuss zur Verfügung. Werden jedoch sehr viele Messungen auf demselben Transducer durchgeführt, kann der stetige Abbau der Oberfläche dazu führen, dass die Anzahl der Bindungsstellen erheblich abnimmt und dadurch schließlich das Bindungssignal. Die unspezifische Wechselwirkung, die hier mit BSA überprüft wurde, ist auch nach Abschirmung mit dem Di-Epoxid-PEG vorhanden. Sie nimmt genauso wie bei der direkten Immobilisierung von Tacrolimus an GOPTS von Messung zu Messung ab.

Die Untersuchungen der direkten Anbindung von Tacrolimus an GOPTS und der Anbindung an Di-Epoxid-PEG über APTES haben gezeigt, dass beide Verfahren geeignet sind, um eine hohe Oberflächenbeladung zu erhalten. Für beide Immobilisierungsstrategien ist keine Derivatisierung des Tacrolimus notwendig, da der Arzneistoff über im Molekül vorhandene Hydroxygruppen immobilisiert werden kann. Das Biopolymer Di-Epoxid-PEG ist zur Abschirmung unspezifischer Wechselwirkungen geeignet, auch wenn eine vollständige Unterdrückung der Wechselwirkung zu BSA nicht gelingt. Dies ist zu erwarten, da Tacrolimus auch im Blut eine starke Albuminbindung aufweist.

Da die Präparation der APTES/Di-Epoxid-PEG-Oberfläche zeitaufwändiger ist als die direkte Immobilisierung von Tacrolimus über das Silan und zudem weniger stabil, ist die direkte Immobilisierung vorzuziehen.

4.1.1.3 Oberflächenchemie: Carboxy-Tacrolimus auf Diamino-PEG immobilisiert

Diamino-PEG wurde bereits häufig zur Abschirmung von Oberflächen eingesetzt [72], [73]. Hierbei ist eine Immobilisierung des Antigens über eine Carboxygruppe im Molekül eine etablierte Methode bei der eine stabile Amidbindung zum PEG entsteht. Durch die Einführung eines Linkers wurde von der AG Prof. Orellana ein Carboxy-Derivat des Tacrolimus synthetisiert, das im Folgenden auf der Oberfläche immobilisiert wird. Das Carboxy-Derivat des Tacrolimus wird über Carbodiimid-Kupplung (vgl. Abschnitt 3.1.1.6) kovalent an der Oberfläche immobilisiert. Die Reproduzierbarkeit des Antikörper-Bindungssignals wird durch Mehrfachmessung reiner Tacrolimus-Antikörper-Lösung gezeigt und ist in Abbildung 4.4 zu sehen.

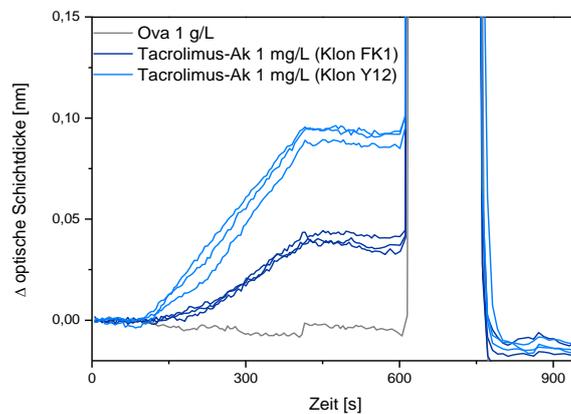


Abbildung 4.4: Bindungssignale der beiden Tacrolimus-Antikörper (Klone FK1 und Y12) zur Tacrolimus/DA-PEG-Oberfläche im Vergleich. OVA zeigt keine unspezifische Wechselwirkung.

Zwei Tacrolimus-Antikörper, die aus verschiedenen Klonen stammen, werden miteinander verglichen. Beide Antikörper werden in der gleichen Konzentration auf dem gleichen Transducer hintereinander vermessen. Das Bindungssignal des Klons Y12 ist höher als das von FK1. Deshalb wurde dieser Antikörper für die folgenden Messungen verwendet.

OVA zeigt keine unspezifische Wechselwirkung zum Transducer. Die Abschirmung der Oberfläche mit DA-PEG ist erfolgreich.

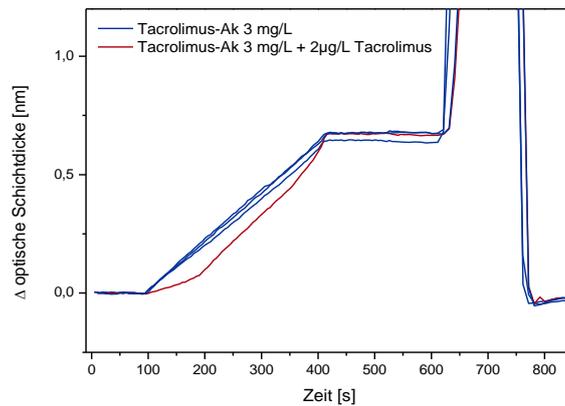


Abbildung 4.5: Das Signal für die Anbindung des Tacrolimus-Antikörpers an die Tacrolimus/DA-PEG-Oberfläche ist reproduzierbar. Ein ungleichmäßiger Kurvenverlauf während der Inhibition ist zu beobachten.

Anhand der blauen Kurven in Abbildung 4.5 lässt sich erkennen, dass die Steigungen der Dreifachmessung reiner Antikörperlösung gleichbleibend hohe Signale mit linearer Steigung liefern. Nach Regeneration mit Guanidiniumchlorid-Lösung wird die Basislinie wieder erreicht. Bei der Inhibition der Antikörperbindung durch Zugabe von Tacrolimus, kommt es allerdings zu einem Knick im Signalverlauf, was in der roten Kurve erkennbar ist. Dies wird möglicherweise durch Wechselwirkungen des Tacrolimus in der Probe mit dem Schlauchmaterial verursacht. Vor allem Verbindungsstücke aus Silikon sind dabei kritisch. Bei der Verwendung der ASIA-Fluidik, fließt die Probe durch viele Schlauchabschnitte, um vom Autosampler in die Probenschleife und schließlich in die Flusszelle zu gelangen. Um die durchflossene Schlauchlänge zu verkürzen, wurden die folgenden Messungen ohne Autosampler und ASIA-Fluidik durchgeführt. Die Probe wurde lediglich mithilfe einer Peristaltikpumpe durch einen 40 cm langen TYGON HC-Schlauch (Polymer auf PCV-Basis) über die Flusszelle gepumpt. Die in dieser Anordnung durchgeführten Messungen zeigen durchweg lineare Signalverläufe bei Zugabe von Tacrolimus zum Antikörper in Form eines Bindungshemmtests. Aus diesem Grund wird diese Fluidik mit verkürzten Schlauchlängen für alle weiteren Tacrolimus-Messungen verwendet.

4.1.1.4 Kalibrierung in Puffer

Um später in einer Probe eine unbekannte Konzentration an Tacrolimus bestimmen zu können, muss der Biosensor kalibriert werden, das heißt die Korrelation zwischen Analyt-Konzentration und dem Signal wird hergestellt. Bei einem Bindungshemmtest wird dazu eine Konzentrationsreihe vermessen. Zu einer definierten Menge an Antikörper werden unterschiedliche Konzentrationen an Tacrolimus gegeben und vor der Messung inkubiert. Jede Konzentration wird dreifach gemessen. Ausreißer, die zum Beispiel durch Luft in der Fluidik verursacht werden, werden für die Auswertung nicht berücksichtigt (siehe Abbildung 4.6).

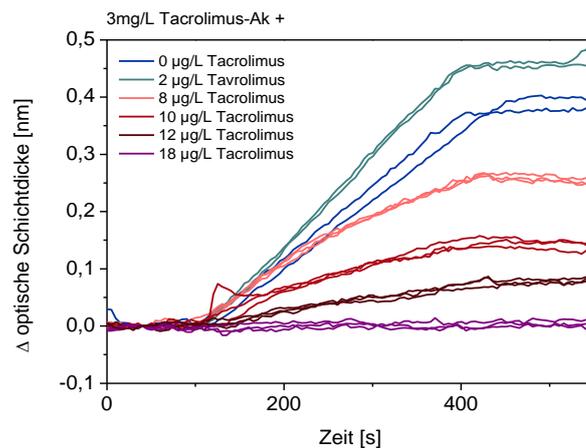


Abbildung 4.6: Bindungssignale des Tacrolimus-Antikörpers bei der Durchführung einer Kalibrierung mittels Bindungshemmtest, je dreifach gemessen

Die Steigung des Bindungssignals wird durch lineare Anpassung des linearen Bereichs ausgewertet. Für jede Konzentration werden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Bei dem Immunoassay für Tacrolimus wird ein IgM-Antikörper verwendet. Da dieser aus fünf IgG-ähnlichen Antikörper-Molekülen zusammengesetzt ist und somit insgesamt zehn Bindungsstellen für Tacrolimus zur Verfügung stehen, ist der Verlauf der Kalibrierkurve bei der Durchführung eines Bindungshemmtests etwas anders als bei der Verwendung eines IgG-Antikörpers. Um eine Anbindung des IgM-Antikörpers an der Transduceroberfläche zu verhindern, müssen hier theoretisch alle zehn Bindungsstellen durch Analyt aus der Probe belegt sein. Bei IgG-Antikörpern sind dazu nur zwei Analytmoleküle notwendig. Dadurch ist es zumindest theoretisch möglich, dass ein IgM-Antikörper mit neun von zehn besetzten Bindungsstellen noch an die Oberfläche bindet. Dieser Antikörper-Tacrolimus-Komplex hat nun aber eine größere molare Masse als reiner IgM-Antikörper (1x IgM + 9x Tacrolimus) und verursacht deshalb in der RIFs eine größere Änderung der optischen Schichtdicke. Dies fällt beim Vergleich der Messungen reiner Antikörper-Lösung und bei Zugabe von 2 µg/L zum Antikörper auf. Wird der Antikörper mit 2 µg/L Tacrolimus inkubiert, ist die Signalsteigung deutlich höher als bei der reinen Antikörper-Lösung.

Beim Bindungshemmtest ergibt die Messung ohne Analyt (Nullmessung) im Normalfall die höchste Steigung. Der Mittelwert dieser Messung dient als Referenzpunkt und wird deshalb auf 100% des relativen Signals gesetzt. Alle weiteren Signale werden auf diesen normiert. Aufgrund des zuvor beschriebenen Effekts wurde die größte Steigung, die in diesem Fall bei einer Tacrolimus-Konzentration von 2 µg/L beobachtet wurde, auf 100% gesetzt.

Der sigmoide Verlauf der aufgetragenen Datenpunkte, kann mit einer logistischen Anpassungsfunktion mit vier Parametern, die in Gl. 2-25 gezeigt ist, gut nachgebildet werden. Die Kalibrierkurve ist in Abbildung 4.7 zu sehen.

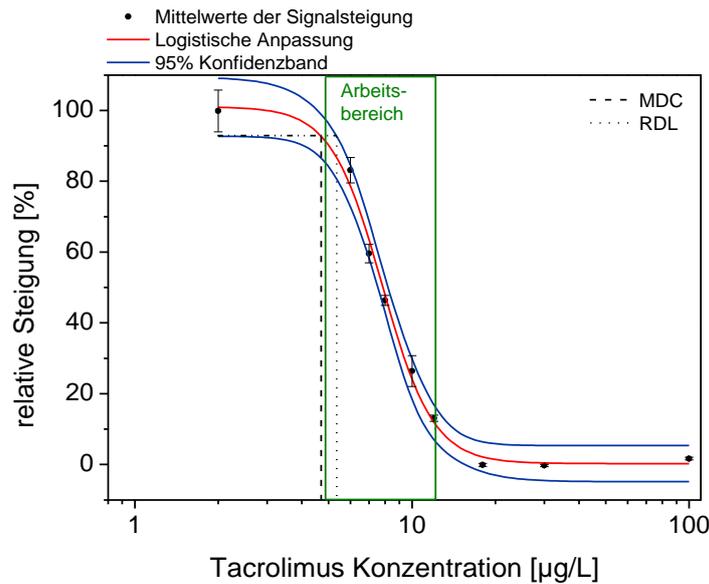


Abbildung 4.7: Bestimmung der Kalibrierfunktion für Tacrolimus mit neun verschiedenen Tacrolimus-Konzentrationen. Die Antikörperkonzentration jeder Probe beträgt 3 mg/L und ist dreifach gemessen.

Der Arbeitsbereich des Immunoassays definiert den Konzentrationsbereich zwischen 10-90% des Signals in der Kalibrierfunktion. LOD (Nachweisgrenze, *engl. limit of detection*) und LOQ (Bestimmungsgrenze, *engl. limit of quantification*) werden rechnerisch ermittelt. Beim LOD wird der dreifache Wert der Standardabweichung, beim LOQ die zehnfache Standardabweichung der Nullmessung von deren Mittelwert abgezogen. Im diesem Fall wird für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze die Standardabweichung der Messung unter Zugabe von 2 µg/L Tacrolimus zum Antikörper herangezogen, da die tatsächliche Nullmessung für die Kalibrierung nicht verwendet wird.

Analog zu LOD und LOQ werden bei Immunoassays in der Diagnostik häufig MDC (*engl. minimum detectable concentration*) und RDL (*engl. reliable detection limit*) angegeben. Diese werden grafisch aus der Kalibrierfunktion abgelesen. Dazu wird eine Tangente an das untere Konfidenzband zu Beginn der Kalibrierung angelegt. Der MDC-Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Tangente mit der Kalibrierfunktion, der RDL-Wert aus dem Schnittpunkt mit dem oberen Konfidenzband.

Die Parameter und die aus der Kalibrierung erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die berechnete Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze liegt bei dem Tacrolimus-Assay bei 5,25 bzw. 6,98 µg/L. Graphisch ergibt sich eine MDC von 4,72 µg/L und ein RDL von 5,38 µg/L. Damit liegt die Nachweisgrenze über der geforderten von 0,5-1 µg/L (siehe Tabelle 2.2).

Der Arbeitsbereich erstreckt sich von 4,9-12,2 µg/L. Damit liegt er ungefähr im Bereich der zu erwartenden Tacrolimus-Spiegel im Vollblut. Verursacht durch die Verwendung des IgM-Antikörpers mit zehn Antigen-Bindungsstellen, ist der Arbeitsbereich relativ schmal. Deshalb ist diese Kalibrierung vor allem im Bereich hoher Tacrolimus-Konzentrationen weniger geeignet. Eine Verdünnung der Probe ist hier von Vorteil, um möglichst innerhalb des Arbeitsbereichs der Kalibrierung zu bleiben.

Tabelle 4.1: Parameter der logistischen Anpassungsfunktion und Kenngrößen der Kalibrierung für Tacrolimus in PBS

A_1 [%]	101,04±3,24
A_2 [%]	0,25±1,99
x_0 [µg/L]	7,81±0,19
p	4,74±0,47
LOD [µg/L]	5,25
LOQ [µg/L]	6,98
MDC [µg/L]	4,72
RDL [µg/L]	5,38
Arbeitsbereich [µg/L]	4,9-12,2

Im Anschluss an die Kalibrierung wird deren Qualität anhand der Bestimmung von Wiederfindungsraten auf einem anderen Transducer bestimmt. Zunächst wird eine Nullmessung mit reiner Antikörper-Lösung durchgeführt. Mindestens drei weitere Konzentrationen an den Rändern und in der Mitte des Arbeitsbereichs werden jeweils dreifach vermessen und das Signal auf die Nullmessung normiert. Aus den erhaltenen Steigungen wird mithilfe der Kalibrierfunktion die Konzentration berechnet. Die berechnete Konzentration wird mit der eingesetzten Konzentration ins Verhältnis gesetzt.

$$WFR = \frac{x_{ist}}{x_{soll}} \quad \text{Gl. 4-1}$$

Die Wiederfindungsraten sollten bei Konzentrationen von ca. 10 µg/kg (ppb) nach der Empfehlung von AOAC International zwischen 70-125 % liegen [74]. Bei dem Tacrolimus-Assay ist vor allem die Bestimmung niedriger Konzentrationen im Arbeitsbereich weniger zuverlässig, da die Wiederfindung vor allem hier von den in der Kalibrierung ermittelten Konzentrationen abweicht. Insgesamt liegen die in Abbildung 4.8 dargestellten Wiederfindungsraten zwischen 97-158%.

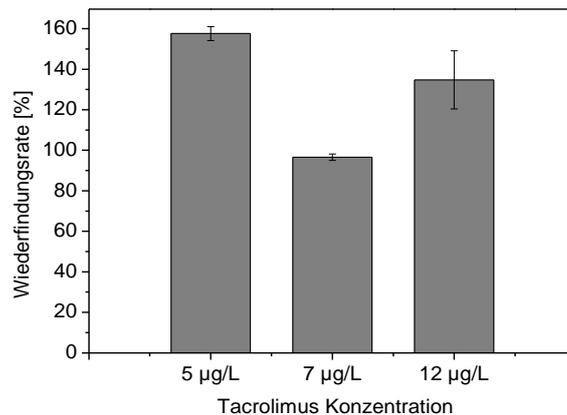


Abbildung 4.8: Wiederfindungsraten von Tacrolimus in PBS bei drei verschiedenen Konzentrationen innerhalb des Arbeitsbereichs

4.1.1.5 Kreuzreaktivitäten zwischen den Makrolidlaktone Tacrolimus, Everolimus und Sirolimus

Kreuzreaktivitäten treten auf, wenn die Epitope der Antigene in der Probe sehr ähnlich sind und der verwendete Antikörper mit unterschiedlicher Affinität an mehrere Antigene binden kann. Da die drei Makrolidlaktone Sirolimus, Everolimus und Tacrolimus strukturell sehr eng verwandt sind, wurden die Kreuzreaktivitäten des Tacrolimus-Antikörpers zu Everolimus und Sirolimus untersucht. Sirolimus bzw. Everolimus werden dazu über die Epoxid-Gruppe des GOPTS direkt auf der Transduceroberfläche immobilisiert und die Bindung des Tacrolimus-Antikörpers wird mit der RfS detektiert.

In Abbildung 4.9 sind die Steigungen der Bindungssignale des Tacrolimus-Antikörpers und des Mycophenolsäure-Antikörpers (MPA-Ak) an Transducern, auf denen Sirolimus bzw. Everolimus immobilisiert wurden, dargestellt.

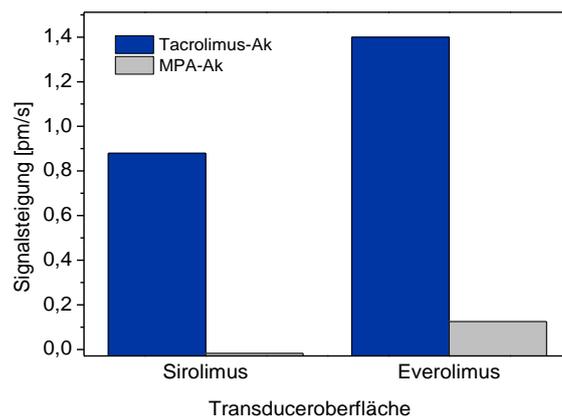


Abbildung 4.9: Sirolimus bzw. Everolimus ist über GOPTS an der Transduceroberfläche immobilisiert. Der Tacrolimus-Antikörper zeigt im Gegensatz zum Mycophenolsäure-Antikörper ein spezifisches Bindungssignal

Der Tacrolimus-Antikörper bindet bei beiden Oberflächen, der MPA-Antikörper zeigt kein Bindungssignal. Es treten Kreuzreaktivitäten des Tacrolimus-Antikörpers zu immobilisierten Makrolidlaktone auf.

Die Kreuzreaktivität kann auch durch Immobilisierung des Tacrolimus-Antikörpers an der Transduceroberfläche überprüft werden. Dies wird in einem iRIfS-Aufbau realisiert, da bei dieser Detektionsmethode durch das Referenzieren auf den Hintergrund selbst kleine Bindungssignale gut von unspezifischen Wechselwirkungen unterschieden werden können. Die Transducer im Objektträger-Format werden mit Diamino-PEG beschichtet und die Aminogruppen mit GA zu Carboxygruppen umfunktionalisiert. Tacrolimus-Antikörper werden in Form von kleinen Spots auf die zuvor durch Carbodiimid aktivierte Oberfläche getropft (siehe Abschnitt 3.1.1.7). Tacrolimus-Lösung wird über die Transduceroberfläche geleitet. Die Anbindung des Analyten an die immobilisierten Antikörper, die in Abbildung 4.10 dargestellt ist, wird durch eine Abnahme der relativen Intensität sichtbar.

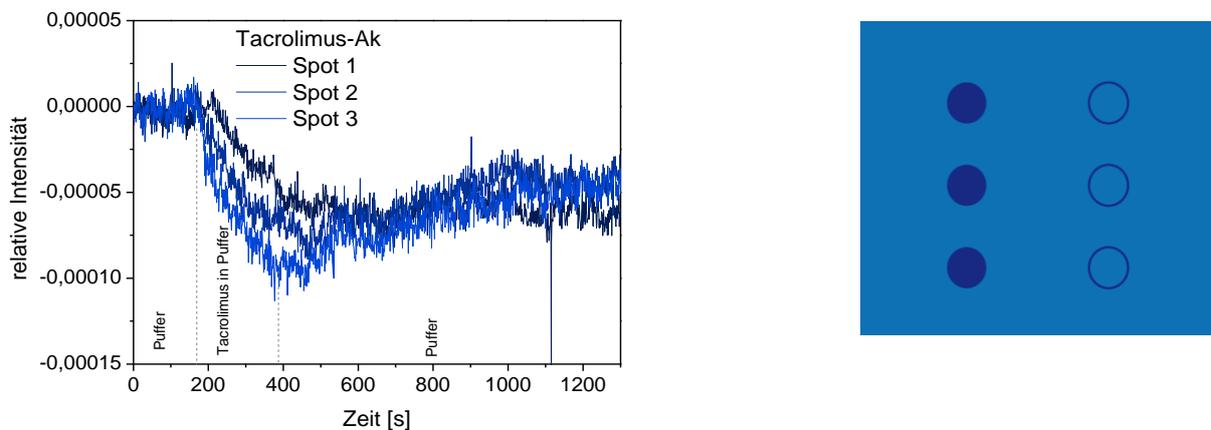


Abbildung 4.10: Die Anbindung von Tacrolimus an drei verschiedene Tacrolimus-Antikörper-Spots wird durch eine Abnahme der relativen Intensität sichtbar (links). Eine Schemazeichnung der gespotteten Antikörper ist dargestellt (rechts). Auf der linken Seite des Transducers sind mit der Pipette dreimal 0,5 μ L Tacrolimus-Antikörper gespottet, auf der rechten dreimal 0,5 μ L MPA-Antikörper. Letzterer zeigt keine Wechselwirkung mit Tacrolimus. Die relativen Intensitäten der links dargestellten Bindungskurven werden durch Referenzieren der Intensität des jeweiligen Tacrolimus-Antikörper-Spots auf den rechts daneben liegenden MPA-Antikörper-Spot erhalten.

Hintereinander wird nun die Wechselwirkung aller drei Makrolidlaktone zum immobilisierten Tacrolimus-Antikörper getestet. Das Bindungssignal an einem Spot ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei allen Messungen wird zur Verbesserung der Löslichkeit der lipophilen Wirkstoffe ein Puffer, bestehend aus PBS mit 5% DMSO, verwendet. Um möglichst hohe Konzentrationen der kleinen Moleküle in der Lösung zu erhalten, werden von allen Wirkstoffen gesättigte Lösungen verwendet. Vor der Messung wird die Lösung des jeweiligen Arzneistoffs vom nicht gelösten Arzneistoff abgetrennt.

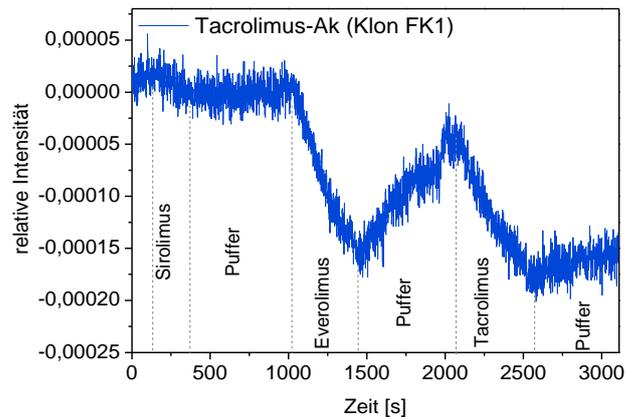


Abbildung 4.11: Sirolimus, Everolimus und Tacrolimus werden nacheinander über eine Oberfläche mit Tacrolimus-Antikörper-Spots gespült. Alle drei Wirkstoffe binden an den Antikörper.

Genauso wie bei den RfS-Messungen, wird auch hier sowohl eine Wechselwirkung zwischen Sirolimus und dem Tacrolimus-Antikörper als auch Everolimus und dem Tacrolimus-Antikörper detektiert. Bei diesen Messungen fällt auf, dass das Bindungssignal von Sirolimus wesentlich geringer ist als das der beiden anderen Makrolide. Dies kann auf eine geringere Affinität zwischen dem Tacrolimus-Antikörper und Sirolimus zurückzuführen sein oder durch unterschiedliche Mengen an gelöstem Wirkstoffen, da in allen Fällen gesättigte Lösungen der Wirkstoffe verwendet wurden. Die Unterschiede in der molaren Masse der drei Wirkstoffe sind relativ gering. Tacrolimus besitzt mit $804 \frac{g}{mol}$ die geringste molare Masse, Sirolimus und Everolimus sind strukturell sehr ähnlich. Ihre molaren Massen von $914 \frac{g}{mol}$ für Sirolimus und $958 \frac{g}{mol}$ für Everolimus sind sehr ähnlich, sodass die unterschiedlichen Bindungssignale vermutlich nicht durch die unterschiedliche Größe dieser beiden Moleküle hervorgerufen werden. Außerdem kommt es beim Spülen mit Puffer zu einer starken Dissoziation von Everolimus vom immobilisierten Antikörper. Die starke Dissoziation spricht dafür, dass die Wechselwirkung zwischen Everolimus weniger spezifisch ist als zwischen Tacrolimus und dem Antikörper.

Nach der Messung der Kreuzreaktivität an einer heterogenen Phase stellt sich die Frage, ob diese auch in homogener Phase auftreten. Abbildung 4.12 zeigt dies am Beispiel von Everolimus. Everolimus wird dazu auf der Transduceroberfläche immobilisiert. Dies erfolgt analog zur Immobilisierung von Tacrolimus auf GOPTS (vgl. Abschnitt 3.1.1.4).

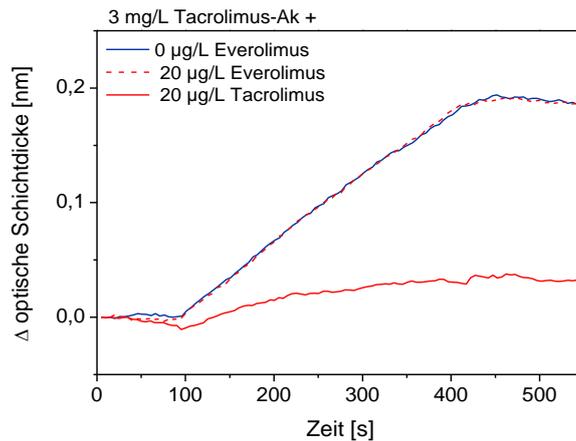


Abbildung 4.12: Indirekte Detektion der Wechselwirkung zwischen Tacrolimus-Antikörper und Tacrolimus bzw. Everolimus in einem Bindungshemmtest

In einem Bindungshemmtest werden Tacrolimus-Antikörper einmal mit Tacrolimus und einmal mit Everolimus vorinkubiert. Nur durch Zugabe von Tacrolimus kann der Antikörper effektiv inhibiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Affinität von Everolimus zum Tacrolimus-Antikörper deutlich geringer ist als jene von Tacrolimus zum Tacrolimus-Antikörper. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper an der Oberfläche unterscheidet sich von der Wechselwirkung in einer Lösung, da die Bindungspartner an einer Oberfläche einerseits in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt sind und durch die Immobilisierung an Oberflächen entscheidende Erkennungsstrukturen sterisch schwer zugänglich sein können [75]. Da als Assayformat für Tacrolimus ein Bindungshemmtest verwendet wird und somit die entscheidende Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem Analyt in der Probe in der Lösung stattfindet, ist die an heterogener Phase auftretende Kreuzreaktivität des Tacrolimus-Antikörpers mit anderen Makrolidlaktonen nicht von Bedeutung.

4.1.2 Cyclosporin A

Betrachtet man die Strukturformel des cyclischen Peptids Cyclosporin A (CsA) in Abbildung 2.13 so fällt auf, dass keine primären Aminogruppen bzw. Carboxygruppen für eine Immobilisierung vorhanden sind. Eine einzige Hydroxygruppe steht für die Immobilisierung über Epoxid-Gruppen des GOPTS, analog zu Tacrolimus, zur Verfügung. Eine solche Immobilisierungsstrategie ist allerdings nicht erfolgreich, da diese funktionelle Gruppe räumlich schlecht zugänglich ist. Eine Möglichkeit dies zu umgehen besteht darin, das Molekül nicht-kovalent auf der Oberfläche zu immobilisieren.

4.1.2.1 Oberflächenchemie: nicht-kovalente Anbindung an DSPE-PEG

Die verwendeten Transducer werden wie in 3.1.1 beschrieben zunächst mit GOPTS beschichtet. Statt Diamino-PEG wird als Biopolymer 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-N-carboxy(polyethylenglycol) (DSPE-PEG) verwendet. Dieses wird über Carboxygruppen an die Epoxid-Funktionen des GOPTS gekoppelt. Um eine Oberfläche mit Kavitäten zu erhalten, an die sich das Cyclosporin A anlagern kann, hat sich eine Mischung aus 70% DSPE-PEG und 30% Carboxy-PEG als geeignet herausgestellt und wird deshalb für die Immobilisierung von CsA verwendet. 2 mg/mL CsA werden dazu in DMSO gelöst. 12 μ L der Lösung werden auf einen RfS-Transducer getropft und im Sandwich über Nacht in einer Glaskammer inkubiert. Am nächsten Tag wird der Transducer mit bidestilliertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort vermessen. In Abbildung 4.13 sind die Bindungssignale der CsA-Antikörper (CsA-Ak) ohne Inhibition und nach Inhibition mit verschiedenen Cyclosporin A Konzentrationen dargestellt.

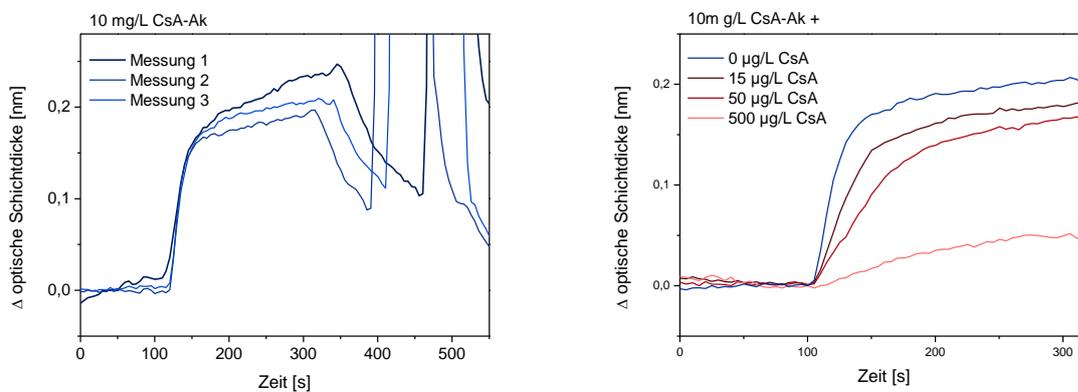


Abbildung 4.13: CsA-Antikörper bindet an CsA, das über DSPE-PEG nicht-kovalent an der Transduceroberfläche aufgebracht ist. Das Signal der reinen Antikörperlösungen ist über drei Messungen hinweg reproduzierbar (links). Die Anbindung des CsA-Antikörpers kann durch Zugabe von CsA konzentrationsabhängig inhibiert werden (rechts)

Eine Gemeinsamkeit der Bindungssignale zeigt sich im starken Anstieg ab dem Zeitpunkt der Probeninjektion, der dann sehr schnell eine Sättigung erreicht. Beim Spülen mit PBS kommt es zu einer starken Dissoziation der Antikörper vom CsA. Auch eine Dissoziation der CsA-Antikörper-Komplexe im Ganzen von der DSPE-PEG-Schicht ist vorstellbar. Diese Messungen lassen erkennen, dass die Oberflächenbelegung mit CsA niedrig ist, da eine kinetisch kontrollierte Anbindung des Antikörpers beobachtet wird. In einem Bindungshemmttest, kann gezeigt werden, dass das Bindungssignal nach Inkubation mit CsA inhibiert wird. Die Inhibition ist konzentrationsabhängig.

Nach neun Messungen wird erneut eine Nullmessung ohne CsA-Zugabe durchgeführt (siehe Abbildung 4.14). Dieses Signal fällt deutlich geringer aus als die Nullmessung zu Beginn der Messreihe.

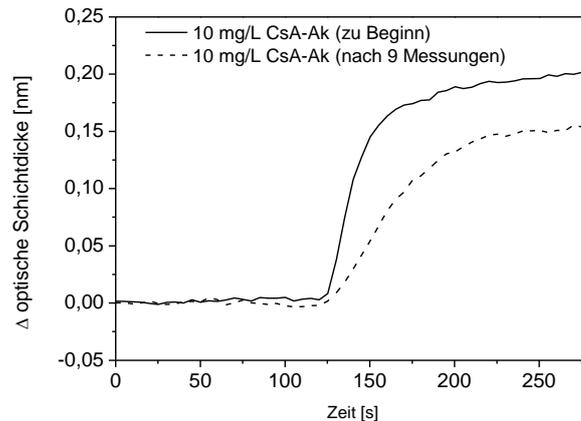


Abbildung 4.14: Abnahme des Bindungssignals reiner CsA-Antikörper-Lösung (ohne Inhibition durch CsA) zwischen der ersten und der neunten Messung einer Messreihe auf einem Transducer

Das Bindungssignal auf einem Transducer mit nicht-kovalent aufgebrachtem CsA nimmt im Verlauf der Messreihe deutlich ab. Durch Spülen mit PBS und Regeneration der Oberfläche wird nach und nach CsA von der Oberfläche gewaschen. Zuverlässige Mehrfachmessungen auf demselben Transducer sind auf diese Weise nicht möglich. Um den Abbau der Oberfläche im Laufe vieler Messungen zu berücksichtigen, können in regelmäßigen Abständen Nullmessungen, ohne Zugabe des Antigens, durchgeführt werden. Geht man von einer mehr oder weniger linearen Signalabnahme aus, kann so jedes erhaltene Signal auf das zu diesem Zeitpunkt rechnerisch erhaltene Nullsignal referenziert werden. Im Extremfall kann, wie in [76] beschrieben, vor jeder Messung eine Nullmessung durchgeführt werden, auf die referenziert wird. Dies erfordert zusätzliche Messungen und damit zusätzlichen Zeitaufwand. Außerdem erhöht sich der Antikörperverbrauch drastisch. Ist die Oberfläche sehr stark degeneriert, wird es schwierig das gemessene Signal auszuwerten. Eine stabile Oberfläche durch eine kovalente Immobilisierung des Antigens wird daher angestrebt.

4.1.2.2 Oberflächenchemie: kovalente Anbindung an die Oberfläche über DA-PEG

Der Arbeitsgruppe Orellana in Madrid ist es gelungen Carboxy-Derivate des CsA zu synthetisieren. Dadurch werden eine kovalente Immobilisierung des CsA und damit eine robustere Oberflächenchemie als bei nicht-kovalenter Anbindung möglich.

Ein schwefelhaltiges Cyclosporin-Derivat, das über eine Carboxygruppe verfügt (CsA-S-COOH), wird mithilfe der Carbodiimid-Kupplung, die in Abschnitt 3.1.1.6 beschrieben ist, kovalent auf der Oberfläche immobilisiert. Je Transducer-Sandwich werden hier 0,1 mg CsA-S-COOH immobilisiert.

4.1.2.3 Kalibrierung in Puffer

Eine Kalibrierung mit acht verschiedenen Konzentration CsA wird durchgeführt, wobei jede Konzentration dreifach vermessen wird. Die gemessenen Bindungssignale sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

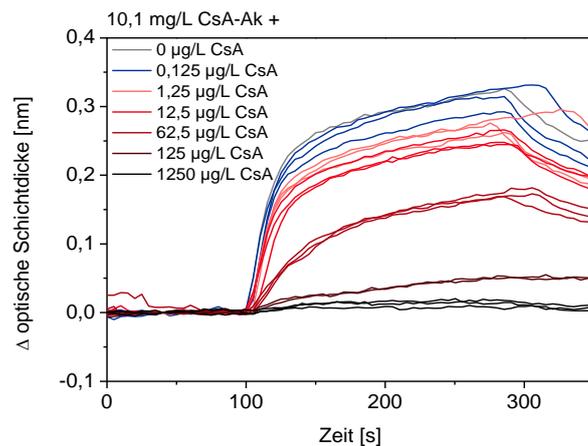


Abbildung 4.15: Bindungssignale des CsA-Antikörpers bei der Durchführung einer Kalibrierung mittels Bindungshemmtest

Im Gegensatz zu den diffusionslimitierten Bindungskurven, wie sie beim Tacrolimus-Assay zu beobachten sind, verlaufen die Messkurven hier nicht linear. Die Anbindung des CsA-Antikörpers an die Oberfläche ist kinetisch kontrolliert, was auf eine weniger hohe Beladung der Oberfläche mit CsA-S-COOH schließen lässt. Dadurch ist die Diffusion des Antikörpers zur Oberfläche im Vergleich zur Wechselwirkungskinetik an der Oberfläche vernachlässigbar. Für die Auswertung wird eine Gerade in den linearen Bereich zu Beginn jeder Bindungskurven gelegt und die Steigung ermittelt. In Abbildung 4.16 werden die aus der Steigung des Bindungssignals erhaltenen Datenpunkte logistisch angepasst und der unsymmetrische Verlauf durch Verwendung von fünf Parametern berücksichtigt. Eine logistische Anpassung mit nur vier Parametern bildet vor allem den Bereich niedriger Konzentrationen der Kurve nicht ausreichend ab.

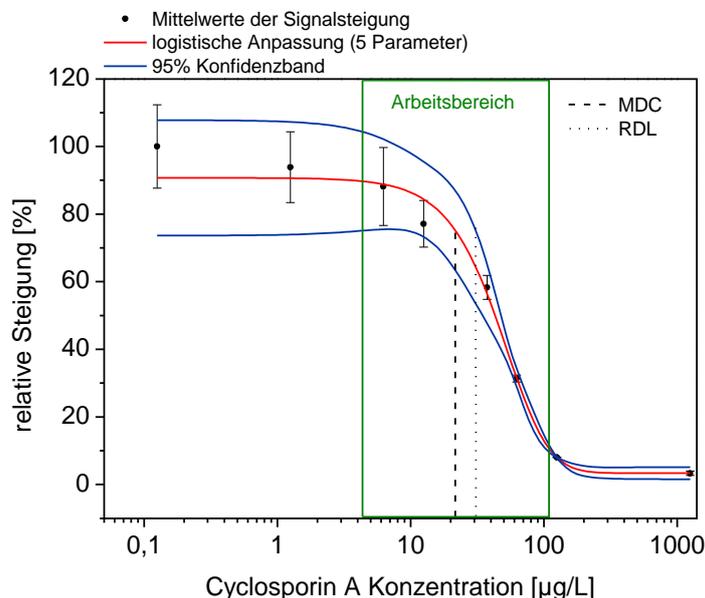


Abbildung 4.16: Bestimmung der Kalibrierfunktion für Cyclosporin A mit acht verschiedenen CsA-Konzentrationen. Der asymmetrische Kurvenverlauf ist mit einem logistischen Fit mit 5 Parametern angepasst. Die Antikörperkonzentration jeder Probe beträgt 10,1 mg/L und ist dreifach gemessen.

Beim Anpassen mit fünf Parametern erstreckt sich der Arbeitsbereich der Kalibrierung von 3,6 µg/L bis 112,0 µg/L. MDC und RDL liegen bei 23,2 µg/L bzw. 31,2 µg/L.

Tabelle 4.2: Parameter der logistischen Anpassungsfunktion und Kenngrößen der Kalibrierung für Cyclosporin A in PBS

A₁ [%]	87,38±5,39
A₂ [%]	3,33±0,55
x₀ [µg/L]	105,92±93,94
p	1,79±0,50
a	3,44±3,97
LOD [µg/L]	41,02
LOQ [µg/L]	nicht bestimmbar
MDC [µg/L]	23,2
RDL [µg/L]	31,2
Arbeitsbereich [µg/L]	3,6-112,0

Die erhaltenen Kenngrößen zeigen, dass die Methode vor allem Schwächen bezüglich der Reproduzierbarkeit hat. Die Fehlerbalken sind vor allem bei niedrigen CsA-Konzentrationen sehr groß. Außerdem zeigt sich auch hier, dass eine Nullmessung im Anschluss an die Kalibrierungsmessungen ein deutlich verringertes Bindungssignal aufweist. Die Oberfläche ist nicht während der gesamten Kalibrierungsmessungen stabil. Bei der Untersuchung der Wiederfindungsraten auf einem anderen Transducer zeigt sich, dass auch die Interchip-Reproduzierbarkeit nicht innerhalb der geforderten Grenzen von 75-120% liegt. Die kovalente Immobilisierung verbessert die Stabilität deutlich. Dennoch besteht bezüglich der Robustheit der Oberfläche noch Optimierungsbedarf.

4.1.3 Mycophenolsäure

4.1.3.1 Oberflächenchemie: Immobilisierung auf Diamino-PEG

Über die im Molekül vorhandene Carboxygruppe kann die Mycophenolsäure (MPA) an Oberflächen immobilisiert werden. Wie in Abschnitt 3.1.1.6 beschrieben wird die Carboxygruppe mit DIC aktiviert und an Diamino-Polyethylenglycol an der Oberfläche des Glastransducers gebunden. Die Messungen des Antikörper-Bindungssignals zeigen, dass die Carboxyfunktion nicht entscheidend für die Erkennung durch den MPA-Antikörper (MPA-Ak) ist. Bei der Herstellung der MPA-Antikörper wird laut Hersteller als Immunogen Mycophenolsäure-BTG verwendet, ein Konjugat aus MPA mit Rinder-Thyreoglobulin. Vermutlich ist auch bei diesem Konjugat die Carboxygruppe mit dem Protein verknüpft.

Zur Regeneration der Oberfläche nach einer Messung kommen zum Beispiel Guanidiniumchlorid-Lösung (6 M, pH 1,5) oder SDS-Lösung (0,5%, pH 2) in Frage. Ob ein Regenerationsmittel für den jeweiligen Assay geeignet ist, kann dadurch überprüft werden, dass viele Messungen mit anschließender Regeneration auf einem Transducer durchgeführt werden. Die Bindungssignale sollen dabei nicht abnehmen und über möglichst viele Messungen reproduzierbar sein.

Pro Regenerationslösung werden jeweils 20 Messungen mit reiner MPA-Antikörper-Lösung auf einem MPA-Transducer durchgeführt. Zwischen den Messungen wird die Oberfläche ca. 2 Minuten mit dem Regenerationsmittel gespült. Beide Regenerationslösungen sind geeignet, da während 20 aufeinanderfolgender Messungen reproduzierbare Bindungssignale erhalten werden. Betrachtet man jedoch den Abbau der Oberfläche nach der Regeneration, fällt dieser bei Verwendung von SDS-Lösung etwas höher aus. Außerdem kann es bei SDS eher zu Schaumbildung und dadurch zu Luftblasen in der Fluidik kommen. Aus diesem Grund wurde Guanidiniumchlorid als Regenerationsmittel ausgewählt.

4.1.3.2 Kalibrierung in Puffer

Die Anbindung der Antikörper an die MPA-beschichteten Transducer lässt sich durch Zugabe von MPA in die Proben konzentrationsabhängig inhibieren. Die Bindungssignale der Kalibrierung sind in Abbildung 4.17 dargestellt. 3 mg/L MPA-Antikörper werden mit verschiedenen MPA-Konzentrationen inkubiert und vermessen. Zusätzlich zur Nullmessung, ohne MPA, werden neun weitere Konzentration je dreifach vermessen.

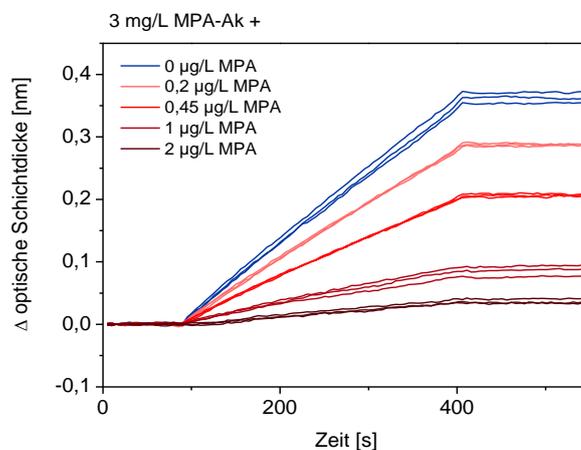


Abbildung 4.17: Bindungssignale des MPA-Antikörpers bei der Durchführung einer Kalibrierung mittels Bindungshemmtest.

Die Steigungen der Bindungskurven werden ausgewertet. Sie zeigen sehr geringe Standardabweichungen. Die Datenpunkte, die aus den Steigungen erhalten werden, lassen sich durch eine logistische Anpassungsfunktion mit vier Parametern, die in Gl. 2-25 gezeigt ist, gut abbilden (Abbildung 4.18).

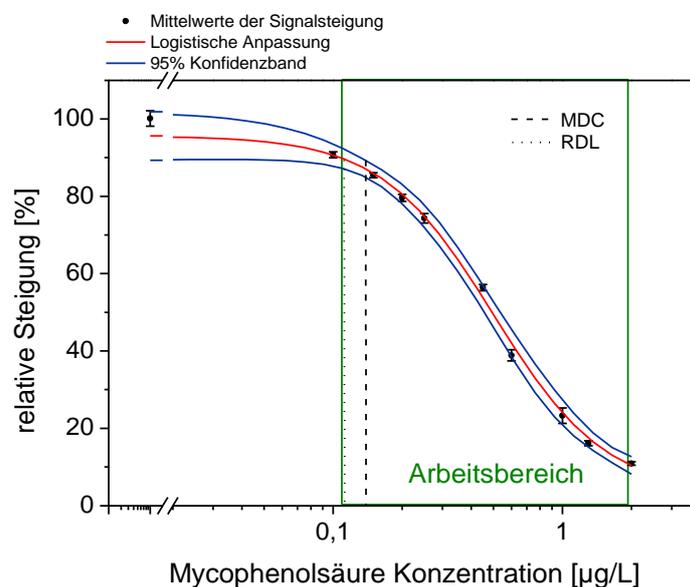


Abbildung 4.18: Bestimmung der Kalibrierfunktion für Mycophenolsäure mit neun verschiedenen MPA-Konzentrationen. Die Antikörperkonzentration jeder Probe beträgt 3 mg/L und ist dreifach gemessen.

Die Parameter für die logistische Anpassung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Parameter der logistischen Anpassungsfunktion und Kenngrößen der Kalibrierung für Mycophenolsäure in PBS

A₁ [%]	95,59±2,56
A₂ [%]	3,20±3,01
x₀ [µg/L]	0,50±0,028
p	1,78±0,20
LOD [µg/L]	0,11
LOQ [µg/L]	0,24
MDC [µg/L]	0,11
RDL [µg/L]	0,14
Arbeitsbereich [µg/L]	0,11-2,1

Der Arbeitsbereich der Kalibrierfunktion liegt bei 10-90% der Kurvenhöhe, das entspricht einer MPA-Konzentration von 0,11-2,1 µg/L. Die Nachweisgrenze (LOD) liegt mit 0,11 µg/L deutlich unter der geforderten Nachweisgrenze von 0,2 mg/L im Blut. Diese ist bei Mycophenolsäure, verglichen mit anderen Immunsuppressiva, sehr hoch, da die Tagesdosis 2 g Mycophenolat-Mofetil beträgt. Um dennoch relevante Konzentrationen messen zu können, muss die Probe mit Puffer verdünnt werden. Dies hat den Vorteil, dass Matrixeffekte der Probe reduziert werden.

Um die Genauigkeit und Verwendbarkeit der Kalibrierfunktion zu beurteilen, wurden Wiederfindungsraten mit einem weiteren Transducer bestimmt (Abbildung 4.19). Wie zu erwarten, nimmt die Reproduzierbarkeit mit zunehmender MPA-Konzentration zu. Die Wiederfindungsraten liegen alle in einem Bereich zwischen 70-125%. Die Kalibrierung kann für Messungen auf unterschiedlichen Transducern verwendet werden.

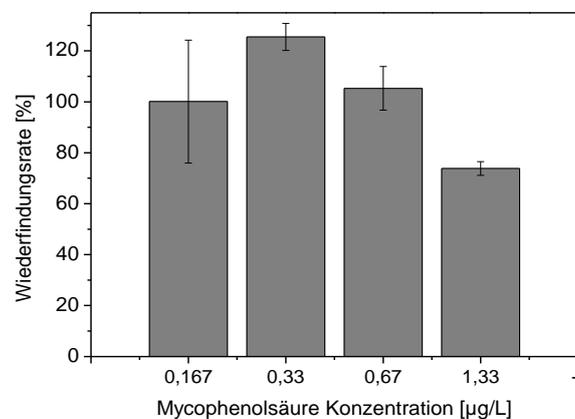


Abbildung 4.19: Dreifachbestimmung der Wiederfindungsraten bei vier verschiedenen Konzentrationen innerhalb des Arbeitsbereichs

4.1.3.3 Temperaturabhängigkeit der Antikörperbindung

Der entwickelte Immunoassay ist für eine patientennahe Anwendung vorgesehen. Wird die Probe sofort nach der Entnahme vermessen, liegt die Temperatur höher als die Raumtemperatur, höchstens aber bei der Körpertemperatur des Patienten (37°C). Die Temperatur beeinflusst die Gleichgewichtsreaktion zwischen Antigen und Antikörper, wobei die Affinität in der Regel mit zunehmender Temperatur zunimmt, bis bei ca. 42 °C die Denaturierung einsetzt und damit der Antikörper seine Funktionsfähigkeit verliert.

Der Einfluss der Temperatur auf die Funktionsfähigkeit und Affinität des MPA-Antikörpers an der unteren und oberen Grenze des erwarteten Temperaturbereichs ist in Abbildung 4.20 gezeigt.

Um Messungen bei 37°C durchführen zu können, muss der Messaufbau in einen Thermoschrank verlegt werden. Die RfS mit Weißlicht ist hier weniger geeignet, da der Platzbedarf durch die Fluidik, den Autosampler und das Diodenzeilen-Spektrometer relativ groß ist. Aus diesem Grund wird hierfür die 1-λ-Reflektometrie zur Detektion der Wechselwirkung verwendet, da diese einen kompakten Aufbau ermöglicht. Die Lösungen werden dazu durch eine Peristaltikpumpe direkt zur Flusszelle gepumpt. Als Lichtquelle und zur Detektion wird der ESE-LOG USB verwendet. Für die Detektion mit der 1-λ-Reflektometrie wird MPA wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben auf Goetheglas immobilisiert.

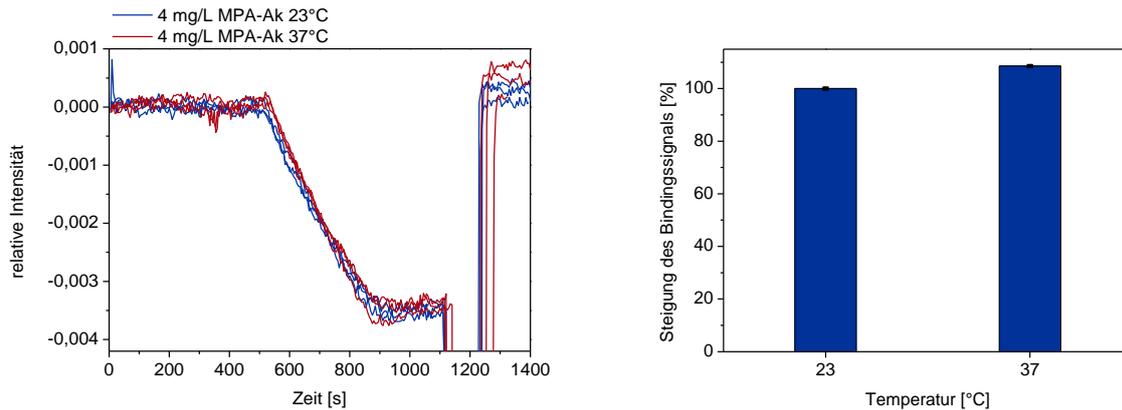


Abbildung 4.20: Bindungssignal des MPA-Antikörpers zu MPA an der Oberfläche, gemessen in der $1-\lambda$ -Reflektometrie

Alle Messungen sind sehr gut reproduzierbar und die Unterschiede der Bindungssignale zwischen 23°C und 37°C nur minimal. Die Steigung des Bindungssignals ist bei 37°C sogar etwas höher als bei 23°C, was dafür spricht, dass die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen unter physiologischen Bedingungen am besten funktioniert.

4.1.3.4 Einfluss von Perfusat-Lösung auf die Antikörperbindung

Die zu vermessende klinische Probe wird durch Mikrodialyse der Arzneistoffe über eine Membran erhalten. Um möglichst hohe Konzentrationen im Dialysat zu erreichen, wird der Übergang über die Membran durch ein geeignetes Perfusat verbessert. Eine Emulsion, die Sojaöl, Eilecithin, Phosphatidylcholin und Glycerol enthält, wurde deshalb von der AG Lupp (Klinikum rechts der Isar, München) ausgewählt und für diesen Einsatz genau charakterisiert.

Der Einfluss dieser Emulsion auf die Funktionsfähigkeit der Antikörper wird mittels iRfS untersucht. Die Ortsauflösung ermöglicht das Referenzieren des Bindungssignals an einem MPA-Spot auf den Hintergrund, der aus DA-PEG besteht. Dadurch werden unspezifische Wechselwirkungen der Fettemulsion zum DA-PEG aus dem Signal herausgerechnet.

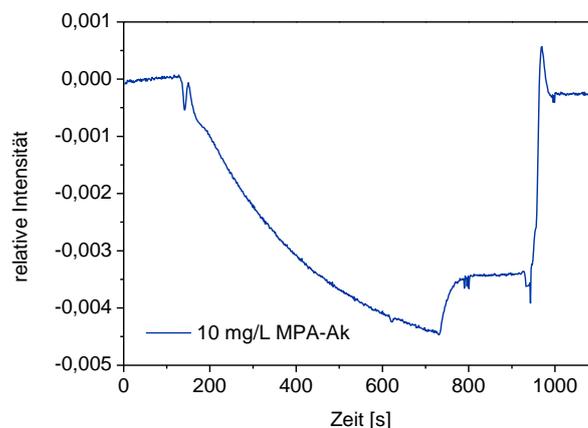


Abbildung 4.21: Bindungssignal des MPA-Antikörpers zu MPA an der Oberfläche, gemessen im iRfS; statt PBS wird eine Fettemulsion verwendet.

Der MPA-Antikörper zeigt auch in dieser Emulsion ein hohes Bindungssignal zu immobilisiertem MPA an einer Oberfläche. Die Affinität zwischen Antikörper und Arzneistoff wird nicht wesentlich beeinflusst.

4.1.4 Kurzzusammenfassung des Kapitels 4.1

Für die Immunsuppressiva Tacrolimus, Cyclosporin A und Mycophenolsäure wurden heterogene Assays entwickelt. Bei allen drei Arzneistoffen erwies sich der Bindungshemmtest als geeignetes Testformat. Zur Detektion wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie eingesetzt. Die aus den Kalibrierungen erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Kenngrößen der Kalibrierungen für verschiedene Immunsuppressiva im Vergleich

Immunsuppressivum	Derivat für Immobilisierung notwendig	LOD/LOQ [$\mu\text{g/L}$]	Wiederfindungsrate [%]	Arbeitsbereich [$\mu\text{g/L}$]	Regenerierbarkeit
Mycophenolsäure	nein	0,11/0,24	70-125	0,11-2,1	gut
Tacrolimus	nicht zwingend	5,25/6,98	97-157	4,9-12,2	gut
Cyclosporin A	ja	41,02/n.b.	n.b.	3,6-112	mäßig

Durch eine kovalente Immobilisierung des Analyten bzw. Analyt-Derivats auf Diamino-PEG werden unspezifische Wechselwirkungen weitestgehend abgeschirmt. Die Immobilisierung eines Tacrolimus-Derivats ergibt stabile Oberflächen. Die Kalibrierkurve, die bei diesem Assay durch die Bindung eines IgM-Antikörpers an die Oberfläche erhalten wird, ist verglichen mit dem Mycophenolsäure-Assay, bei dem IgG-Antikörper Verwendung finden, allerdings zu höheren Konzentrationen verschoben und deutlich steiler. Die Beladung der Oberfläche ist bei beiden Assays hoch und der Massentransport des Antikörpers durch Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Verglichen mit Tacrolimus und Mycophenolsäure ist die Beladung der Cyclosporin A-Oberfläche am geringsten. Dadurch wird die Gleichgewichtsreaktion des Antikörpers an der heterogenen Phase zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und nicht die Diffusion zur Oberfläche. Außerdem kommt es bei der Regeneration zwischen den Messungen zu einer weiteren Degeneration der Oberfläche, was bei geringer Beladung in der Bindungskurve sichtbar wird. Die Entwicklung der Assays erfolgte in 10 mM PBS, bei pH 7,4 und Raumtemperatur. Da die Probe des patientennahen Assays durch Dialyse erhalten wird und zudem eine höhere Temperatur aufweisen kann, wurde der Einfluss des verwendeten Perfusats und einer erhöhten Temperatur überprüft. Beide Faktoren beeinflussen die Wechselwirkung zwischen Analyt und Antikörper kaum.

Der Assay für Mycophenolsäure hat die beste Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Robustheit der Oberfläche. Dieser Assay wird daher für die Assayentwicklung auf der Oberfläche magnetischer Partikel herangezogen.

4.2 Magnetische (Nano)partikel

In Immunoassays werden magnetische Partikel mit entsprechenden Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche häufig verwendet, um das Zielmolekül aus der Probe abzutrennen. Ein bedeutender Vorteil im Vergleich zu Assays, die an der Oberfläche eines Transducers ablaufen, ist, dass auf eine Regeneration verzichtet werden kann. Nach Ablauf des Assays werden die Partikel verworfen und für den nächsten Assay neue Partikel und Reagenzien eingesetzt. Die Partikel können relativ einfach durch einen Magneten an einer Stelle festgehalten und bei Entfernen des Magneten aus dem System gespült werden. Probleme, die beim Verwenden magnetischer Partikel auftreten können, sind Aggregation und mit zunehmender Partikelgröße Sedimentation, wodurch die Erkennungsstruktur weniger gut zur Verfügung steht. Zusätzlich muss das Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen von Probenbestandteilen zur Partikeloberfläche beachtet werden. Bei der Detektion der emittierten Fluoreszenz sind vor allem Streueffekte und Absorption durch die Partikel relevant.

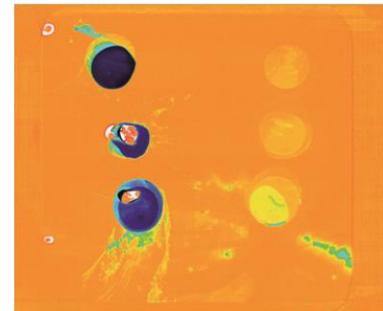
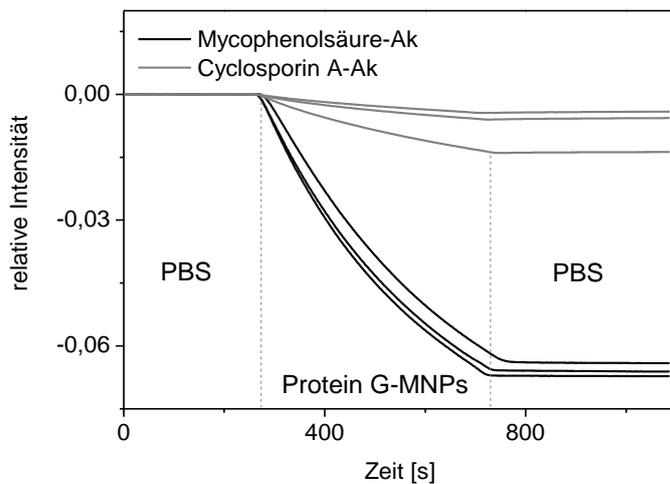
Im Folgenden werden magnetische Partikel mit Erkennungsstrukturen versehen, um fluoreszenzbasierte Assays für Immunsuppressiva zu entwickeln.

4.2.1 Immobilisierung des Antikörpers auf der Partikeloberfläche

Antikörper können wie in Abschnitt 3.1.1.7 beschrieben durch Carbodiimid-Kupplung auf carboxylierten Oberflächen immobilisiert werden. Die Immobilisierung geschieht dann ungerichtet an einer beliebigen Aminogruppe des Antikörper-Moleküls, sodass die Bindungsdomäne sterisch schlecht zugänglich sein kann. Die Affinität des Antikörpers zum Antigen ist dann stark vermindert bzw. geht völlig verloren. Weitere Möglichkeiten der ungeordneten Immobilisierung bestehen in der Verwendung von Maleimiden oder dem Ausnutzen der starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin. Maleimide auf der Oberfläche bilden kovalente Bindungen mit Thiolgruppen am Antikörpermolekül aus [77]. Biotinylierte Antikörper können nicht-kovalent auf einer Streptavidin-Oberfläche immobilisiert werden. Eine gerichtete Immobilisierung eines Antikörpers kann nicht-kovalent zum einen über anti-IgG (Fc) auf der Oberfläche oder über Protein A bzw. Protein G geschehen.

4.2.1.1 Immobilisierung von Antikörpern über Protein G

In einem Vorversuch wird die Immobilisierung zweier verschiedener Antikörper auf der Oberfläche magnetischer Partikel über Protein G überprüft. Der Mycophenolsäure-Antikörper stammt aus dem Schaf, der Cyclosporin A-Antikörper aus der Maus. Beide gehören der Klasse Immunglobulin G an. Für Protein G ist eine hohe Affinität zu IgG-Antikörpern aus dem Schaf und eine geringe zu IgG-Antikörpern aus der Maus beschrieben [78]. Diese Beobachtung wird mittels der durchgeführten iRfS-Messungen bestätigt. Beide Antikörper werden hierzu direkt mittels Aktivester-Chemie auf einer Transduceroberfläche immobilisiert. Dazu werden mit einer Pipette 0,5 µL der Antikörper-Lösung (1 mg/mL) punktförmig aufgetragen. Durch die Immobilisierung über Aminogruppen im Antikörper-Molekül sind statistisch einige Fc-Regionen frei zugänglich. Magnetische Nanopartikel (MNP) mit einem Durchmesser von 100 nm, die Protein G auf der Oberfläche tragen, werden darüber geleitet. Protein G-Partikel wechselwirken mit beiden Antikörpern, allerdings ist das Bindungssignal der Protein G-Partikel zu den Antikörpern aus dem Schaf wesentlich höher als das zu den Antikörpern aus der Maus (siehe Abbildung 4.22).



Antikörper vom Schaf Antikörper von der Maus

Abbildung 4.22: Bindungssignale der Wechselwirkung Magnetischer Nanopartikel-Protein G ($\varnothing 100$ nm) mit auf einem Transducer immobilisierten Antikörpern vom Schaf bzw. von der Maus im iRlFS (links). Bild der CMOS-Kamera, bei dem die Intensitäten nach der Probeninjektion auf die Intensitäten der Basislinie vor der Probeninjektion bezogen werden (rechts).

4.2.1.2 MPA-Antikörper auf der Oberfläche magnetischer Partikel

Rekombinantes Protein A/G enthält Teile der Fc-Bindungsdomäne von Protein A und von Protein G und ermöglicht somit eine gerichtete Immobilisierung von IgG-Antikörpern verschiedener Spezies beispielsweise aus der Maus oder dem Schaf. Die Immobilisierung der Antikörper auf der Partikeloberfläche ist in Abschnitt 3.1.2.2 beschrieben. Der Mycophenolsäure-Assay wird als Testsystem verwendet, da MPA-Antikörper leicht über Protein A/G immobilisiert werden können. Zudem wird bei der Immobilisierung der Mycophenolsäure kein aufwändig synthetisiertes Derivat benötigt, da im Molekül selbst eine Carboxygruppe zu Verfügung steht. Die Funktionalität der immobilisierten Antikörper auf der Oberfläche der magnetischen Partikel kann mithilfe der RlFS überprüft werden.

Die Anbindung der mit MPA-Antikörper funktionalisierten magnetischen Partikel an MPA auf der Transduceroberfläche ist in den Abbildung 4.23 bis Abbildung 4.25 zu sehen. Auffällig ist das negative Bindungssignal. Dieses kommt durch die Größe der getesteten Nanopartikel (130-250 nm) zustande. Eine Vermutung ist, dass dies zu einer Verschiebung des Interferenzspektrums nach links führt. Außerdem kommt es durch die große Änderung der optischen Schichtdicke zu einer Überschreitung des linearen Bereichs des Interferenzspektrums [79,29].

Zu Beginn der Messung ist ein leichter Brechungsindexsprung erkennbar, der durch die Partikellösung hervorgerufen wird, da sich diese in ihrem Brechungsindex sehr deutlich von reinem Puffer unterscheidet. Außerdem absorbieren die braunen Partikel Licht im sichtbaren Bereich. Die Reproduzierbarkeit wird in Abbildung 4.23 anhand einer Dreifachmessung der gleichen Konzentration an Partikeln gezeigt. Guanidiniumchlorid-Lösung ist zur Regeneration der Oberfläche geeignet, da die Partikel wieder von der Oberfläche gelöst werden und die Ausgangsbasislinie wieder erreicht wird.

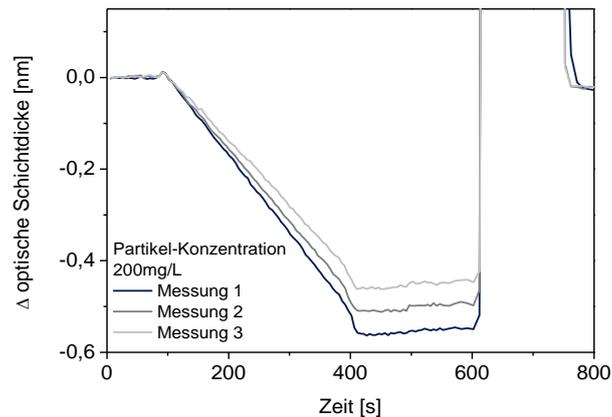


Abbildung 4.23: RfS-Messungen magnetischer Partikel-MPA-Ak (nanomag-D-PEG-COOH, 130 nm) auf einer MPA-Oberfläche

In Abbildung 4.24 ist zu sehen, dass eine steigende Konzentration magnetischer Partikel wie erwartet zu einer Zunahme des Bindungssignals führt.

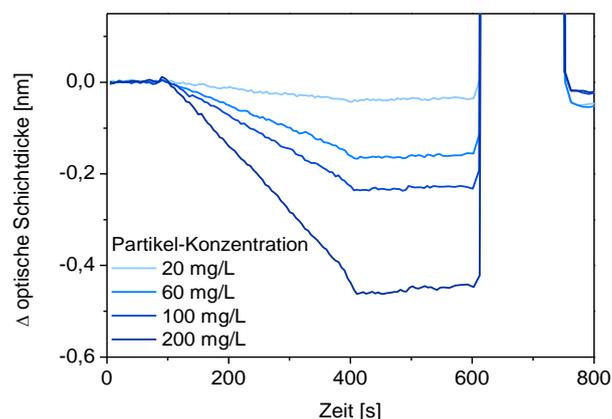


Abbildung 4.24: RfS-Messung unterschiedlicher Konzentrationen magnetischer Partikel-MPA-Ak (nanomag-D-PEG-COOH, 130 nm) auf einer MPA-Oberfläche

Für einen Bindungshemmtest werden magnetische Partikel (mit immobilisiertem MPA-Ak) mit MPA inkubiert und schließlich über die Oberfläche geleitet (Abbildung 4.25). Hierbei fällt auf, dass bei hohen MPA-Konzentrationen eine starke Hemmung der Bindung stattfindet, das Bindungssignal jedoch nie „Null“ wird. Neben dem Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und der Transduceroberfläche, kann eine weitere Erklärung in der großen Anzahl immobilisierter Antikörper pro Partikel liegen. Bei der Inhibition mit einer hohen MPA-Konzentration, kommt es, selbst bei einer sehr geringen Konzentration an freien Antikörpern im Gleichgewicht, zu einer Bindung des großen Partikels an die Oberfläche. Die dadurch erhaltene Schichtdickenänderung wird allein durch den Partikel verursacht und ist unabhängig davon, wie viele freie Antikörper auf der Partikeloberfläche für eine Bindung zur Verfügung stehen.

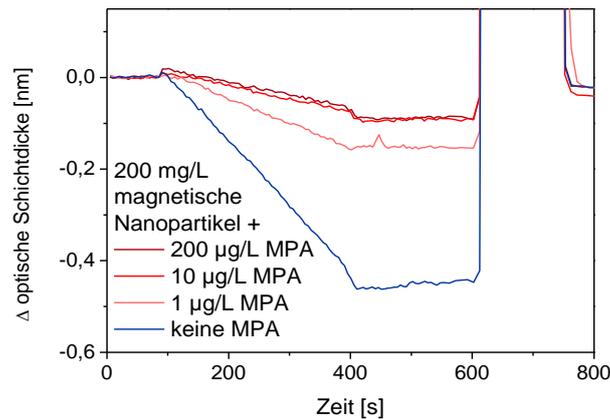


Abbildung 4.25: Inhibition der Bindung der magnetischen Partikel-MPA-Ak (nanomag-D-PEG-COOH, 130 nm) an die MPA-Oberfläche durch vorherige Inkubation mit MPA (Bindungshemmtest)

Es kann gezeigt werden, dass die Immobilisierung von MPA-Ak über Protein A/G an die Oberfläche magnetischer Partikel erfolgreich ist. Die Funktionalität der Antikörper bleibt auch nach der Immobilisierung bestehen, da stabile Bindungssignale zu einer MPA-Oberfläche beobachtet werden. Diese werden durch Zugabe von MPA inhibiert.

4.2.1.3 Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Partikeln und fluoreszenzmarkiertem Analyt-Derivat

Durch den Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Analytderivats kann der im Abschnitt zuvor beschriebene Assay auf ein fluoreszenzbasiertes System übertragen werden. Die Mycophenolsäure ist bei diesem Derivat, das von der AG Prof. Orellana (Universität Madrid) synthetisiert wurde, kovalent an den Fluorophor Nilblau gekoppelt. Durch diese Modifikation des Analyten besteht das Risiko, dass die Affinität der MPA zum Antikörper stark abnimmt oder vollständig verloren geht. Dies wurde mithilfe der RfS im Vorfeld markierungsfrei untersucht und ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

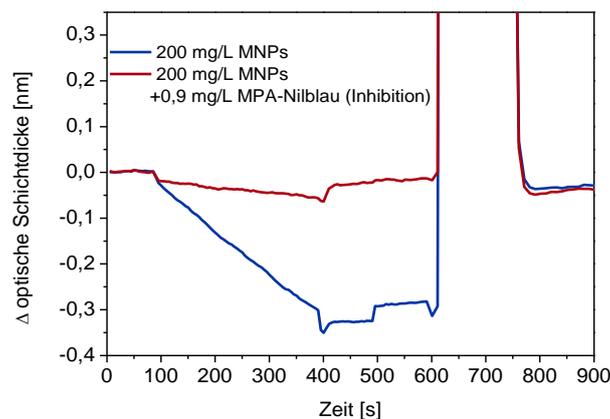


Abbildung 4.26: Bindungssignale der magnetischen Partikel-MPA-Ak (nanomag-D, 250 nm) ohne Inhibition und nach Inhibition mit 0,9 mg/L MPA-Nilblau

MPA ist auf der Oberfläche eines Glastransducers immobilisiert. Magnetische Partikel (\varnothing 250 nm) mit MPA-Ak-Oberfläche zeigen ein typisches Bindungssignal, wie es bereits in 4.2.1.2 gezeigt wurde. Durch Zugabe von MPA-Nilblau im Überschuss, kann das Bindungssignal inhibiert werden.

Als Modellsystem für die Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Immunoassays unter Verwendung magnetischer Partikel wird die Mycophenolsäure als Analyt ausgewählt. Als Assayformate für konzentrationsabhängige Messungen kommen ein kompetitives Assayformat und ein Bindungshemmtest in Frage. Der Assay wird in einem Eppendorf Cup durchgeführt. Für die notwendigen Waschschriffe werden die Partikel mithilfe eines Magneten abgetrennt, der Überstand abpipettiert und durch frischen PBS-Puffer ersetzt. Zum Schluss werden die Partikel in PBS-Puffer suspendiert und in eine Küvette überführt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt im Fluoreszenzspektrometer.

In einem kompetitiven Testformat wird eine definierte Menge an MPA-Nilblau zur Probe, die eine bestimmte MPA-Konzentration enthält, zugesetzt und mit magnetischen Partikeln (MPA-Ak-Oberfläche) inkubiert. MPA (Analyt) und MPA-Nilblau (markiertes Analyt-Derivat) binden je nach ihrem Verhältnis in der Probe und ihrer jeweiligen Affinität zum Antikörper an die magnetischen Partikel. Ein Magnet erlaubt es, die Partikel am Gefäßrand festzuhalten und ungebundene Probenbestandteile durch Waschen mit Puffer zu entfernen. Nachdem der Magnet entfernt ist, werden die Partikel wieder in PBS-Puffer suspendiert. Das MPA-Nilblau wird durch Einstrahlen von Licht der entsprechenden Wellenlänge angeregt und emittiert Fluoreszenzlicht. Je mehr Fluoreszenzlicht detektiert wird, desto mehr markiertes Analyt-Derivat hat an die Partikel gebunden und desto weniger Analyt ist in der Probe enthalten.

Bei der Durchführung eines kompetitiven Assayformats mit Partikeln mit einem Durchmesser von 130 nm und 250 nm kann im Fluoreszenzspektrometer kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Messungen von Mischungen aus Partikeln und Farbstoff zeigen, dass bei derselben Konzentration an Farbstoff in Anwesenheit magnetischer Partikel ein deutlich niedrigeres Fluoreszenzsignal gemessen wird, da die braunen Partikel Teile des emittierten Fluoreszenzlichts absorbieren. Aus diesem Grund werden für die folgenden Messungen Partikel mit einem Durchmesser im Mikrometer-Bereich verwendet.

Assays mit diesen Partikeln ($>1 \mu\text{m}$) können wiederum in der RfS nicht detektiert werden. Ab einer Größe von ca. 500 nm ist nach Überleiten der Partikel über die Transduceroberfläche keine Verschiebung des Interferenzspektrums mehr zu erkennen. Außerdem nimmt die Geschwindigkeit der Diffusion zur Oberfläche gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung mit steigendem Durchmesser ab, was die Bindung der Partikel erschwert.

In Abbildung 4.27 sind Fluoreszenzsignale eines Mycophenolsäure-Assays zu sehen, die mit dem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen wurden. Die ausgewählten magnetischen Partikel besitzen einen Durchmesser von $2,7 \mu\text{m}$. Assays mit der gleichen Konzentration an Magnetpartikeln, aber unterschiedlichen Konzentrationen an zugegebener MPA, MPA-Nilblau bzw. Nilblau wurden jeweils dreimal angesetzt und vermessen. Schwankungen des Fluoreszenzsignals, die zum Beispiel durch Verlust der Partikel bei den Waschschriffen geschehen, werden so gemittelt. Angeregt wird bei 616 nm, das Maximum der Fluoreszenzemission von MPA-Nilblau befindet sich bei 656 nm; das von reinem Nilblau bei 679 nm.

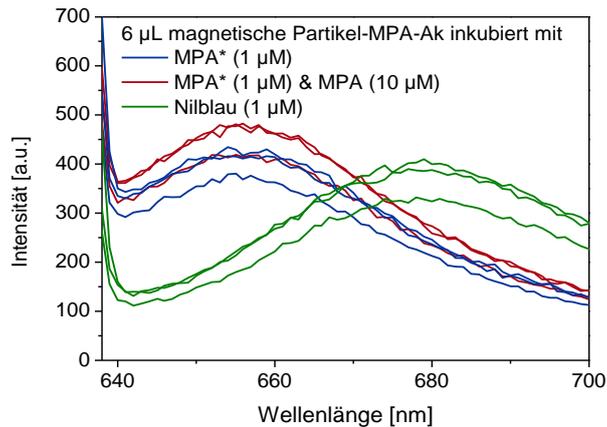


Abbildung 4.27: kompetitiver Assay mit magnetischen Mikropartikeln-MPA-Ak (LodeStar COOH, 2,7 µm) und MPA-Nilblau als fluoreszenzmarkiertem Analytderivat

In dieser Abbildung ist zum einen zu erkennen, dass trotz Zugabe einer hohen Konzentration an MPA keine Inhibition des Fluoreszenzsignals stattfindet, zum anderen, dass auch reines Nilblau eine starke Wechselwirkung zu den Magnetpartikeln zeigt. Aus diesem Grund ist keine Inhibition möglich. Durch die Einführung des Nilblau kommt es zu einer starken unspezifischen Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor und den Partikeln, sodass die gewünschte spezifische Wechselwirkung zwischen MPA und den Antikörperbindungsstellen nur noch einen geringen Anteil der Gesamtwechselwirkung ausmacht.

Um unspezifische Wechselwirkung zu minimieren, können Partikel mit Polyethylenglykol an deren Oberfläche zur Abschirmung unspezifischer Wechselwirkungen verwendet werden. In Abbildung 4.28 ist zu erkennen, dass Polyethylenglykol auf der Partikeloberfläche die unspezifische Wechselwirkung zu Nilblau deutlich verringert.

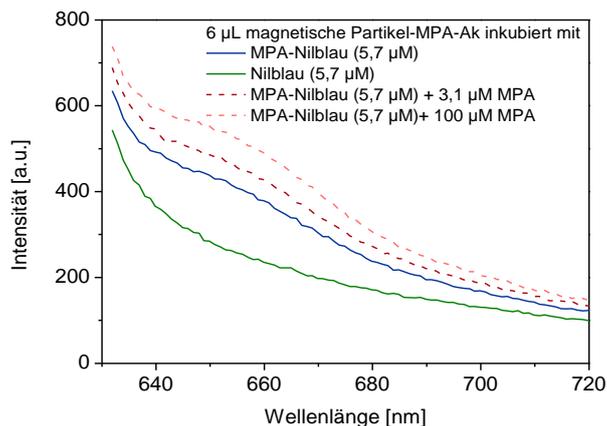


Abbildung 4.28: kompetitiver Assay mit magnetischen Mikropartikeln-MPA-Ak (micromer-M-PEG-COOH, 3 µm) und MPA-Nilblau als fluoreszenzmarkiertem Analytderivat

Auch hier wurden kompetitive Assays durch Zugabe von MPA-Nilblau zu magnetischen Partikeln-MPA-Ak durchgeführt. Bei Zugabe der höchsten Konzentration an MPA ist allerdings das höchste Fluoreszenzsignal zu erkennen und nicht wie erwartet das niedrigste. Zusätzlich besitzen die verwendeten micromer-M Partikel andere Streueigenschaften als die für die Messungen in Abbildung 4.27 verwendeten LodeStar-

Partikel. Dadurch ist im detektierten Fluoreszenzsignal noch ein relativ hoher Anteil des Anregungslichts sichtbar.

Unspezifische Wechselwirkungen des MPA-Nilblau zur Partikeloberfläche stellen ein großes Problem dar, das durch Verwendung von PEG vermindert werden kann. Dennoch sind mit diesem System keine konzentrationsabhängigen Messungen gelungen.

4.2.2 Immobilisierung des Antigens auf der Partikeloberfläche

Anstelle der Immobilisierung von Antikörpern auf der Partikeloberfläche, kann auch das Antigen immobilisiert werden. Auch hier sind als Assayformate das kompetitive Testformat und der Bindungshemmtest möglich. Der Bindungshemmtest wurde als Assayformat ausgewählt und ist im Folgenden näher beschrieben.

4.2.2.1 Detektion der Fluoreszenz mithilfe eines sekundären fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen den MPA-Antikörper

Zunächst wird der Probe eine definierte Menge an Antikörpern zugesetzt und inkubiert. Im zweiten Schritt werden die Partikel mit immobilisiertem Antigen auf der Oberfläche zugegeben. Antikörper, die zuvor noch nicht vollständig mit Analyt gesättigt wurden, binden nun an den immobilisierten Analyten an der Partikeloberfläche. Ungebundene Antikörper werden durch Waschen mit Puffer entfernt. In einem dritten Schritt wird ein fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper gegen IgG aus dem Schaf zugegeben. Wieder werden ungebundene Antikörper durch Waschen entfernt und die Partikel in Puffer suspendiert. Die Höhe des Fluoreszenzsignals gibt Aufschluss darüber, wie viele Sekundär- und damit auch wie viele Primärantikörper an die Partikel gebunden haben. Je höher das Fluoreszenzsignal ist, desto mehr Antikörper haben gebunden und desto weniger Analyt ist in der Probe enthalten.

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt entweder im Fluoreszenzspektrometer oder in einem LIF-Aufbau. Beim Fluoreszenzspektrometer wird die Probe in eine Küvette überführt, beim LIF-Aufbau dagegen durch eine Mikrofluidik über die Flusszelle geleitet und währenddessen vermessen. Die Messung im LIF-Aufbau erlaubt daher wesentlich mehr Möglichkeiten: Probenvolumen und Flussgeschwindigkeit können angepasst und durch Installation eines Autosamplers können mehrere Proben nacheinander vermessen werden, ohne dass von außen eingegriffen werden muss.

In Abbildung 4.29 ist derselbe Assay dargestellt, der hintereinander zuerst in einer Küvette im Fluoreszenzspektrometer und anschließend mithilfe eines mikrofluidischen Systems durch Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) vermessen wird. Dieser Messaufbau ist in Abschnitt 3.4 näher beschrieben.

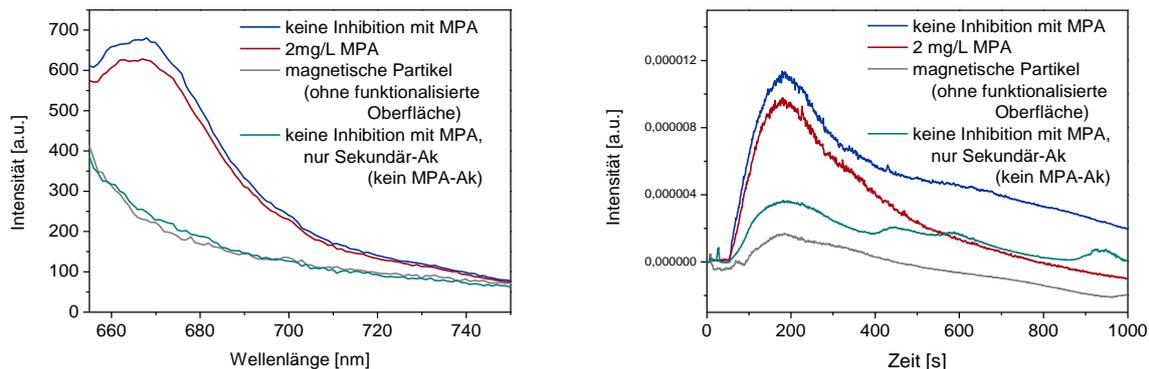


Abbildung 4.29: Homogener Assay zwischen magnetischen Mikropartikeln-MPA (micromer-M-PEG-NH₂, 3 µm) und Primärantikörper/fluoreszierendem Sekundärantikörper (anti-IgG (H+L)): Pro Probe werden 10 µL magnetische Partikel eingesetzt. Die Konzentrationen an Primär- und Sekundärantikörper betragen 16,7 mg/L und 25 mg/L. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt im Fluoreszenzspektrometer (links) und im LIF-Aufbau (rechts).¹

Die Messung ohne MPA-Zugabe zum Primärantikörper zeigt sowohl im LIF-Aufbau als auch im Fluoreszenzspektrometer, wie erwartet, das höchste Fluoreszenzsignal (Nullmessung). Die MPA-Antikörper binden über ihre freien Bindungsstellen an die MPA-Oberfläche der magnetischen Partikel. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper bindet wiederum an den MPA-Antikörper, sodass ein hohes Fluoreszenzsignal detektiert wird. Beim Bindungshemmtest unter Zugabe von 6,5 µM MPA zu den MPA-Antikörpern sollte das Fluoreszenzsignal deutlich inhibiert sein und dadurch niedriger als das Ausgangssignal. In beiden Schaubildern in Abbildung 4.29 ist das Fluoreszenzsignal der Inhibition zwar niedriger als das Signal der Nullmessung, aber nicht wie erwartet fast vollständig inhibiert. Zwei Kontrollmessungen werden durchgeführt: Der gleiche Assayablauf wird analog der Nullmessung durchgeführt. Einmal werden dabei magnetische Partikel ohne MPA an der Oberfläche statt Partikel mit MPA-Oberfläche verwendet, bei der zweiten Kontrolle wird der Assay mit Partikeln mit MPA-Oberfläche durchgeführt, aber auf die Zugabe von MPA-Antikörper (Primärantikörper) verzichtet. Beide Kontrollmessungen zeigen sehr niedrige Fluoreszenzsignale. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper weist somit keine unspezifische Wechselwirkung zur Partikeloberfläche auf, genauso besteht keine unspezifische Wechselwirkung zwischen dem unfunktionalisierten Partikel und dem MPA-Antikörper.

Auf den ersten Blick sehen die Signale, die aus der Messung mit dem Fluoreszenzspektrometer und im LIF-Aufbau erhalten werden, ähnlich aus, allerdings werden bei näherem Hinsehen deutliche Unterschiede erkennbar. Diese sind durch den unterschiedlichen Messaufbau bedingt.

¹ Sämtliche der in dieser Arbeit gezeigten Messungen im LIF-Aufbau, wurden zusammen mit Urs Hilbig durchgeführt. Die Ergebnisse sind in dieser Dissertation unter dem Aspekt der Assayentwicklung gezeigt, bei der Dissertation von Urs Hilbig unter dem Aspekt der Optimierung und Anpassung der Detektionseinheit.

Die Partikelfunktionalisierung mit MPA und die Durchführung der Assays für magnetische Micro- als auch Nanopartikel, inklusive Optimierungsschritte wurden, wie in dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Die anschließende Detektion der Fluoreszenz im LIF-Aufbau übernahm darauf folgend Urs Hilbig. Eine Ausnahme bildet der optimierte Assayablauf für die in Abschnitt 4.2.2.3 gezeigte Kalibrierung, der von Urs Hilbig durchgeführt wurde.

Bei Messungen mit dem Fluoreszenzspektrometer wird zunächst durch die Aufnahme eines Anregungsspektrums die optimale Anregungswellenlänge für den jeweiligen Fluorophor ausgewählt. Die Fluoreszenzanregung erfolgt bei den hier verwendeten Fluorophoren mit geringer Stokes-Verschiebung einige Nanometer unterhalb des Maximums, um zu vermeiden, dass Anregungslicht am Detektor registriert wird. Als Detektor wird ein Photomultiplier verwendet, der eine deutliche Signalverstärkung ermöglicht. Bei der Detektion wird ein Wellenlängenbereich abgefahren (siehe Abbildung 4.29, links). Bei einer bestimmten Wellenlänge wird dann ein Fluoreszenzemissions-Maximum erreicht. Im LIF-Aufbau wird Laserlicht eingestrahlt. Hier muss im Vorfeld ein Fluorophor ausgewählt werden, dessen Anregungswellenlänge möglichst gut zur Wellenlänge des Lasers passt. Durch die hohe eingestrahlte Laserleistung ist es allerdings auch möglich mit einer Wellenlänge deutlich unterhalb des Fluoreszenzanregungsmaximums anzuregen und dadurch Anregungslicht von emittiertem Licht möglichst gut zu trennen. Zusätzlich sorgt der Langpassfilter zwischen Flusszelle und Photodioden dafür, dass nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge zu den Photodioden gelangt. Diese detektieren das emittierte Fluoreszenzlicht für einen bestimmten Wellenlängenbereich, in dem sie sensitiv sind. Das erhaltene Signal ist somit ein Summensignal über mehrere Wellenlängen (ca. 645-740 nm), das zeitabhängig aufgenommen wird. Somit kann zu jedem Zeitpunkt detektiert werden, wieviel Fluorophor sich in der Flusszelle befindet. Für die Auswertung wird entweder das maximale Fluoreszenzsignal, direkt nachdem die Probe die Flusszelle erreicht hat, oder die Fläche unter der Kurve durch Integration des Signals herangezogen. Bei letzterem Vorgehen wird ein längerer Zeitraum, in dem die Probe über die Flusszelle gespült wird, betrachtet und das Rauschen dadurch gemittelt. Die Verwendung des Lasers hat, wie beschrieben, den Vorteil, dass dank der hohen Leistung des Lasers auch außerhalb des Anregungsmaximums des Fluoreszenzfarbstoffs angeregt werden kann und dadurch Anregungslicht gut von emittiertem Fluoreszenzlicht abgetrennt werden kann. Bei permanenter Einstrahlung steigt jedoch auch das Risiko der photochemischen Zersetzung des Fluorophors, das Photobleaching. Bei empfindlichen Fluorophoren wird deshalb der Laser mit einem Shutter versehen, der nur während der Messung für einige Sekunden geöffnet wird. Bei den hier gezeigten Messungen wird der Fluorophor in einem relativ großen Volumen ständig durch die Flusszelle gepumpt und ist damit dem Laserlicht nur kurzfristig ausgesetzt. Deshalb bleibt bei den gezeigten Messungen der Shutter vor dem Laser während der gesamten Messung geöffnet. Luftblasen in der Fluidik und andere Störungen können so vor allem während der Assayentwicklung und Optimierung der Detektion leicht erkannt werden.

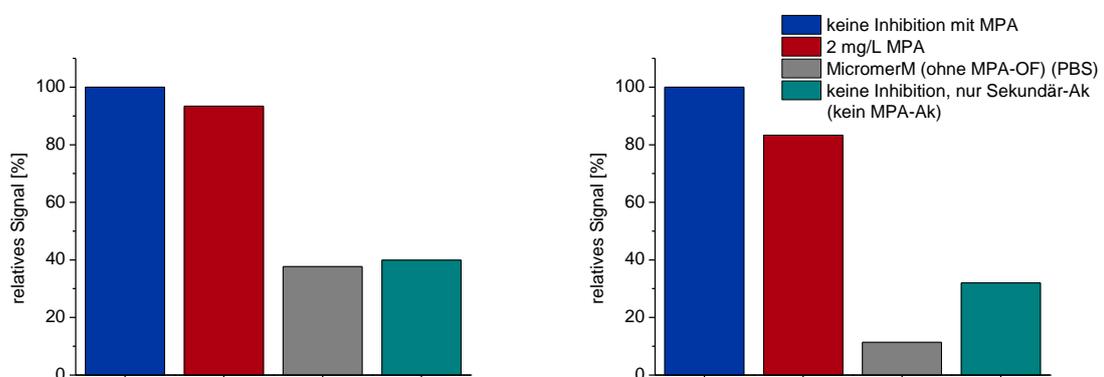


Abbildung 4.30: Auswertung der in Abbildung 4.29 gezeigten Fluoreszenzsignale des Fluoreszenzspektrometers, gemittelt über den Wellenlängenbereich 660-700 nm (links) und des LIF-Aufbaus, gemittelt über den Zeitraum 55-400 s (rechts)

In Abbildung 4.30 sind die Fluoreszenzsignale aus Abbildung 4.29 als Balkendiagramme dargestellt. Die Fläche unter der Kurve der Nullmessung (ohne Inhibition) wird in einem bestimmten Wellenlängenbereich bzw. in einer bestimmten Zeitspanne berechnet und stellt das 100% Signal dar. Die weiteren Messungen inklusive der Inhibitionsmessung liegen wie erwartet unter diesem Signal.

4.2.2.2 Detektion der Fluoreszenz mithilfe eines MPA-Antikörpers, der mit einem fluoreszierenden Silica-Partikel markiert ist

Statt der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper können auch fluoreszierende Silica-Partikel (ScreenCORE-Protein G, 1 μm) eingesetzt werden, auf deren Oberfläche die MPA-Antikörper immobilisiert sind. Pro Partikel sind hier deutlich mehr Fluorophore enthalten als an einem Sekundärantikörper, wodurch das Fluoreszenzsignal erhöht werden kann. Außerdem werden bei diesem Assay ein Inkubations- und ein Waschschrift eingespart, da die MPA-Antikörper bereits mit fluoreszierenden Partikeln gelabelt sind und keine zusätzlichen fluoreszierenden Sekundärantikörper notwendig sind. Vor der Durchführung des Assays werden auf der Protein-G funktionalisierten Oberfläche der ScreenCORE-Partikel 7,83 μg Antikörper pro 10 μL Partikel ($c=2 \text{ g/L}$) immobilisiert. Die Silica-Partikel werden zum Durchführen der Waschschrift durch Zentrifugation abgetrennt.

Die Assays werden in Form eines Bindungshemmtests analog zu den in Abschnitt 4.2.2.1 beschriebenen Assays in einem Eppendorf Cup durchgeführt. Allerdings entfällt der Schritt, bei dem Sekundärantikörper zugegeben wird. Pro Probe werden jeweils 10 μL Silica-Partikel und 10 μL magnetische Partikel zugesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 300 μL . Die Fluoreszenz wird im LIF-Aufbau detektiert. Die durch Integration der Messsignale erhaltenen Fluoreszenzsignale sind in Abbildung 4.31 dargestellt.

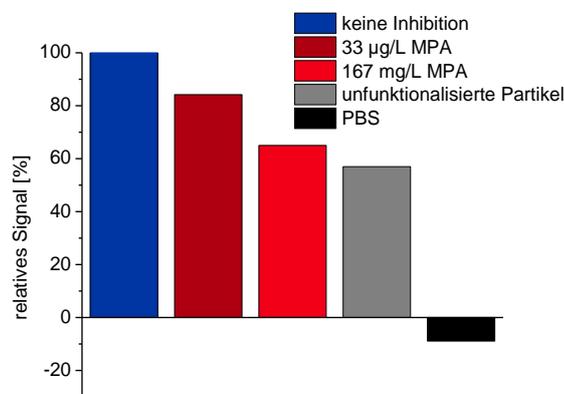


Abbildung 4.31: Fluoreszenzsignale (55–400 s), gemessen im LIF-Aufbau. Als Assayformat wird der Bindungshemmtest verwendet, bei dem fluoreszierende Silica-Partikel mit MPA-Ak an deren Oberfläche mit MPA inkubiert werden. Im zweiten Schritt wechselwirken ungebundene Antikörper mit Analyt auf der Oberfläche magnetischer Partikel.

Vergleicht man die Signale der Assays, bei denen unfunktionalisierte Partikel mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert werden, miteinander, wird deutlich, dass unspezifische Wechselwirkungen durch den Einsatz der Silica-Partikel deutlich zunehmen. Die Silica-Partikel führen außerdem zu zusätzlichen Streueffekten des Anregungslichts. Dadurch wird die Signaldynamik negativ beeinflusst. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Größe der Partikel die Diffusion im Puffer deutlich langsamer ist als bei reinem Antikörper. Dadurch verlängert sich die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts der Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper und damit auch der gesamte

Assayablauf. Aus diesen Gründen wird bei den folgenden Messungen wieder auf die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern zurückgegriffen.

Bei der Durchführung der Partikel-basierten Assays ist vor allem das Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen problematisch. Zum einen nimmt dadurch die Signaldynamik ab, zum anderen führt die unspezifische Wechselwirkung der Partikel mit Teilen der Fluidik zu einer verminderten Reproduzierbarkeit. Das Blocken der Fluidik, zum Beispiel mit Gelatinelösung und die Abschirmung der Partikeloberfläche mit Biopolymeren wie zum Beispiel PEG sind deshalb sehr wichtig, um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren. Außerdem stellt die manuelle Durchführung der Assays eine Fehlerquelle dar. Durch den Permanentmagneten werden die Partikel während der Waschschriffe an der Gefäßwand festgehalten, sodass der Überstand mit einer Pipette vorsichtig entfernt und durch Puffer wieder aufgefüllt werden kann. Dabei kann es auch bei sorgfältigem Pipettieren zu einem leichten Verlust an Magnetpartikeln kommen. Um diesen Verlust minimal zu halten, ist es von Vorteil möglichst wenige Waschschriffe durchzuführen und bei diesen die Flüssigkeit möglichst vorsichtig zu entnehmen, um die Magnetpartikel am Gefäßrand nicht aufzuwirbeln.

4.2.2.3 Konzentrationsabhängige Messungen mit Mikropartikeln

Optimierungen des LIF-Aufbaus und des Assayablaufs, vor allem die Verwendung eines Fc-spezifischen anti-IgG als Sekundärantikörper, ermöglichen schließlich eine Kalibrierung des MPA-Assays. Um möglichst hohe Fluoreszenzsignale zu erhalten, wird das Assayvolumen bzw. das Volumen, in dem die Partikel zuletzt suspendiert werden, auf 100 μL reduziert. Zusätzlich werden die Partikel während der Fluoreszenzmessung mithilfe eines Permanentmagneten, der gegenüber den Photodioden angeordnet ist, angereichert. Pro Probe werden 3 μL magnetische Partikel zugesetzt.

Zu Beginn der Messreihe werden mögliche unspezifische Wechselwirkungen der Assaybestandteile überprüft. Die Messungen sind in Abbildung 4.32 dargestellt.

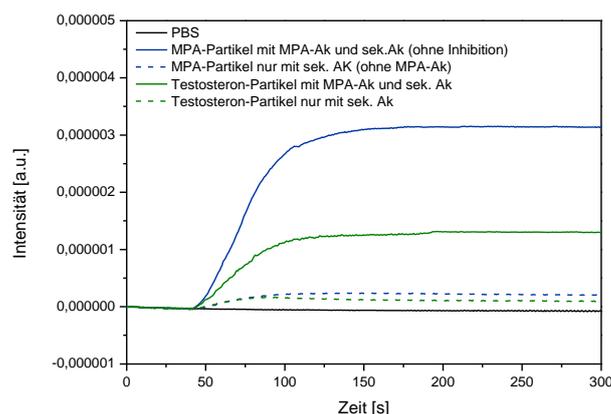


Abbildung 4.32: Prüfung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen der mit Testosteron funktionalisierten Partikeloberfläche und dem MPA-Antikörper und zwischen der mit-MPA-Antikörper funktionalisierten Partikeloberfläche und dem fluoreszierenden Sekundärantikörper.

Die MPA-Partikel zeigen nach Zugabe von MPA-Antikörper und Sekundärantikörper das höchste Fluoreszenzsignal. Durch die Verwendung des Permanentmagneten an der Flusszelle nimmt das Fluoreszenzsignal nach dem Erreichen des Maximums nicht ab, sondern erreicht nach ca. 100 Sekunden eine Sättigung. Erst durch eine hohe Flussrate werden die magnetischen Partikel aus der Flusszelle

entfernt. Werden bei der Durchführung des Assays nur die Sekundärantikörper zu den MPA-Partikeln gegeben, so ist das erhaltene Signal sehr gering. Der Fluorophor wechselwirkt nur geringfügig mit der Partikeloberfläche. Werden nun die Magnetpartikel mit Testosteronoxim statt MPA funktionalisiert, zeigt sich, dass der MPA-Antikörper in begrenztem Maße an diese Partikel bindet, jedoch weniger stark als an MPA-Partikel. Die Höhe dieses Signals entspricht ungefähr der in Abbildung 4.33 dargestellten maximalen Inhibition mit 10 mg/L MPA und stellt damit die unspezifische Wechselwirkung des MPA-Antikörpers zur Partikeloberfläche dar.

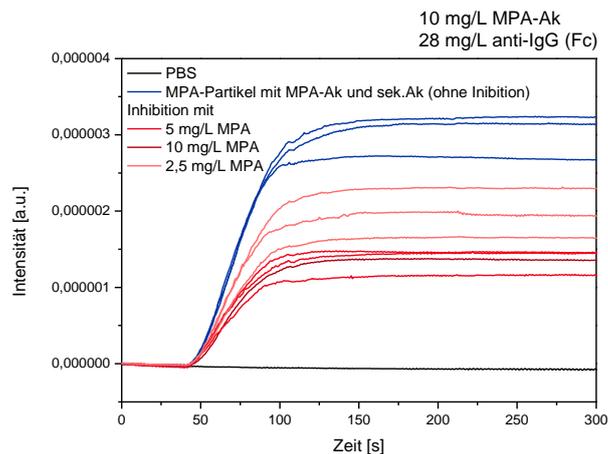


Abbildung 4.33: Fluoreszenzsignale, erhalten aus der Bindung der freien MPA-Antikörper zu den MPA-Partikeln (Bindungshemmtest).

Die Fluoreszenzsignale können auf zwei Arten ausgewertet werden; durch Integration in einem bestimmten Zeitfenster oder durch eine lineare Anpassung der Anfangssteigung des Fluoreszenzsignals im Flusskanal.

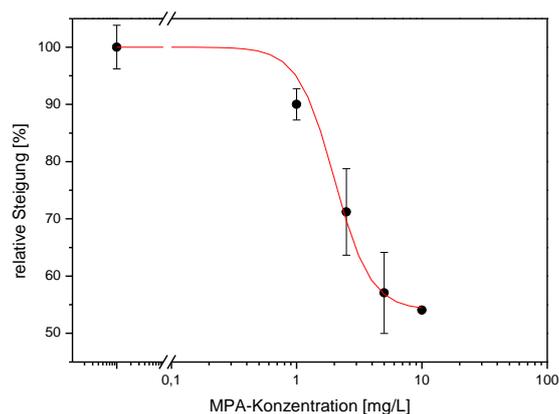


Abbildung 4.34: Kalibrierung des Mycophenolsäure-Assays auf der Oberfläche von Mikropartikeln. Die Anfangssteigungen des Fluoreszenzsignals sind dazu gegen die MPA-Konzentration aufgetragen.

Die in Abbildung 4.34 dargestellte Kalibrierkurve geht aus der Auswertung der Anfangssteigung hervor. Unterschiedliche Konzentrationen wurden je dreimal vermessen und die Kurve mit einer 4-Parameter logistischen Fit-Funktion angepasst. Die verwendeten MPA-Konzentrationen sind sehr hoch gewählt und sollen das Funktionsprinzip des fluoreszenzbasierten Assays auf der Oberfläche magnetischer Partikel zeigen. Zu erkennen ist, dass eine vollständige Inhibition des Antikörpers dennoch zu einer Steigung von

circa 50% des Ausgangssignals führt. Dieser hohe Anteil an Hintergrundsignal kann entweder auf Streueffekte oder auf unspezifische Wechselwirkungen des inhibierten MPA-Antikörpers zur Partikeloberfläche zurückgeführt werden. Um eine bessere Reproduzierbarkeit und damit kleinere Standardabweichungen zu erhalten, sind sowohl für den Assay als auch für die Detektion der Fluoreszenz durch LIF Optimierungen nötig. Diese bestehen auch hier hauptsächlich in der Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen mit sämtlichen verwendeten Materialien.

4.2.2.4 Konzentrationsabhängige Messungen mit Nanopartikeln

Magnetische Nanopartikel unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von Magnetpartikel mit Durchmessern im Mikrometer-Bereich. Bei der Fluoreszenzdetektion spielen unterschiedliche Streueffekte eine große Rolle. Geht man von sichtbarem Licht aus, ist bei Mikropartikeln die nur leicht wellenlängenabhängige Mie-Streuung zu beobachten. Diese geht bei kleineren Partikeln mit einem Durchmesser unter 50 nm in die stark wellenlängenabhängige Rayleigh-Streuung über.

Da magnetische Nanopartikel besondere magnetische Eigenschaften (Superparamagnetismus) besitzen, reicht ein einfacher Permanentmagnet nicht aus, um die Partikel aus dem Volumen zu einer Seite zu ziehen. Deshalb werden bei diesen Partikeln während der Waschschriffe MS-Säulen der Firma Miltenyi Biotec verwendet, um die Partikel festzuhalten. In diesen mit Stahlkugeln gefüllten Säulen entsteht mithilfe eines Permanentmagneten ein Hochgradient-Magnetfeld, in dem selbst Partikel mit Durchmessern unter 100 nm festgehalten werden können. Die Funktionalisierung der Partikel mit MPA geschieht wie in Abschnitt 3.1.2.3 beschrieben. Der Assay wird als Bindungshemmtest durchgeführt analog zum Assay mit magnetischen Mikropartikeln (Abschnitt 4.2.2.3). Allerdings werden nun im ersten Schritt die MPA-Antikörper mit den Sekundäntikörpern inkubiert, anschließend die MPA zugegeben und nach einer weiteren Inkubation die Partikel hinzugegeben. Dadurch wird nur ein Waschschriffe statt der zuvor benötigten zwei erforderlich, was zu einem geringeren Verlust an Partikeln und somit zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit führt. Die verwendeten Nanopartikel ($\varnothing 50$ nm) können in der Flusszelle durch den Permanentmagneten nicht gegenüber der Flusszelle positioniert werden. In Abbildung 4.35 ist dies indirekt erkennbar, da das Signal nach der Probeninjektion wieder nahezu vollständig zur Basislinie zurückkehrt.

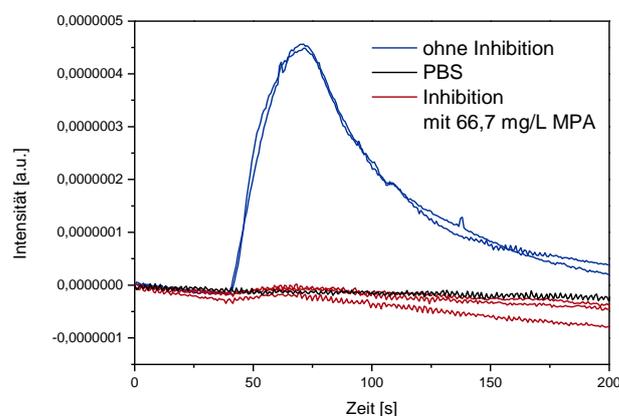


Abbildung 4.35: Messungen mit Nanopartikeln: Inhibition des Fluoreszenzsignals durch Zugabe von MPA

Bei der Durchführung eines Bindungshemmtests, kann durch Zugabe von Mycophenolsäure das Signal inhibiert werden. Ein bedeutender Unterschied zu Assays mit Mikropartikeln ist, dass hier bei Zugabe

einer hohen MPA-Konzentration und damit der vollständigen Inhibition des Antikörpers, das gemessene Signal praktisch 0 wird. Es treten keine relevanten unspezifischen Wechselwirkungen zu den Partikeln auf.

4.2.3 Kurzzusammenfassung des Kapitels 4.2

Als Modellsystem für die Übertragung der Assays auf die Oberfläche magnetischer Partikel wurde die Mycophenolsäure ausgewählt. Als Assayformat eignet sich der Bindungshemmtest, bei dem der Analyt auf der Oberfläche magnetischer Partikel mit einem Durchmesser von 3 μm und einer mit PEG abgeschirmten Oberfläche, immobilisiert wird. Die Analyt beinhaltende Probe wird mit MPA-Antikörper inkubiert und ein fluoreszierender anti-IgG-Antikörper (Sekundärantikörper) zur Entwicklung eingesetzt. Alternativ werden fluoreszierende Silica-Partikel mit immobilisiertem MPA-Antikörper auf der Oberfläche mit der Probe inkubiert. Bei beiden Assays kann gezeigt werden, dass eine Beziehung zwischen der MPA-Konzentration in der Probe und dem gemessenen Fluoreszenzsignal besteht. Eine erste Kalibrierung wird für einen modifizierten Assay unter Verwendung fluoreszierender Sekundärantikörper erhalten.

Tabelle 4.5: Übersicht über vorgestellte Partikel-basierte Fluoreszenzassays

Antikörper auf Partikeloberfläche			
Partikelgröße	Oberfläche	Markierungsmolekül	Ergebnis
250nm	-PEG-COOH	MPA-Nilblau	Inhibition im RfS sichtbar, kein Fluoreszenzsignal detektierbar
3 μm	-COOH	MPA-Nilblau	unspez. Wechselwirkung des Farbstoffs zum Partikel
	-PEG-COOH	MPA-Nilblau	keine unspez. Wechselwirkung, aber Bindung des MPA-Nilblau nicht inhibierbar
Antigen auf Partikeloberfläche			
Partikelgröße	Oberfläche	Markierungsmolekül	Ergebnis
3 μm	-PEG-NH ₂	MPA-Ak/Anti-IgG*	Kalibrierung möglich
		MPA-Ak/ScreenCORE-ProteinG	hohe unspezifische Wechselwirkung
50 nm	-PEG-NH ₂	MPA-Ak/Anti-IgG*	konzentrationsabhängige Messungen möglich, niedriges Fluoreszenzsignal

4.3 M2-Protonenkanal

Mit Hilfe der ITC werden Untersuchungen der Wechselwirkungen verschiedener Liganden, die sich von der Grundstruktur vom Amantadin ableiten, zum M2-Protonenkanal durchgeführt. Die Durchführung dieser ITC-Messungen ist in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Zur Vereinfachung des Systems werden hierbei, wie in Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben, Peptide (M2₁₈₋₆₀) verwendet, die sich zusammenlagern und dadurch die Pore nachbilden. Aufwändige Expressionen des Membranproteins werden dabei vermieden. Peptide für den M2TM-Wildtyp Udorn und die Mutante S31N werden verwendet und deren Wechselwirkung mit verschiedenen Amantadin-Derivaten wird untersucht. Zusätzlich werden am Beispiel von Rimantadin auch die Affinitäten der einzelnen Enantiomere (R,S) zu Udorn verglichen. Die Durchführung bei verschiedenen Temperaturen ermöglicht es, Erkenntnisse über die Wärmekapazität zu gewinnen.

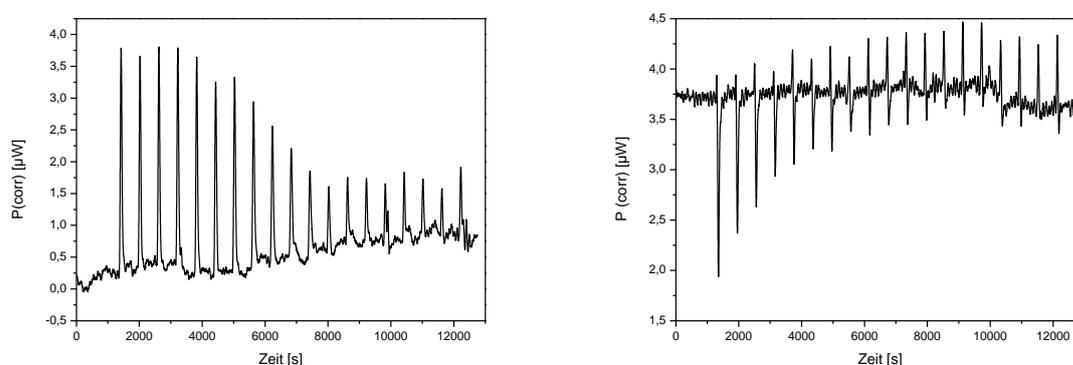


Abbildung 4.36: ITC-Messungen: Beispiele für eine detektierte Wärmeleistung bei einer exothermen (links) bzw. einer endothermen Reaktion (rechts)

Nach Anpassen einer Titrationskurve (siehe Abschnitt 3.2.2), an die aus der ITC erhaltenen Daten, die beispielhaft in Abbildung 4.36 gezeigt sind, lassen sich daraus die Enthalpie ΔH und die Dissoziationskonstante K_D entnehmen. Daraus können weitere thermodynamische Parameter, wie die freie Enthalpie ΔG und Entropie ΔS der untersuchten Wechselwirkung ermittelt werden.² Zugrunde liegen die im Theorieteil beschriebenen Gleichungen Gl. 2-42 und Gl. 2-43.

² Die im Folgenden gezeigten Messungen der Wechselwirkung zwischen der M2TM und verschiedenen Liganden wurden größtenteils analog der in der Dissertation von Felix Kolarov [80] optimierten Messbedingungen bei pH 8 und 20°C durchgeführt. Für die Auswertung wurde die dort gezeigte Anpassungsfunktion für Origin verwendet. Die verwendeten Liganden wurden, abgesehen von den reinen Enantiomeren des Rimantadin, von der AG Prof. Kolocouris synthetisiert. Außerdem wurde in der AG Prof. Kolocouris ein Bindungsmodell entwickelt, um durch molekulardynamische Simulation und FEP-Berechnungen Voraussagen der Wechselwirkung der Liganden zum M2TM treffen zu können.

Tabelle 4.6: Thermodynamische Parameter der Wechselwirkung des M2TM-Wildtyps Udorn mit verschiedenen Liganden. Die aus der Anpassung der ITC-Daten mit Origin erhaltenen Parameter sind in Tabelle 7.1 im Anhang dargestellt. Für die Anpassung wird ein globaler Fit verwendet, bei dem alle drei Parameter geteilt werden. Die angegebenen Fehler (u) gehen aus der Unsicherheit der Parameter durch das Anpassen der Daten hervor. Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 20°C=293,15 K durchgeführt.

Ligand	$\Delta G^{293\text{ K}}$ [kJ/mol]	$u(\Delta G^{293\text{ K}})$ [kJ/mol]	K_D [μM]	$u(K_D)$ [μM]	$\Delta H^{298\text{ K}}$ [kJ/mol]	$u(\Delta H^{298\text{ K}})$ [kJ/mol]	$\Delta S^{298\text{ K}}$ [J/mol·K]	$u(\Delta S^{298\text{ K}})$ [J/mol·K]	$-\Delta S^{298\text{ K}}$ [kJ/mol]	$u(-\Delta S^{298\text{ K}})$ [kJ/mol]
37	-31,05	0,82	2,93	0,98	-44,39	4,98	-45,50	17,22	13,34	5,05
40	-30,17	1,25	4,20	2,15	-14,32	2,43	54,08	9,33	-15,85	2,73
35	-27,34	1,40	13,46	7,75	12,45	3,21	135,72	11,96	-39,79	3,51
59	-33,96	1,08	0,89	0,39	-22,13	1,59	40,34	6,55	-11,38	1,92
60	-30,55	1,06	3,60	1,56	-12,40	1,28	61,92	5,66	-18,15	1,66
61	-31,00	0,50	2,99	0,59	-25,05	1,04	20,31	3,93	-5,95	1,15
R-Rim	-35,62	0,78	0,45	0,14	-32,21	1,33	11,62	5,25	-3,41	1,54
S-Rim	-34,13	1,04	0,83	0,35	-41,23	4,16	-24,24	14,64	7,11	4,29

R-Rim	ΔG^T [kJ/mol]	$u(\Delta G^T)$ [kJ/mol]	K_D [μM]	$u(K_D)$ [μM]	ΔH^T [kJ/mol]	$u(\Delta H^T)$ [kJ/mol]	ΔS^T [J/mol·K]	$u(\Delta S^T)$ [J/mol·K]	$-\Delta S^T$ [kJ/mol]	$u(-\Delta S^0)$ [kJ/mol]
T=298,15 K	-36,86	0,85	0,27	0,09	-28,46	0,86	28,66	4,11	-8,40	1,20
T=303,15 K	-36,37	0,69	0,33	0,09	-46,20	1,26	-33,52	4,92	9,83	1,44

4.3.1 Udorn

4.3.1.1 Ergebnisse für die Liganden 35, 37 und 40

Die Liganden 35, 40 und 37 (siehe Abschnitt 3.2.3) besitzen alle ein Aminoadamantan-Grundgerüst, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren lipophilen Resten. Unterschiede zwischen Alkyl-, Cycloalkyl- und aromatischen Resten werden hier deutlich.

Wie in Abbildung 4.37 dargestellt, besitzen alle drei Liganden eine negative freie Enthalpie in ähnlicher Höhe. Dennoch unterscheiden sie sich enorm in den Beiträgen der Enthalpie und Entropie zur Wechselwirkung. Bis auf Ligand 35 wird bei der Bindung aller Liganden zu Udorn Wärme freigesetzt (exotherme Reaktionen). Die endotherme Wechselwirkung bei Ligand 35 wird durch eine große Entropiezunahme ausgeglichen. Die Wechselwirkung ist entropisch dominiert. Bei Ligand 40 sind der enthalpische und der entropische Beitrag zur Wechselwirkung etwa gleich groß. Bei Ligand 37 überwiegt der enthalpische Beitrag den entropischen deutlich. Hieraus wird deutlich, dass die Wechselwirkung der Aminoadamantan-Derivate zum M2TM-Tetramer entschieden von der Größe und Art des Restes abhängt. Im folgenden Abschnitt werden die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Strukturen und ihrer Wechselwirkung zu Udorn (Wildtyp) näher betrachtet.

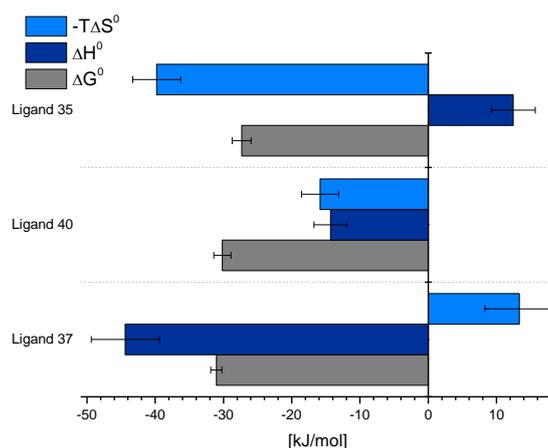
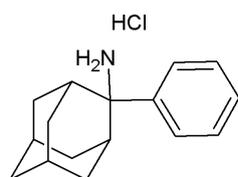


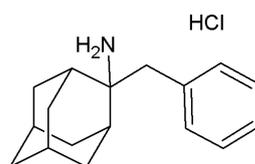
Abbildung 4.37: Thermodynamisches Profil der Wechselwirkung der Liganden 35, 40 und 37 mit Udorn

4.3.1.2 Ergebnisse für die Liganden 39 und 40

Die beiden Liganden Ligand 39 und Ligand 40 unterscheiden sich strukturell nur in einer CH_2 -Gruppe, die den Abstand des Phenylrestes zum Adamantan-Grundgerüst vergrößert.



Ligand 39



Ligand 40

Abbildung 4.38: Strukturformeln der Liganden 39 und 40

Ligand 39 zeigt keine messbare Wechselwirkung mit Udorn, wohingegen Ligand 40 eine deutliche Affinität aufweist (Abbildung 4.39). Die Einführung des zusätzlichen Abstands zwischen Adamantan und Phenylrest ist wichtig, um die Bindung zu ermöglichen. Durch den Abstand kann sich der Phenylrest flexibler bewegen und eine für eine Bindung optimale Position einnehmen.

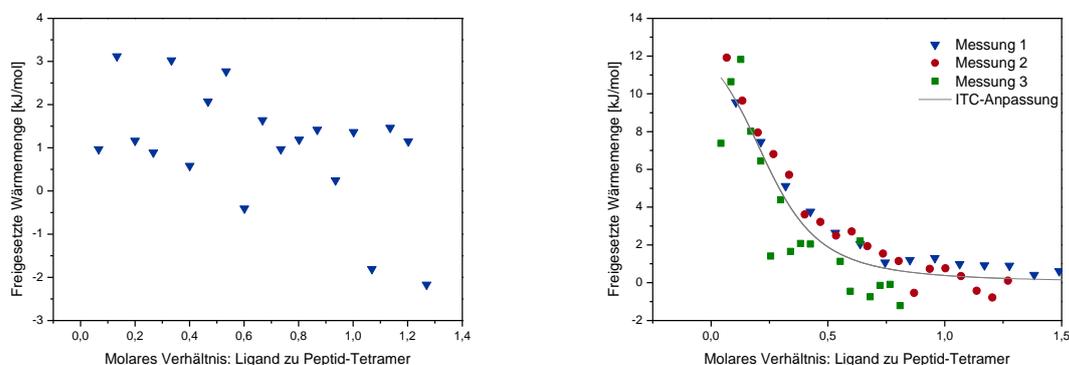
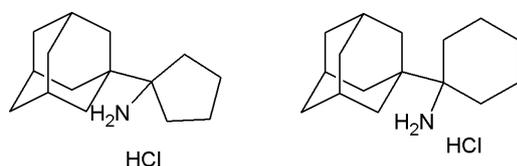


Abbildung 4.39: Titrationskurve Ligand 39 (links) und Ligand 40 (rechts) mit Udorn

4.3.1.3 Ergebnisse für die Liganden 35, 36

Die beiden Liganden 35 und 36 unterscheiden sich hinsichtlich der Ringgröße des Restes. Ligand 35 besitzt eine Cyclopentanrest, Ligand 36 einen Cyclohexanrest.



Ligand 35

Ligand 36

Abbildung 4.40: Struktur der Liganden 35 und 36

Eine Besonderheit bei der Messung von Ligand 35 ist die negative freigesetzte Wärme (siehe Abbildung 4.41), das heißt es handelt sich um eine endotherme Reaktion mit einer positiven Bindungsenthalpie. Bei allen weiteren in dieser Arbeit vermessenen Liganden wird bei der Reaktion mit Udorn Wärme freigesetzt (exotherme Reaktion), was prinzipiell auch für diesen Liganden zu erwarten wäre.

Die Affinität des Liganden 35 ist relativ gering im Vergleich zum (unsubstituierten) Rimantadin. Bei Ligand 36 ist keine Wechselwirkung detektierbar. Durch die Vergrößerung des Rings geht die Affinität zum Rezeptor vollständig verloren.

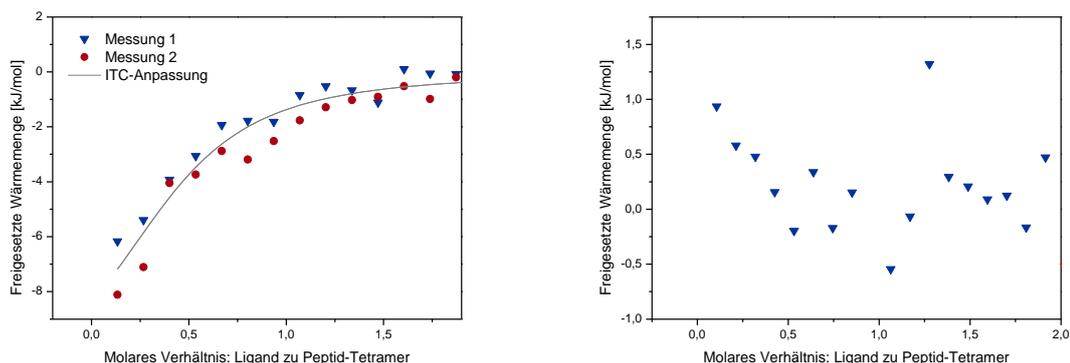


Abbildung 4.41: Titrationskurve Ligand 35 (links) und Ligand 36 (rechts) mit Udorn

Sowohl der Cyclohexan substituierte Ligand 36 als auch der mit einem Phenylrest aromatisch substituierte Ligand 39 zeigen keine Wechselwirkung mit Udorn. Entscheidend ist demnach allein die Größe bzw. Raumforderung des Restes. Aromatizität stellt bei der Ausbildung zusätzlicher Wechselwirkungen keine entscheidende Rolle.

4.3.1.4 Ergebnis für Ligand 37

Ligand 37 ist ein n-Alkyl-Adamantan-Derivat mit einem Butylrest. Die Titrationskurve zu Udorn ist in Abbildung 4.42 dargestellt.

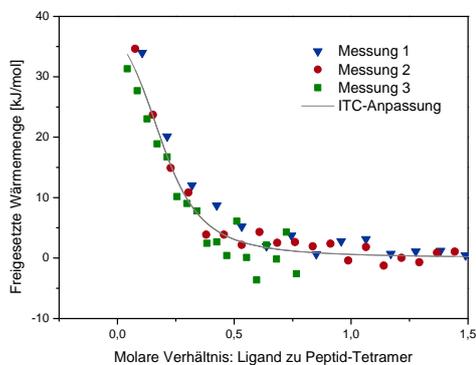
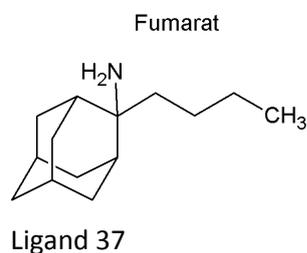


Abbildung 4.42: Struktur des Liganden 37 und dessen Titrationskurve mit Udorn

In früheren Arbeiten [80] wurde die Wechselwirkung von Liganden mit kürzeren Alkylresten ($n=0$ bis $n=3$) mit Udorn untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Affinität und damit auch die freie Enthalpie mit zunehmender Kettenlänge des Alkylrests zunächst zunehmen und dann bei einem Propylrest im Vergleich zum Ethylrest stagnieren bzw. leicht abnehmen. In Tabelle 4.7 sind die Zusammenhänge zwischen Kettenlänge der Alkylreste und thermodynamischen Parametern der Wechselwirkung aufgelistet.

Tabelle 4.7: Zusammenhang zwischen Länge des Alkylrests des Adamantan-Derivats mit der Bindungsenthalpie, -entropie und Affinität zu Udorn. Werte n=0 bis n=3 sind [80] entnommen

Alkylrest n	Freie Enthalpie $\Delta G^{298\text{K}}$ [kJ/mol]	Bindungsenthalpie $\Delta H^{298\text{K}}$ [kJ/mol]	K_D [μM]	$-T\Delta S^{298\text{K}}$ [kJ/mol]
n=0 (Lig 8)	-32,52	-40,27	1,60	7,75
n=1 (Lig 9)	-33,96	-27,78	0,89	-6,18
n=2 (Lig 10)	-34,83	-29,20	0,62	-5,64
n=3 (Lig 11)	-34,52	-35,17	0,71	0,65
n=4 (Lig 37)	-31,05	-44,39	2,93	13,34

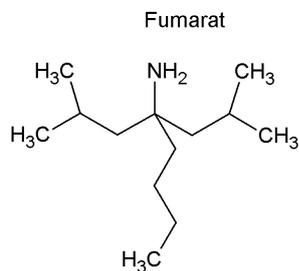
Der Butylrest bei Ligand 37 führt zu einer deutlich verminderten Affinität im Vergleich zu Liganden mit kürzeren Alkylresten. Sie liegt sogar etwas niedriger als bei Ligand 8 ($n_{\text{Alkyl}}=0$). Die Bindungsenthalpie in dieser Reihe ist bei Ligand 37 am höchsten. Die Bindungsentropie ist für Ligand 37 negativ, sogar noch stärker ausgeprägt als bei Ligand 8 ($n=0$). Für alle Liganden ist der enthalpische Anteil bei der Wechselwirkung mit Udorn deutlich höher als der entropische.

Wie schon in [80] beschrieben, wird durch die Zunahme der Kettenlänge des Alkylsubstituenten zwischen Ligand 8 und 9 zunächst die Bindungsenthalpie geringer, da die Wasserstoffbrücken zur Aminogruppe reduziert werden. Mit zunehmender Kettenlänge des Alkylrests nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen zu. Mit zunehmender Kettenlänge kommt es außerdem zu einer Entropieerhöhung, da stark ausgerichtete Solvensmoleküle freigesetzt werden. Bei immer weiter zunehmender Kettenlänge werden die Unterschiede in der Hydrophobizität der Liganden immer geringer. Bei Ligand 11 ist zu beobachten, dass hier durch die beengte Position des Liganden bei der Bindung in der Pore mit einer deutlichen Einschränkung der Freiheitsgrade einhergeht. Diese können durch den Entropiegewinn durch die Zunahme der Freiheitsgrade des Solvens nicht mehr kompensiert werden. Die Affinität nimmt trotz enthalpisch günstiger Bindungsposition ab.

Durch die zunehmende Länge des Alkylsubstituenten setzt sich der oben beschriebene Trend, der sich bei Ligand 11 gezeigt hat, bei Ligand 37 fort. Die Bindung von Ligand 37 zum Tetramer ist enthalpisch günstig, dennoch nimmt die Affinität im Vergleich zu Liganden mit kürzeren Alkylresten deutlich ab. Dies ist auf die deutliche Einschränkung der Freiheitsgrade des Liganden bei der Bindung in der Pore zurückzuführen, was zu einer Verminderung der Entropie führt.

4.3.1.5 Ergebnis für Ligand 54

Der Ligand 54 besitzt kein Adamantan-Grundgerüst. Allerdings kann dem Molekül genauso wie Amantadin eine polare Amin-Kopfgruppe und ein apolarer Rest zugeordnet werden. Obwohl die Länge der Alkylreste in ihrer Länge ungefähr ein Adamantan nachbildet, ist wie in Abbildung 4.43 zu erkennen, keine Affinität zu Udorn messbar. Vor allem die Beweglichkeit der Alkylreste unterscheidet sich im Vergleich zum Adamantan.



Ligand 54

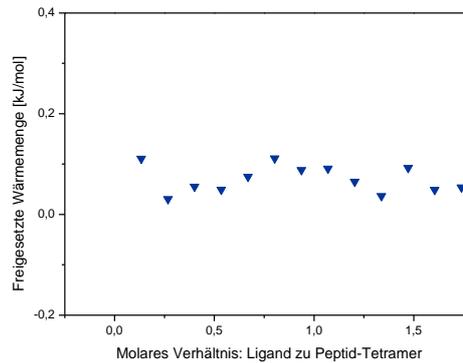


Abbildung 4.43: Struktur des Liganden 54 (links) und dessen Titrationskurve mit Udorn

4.3.1.6 Ergebnisse für die Liganden 59, 60 und 61

Die Liganden 59, 60 und 61 besitzen verzweigte Alkylreste mit zunehmender Länge. Die Titrationskurven sind in Abbildung 4.45 dargestellt.

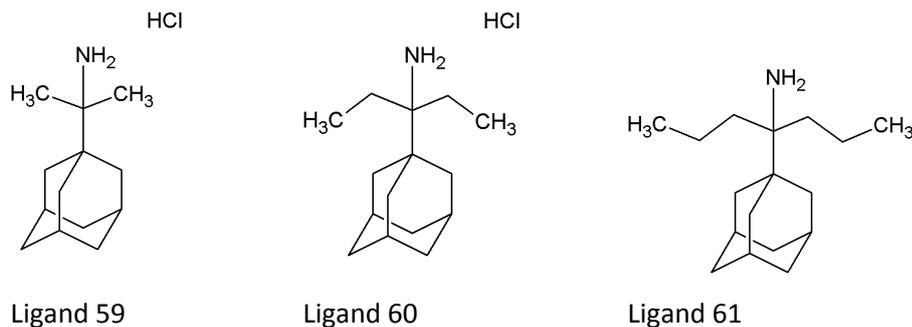


Abbildung 4.44: Struktur der Liganden 59, 60 und 61

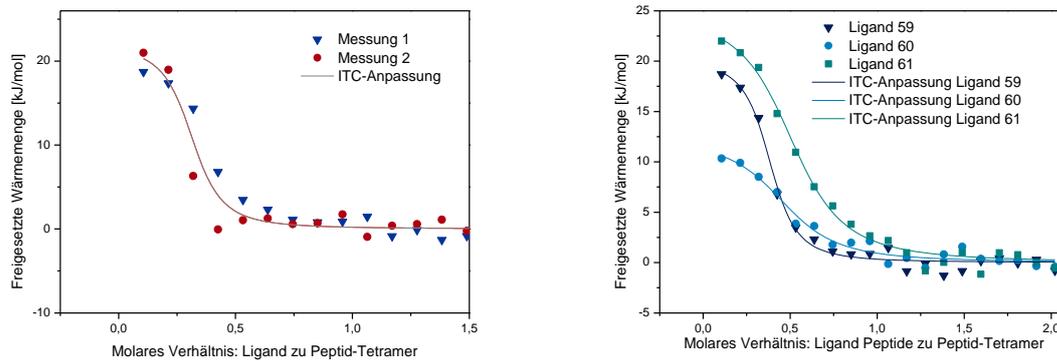


Abbildung 4.45: Titrationskurven von Ligand 59 als Mehrfachmessung (links) und Liganden 59, 60 und 61 jeweils als Einfachmessung im Vergleich (rechts). Die Liganden 60 und 61 waren bei der Ankunft im Labor nicht mehr kristallin, sondern ölige Flüssigkeiten und dem Gefäß schwer zu entnehmen. Deshalb wurde mit der gesamten Substanzmenge jeweils eine einzige Messung durchgeführt.

In Abbildung 4.46 sind entropische und enthalpische Anteile der Wechselwirkungen der Liganden mit Udorn gezeigt, die aus den Titrationskurven erhalten werden. In Tabelle 4.8 sind die Zusammenhänge zwischen der Größe des verzweigten Alkylrests des Adamantan-Derivats und den thermodynamischen Parametern der Wechselwirkung dargestellt.

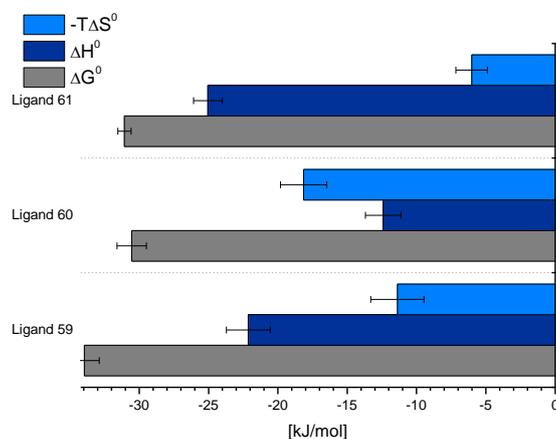


Abbildung 4.46: Thermodynamisches Profil der Wechselwirkung zwischen den Liganden 59, 60 und 61 und Udorn

Tabelle 4.8: Zusammenhang zwischen der Länge des verzweigten Alkylrests des Adamantan-Derivats mit der Bindungsenthalpie, -entropie und Affinität zu Udorn.

Verzweigte Alkylreste der Länge n	Bindungsenthalpie ΔH^{293K} [kJ/mol]	K_D [μM]	$-T\Delta S^{293K}$ [kJ/mol]
Rimantadin (aus [80])	-22,32	0,81	-11,88
n=1 (Lig 59)	-22,13	0,89	-11,83
n=2 (Lig 60)	-12,40	3,60	-18,15
n=3 (Lig 61)	-25,05	2,99	-5,95

Deutlich sichtbar ist eine Abnahme der Affinität zu Udorn zwischen Ligand 59, das zwei Methylreste besitzt, und Ligand 60 mit zwei Ethylresten. Die Affinität von Ligand 61 mit zwei Propylresten ist sehr ähnlich zu Ligand 60. Die freie Enthalpie dieser beiden Liganden bei einer Wechselwirkung mit Udorn ist sehr ähnlich. Die drei Liganden unterscheiden sich in der Bindungsenthalpie, die bei Ligand 61 am höchsten ist. Die Entropie ist bei Ligand 61 am niedrigsten. Sowohl die Wechselwirkung von Ligand 59 als auch von Ligand 61 ist enthalpisch dominiert, bei Ligand 60 überwiegt der entropische Anteil leicht.

Bei den Liganden mit verzweigten Alkylresten tritt ein ähnliches Phänomen auf wie bei den Liganden mit nicht-verzweigten Alkylresten zunehmender Länge. Durch die Reduktion der Wasserstoffbrücken zur Aminogruppe nimmt die Bindungsenthalpie erst ab, dann mit zunehmender Länge der Alkylsubstituenten durch die Zunahme der hydrophoben Wechselwirkungen wieder zu. Das verstärkte Freiwerden von

Solvensmolekülen der Bindungstasche führt zu einem starken Entropiegewinn, was beim Vergleich zwischen Ligand 59 und 60 auffällt. Auch hier führt eine weitere Vergrößerung der Alkylreste bei Ligand 61 zu einer enthalpisch begünstigten Bindung, der Entropiegewinn nimmt allerdings durch eine Abnahme der Freiheitsgrade des Liganden in der engen Bindungstasche ab.

Im Vergleich zu den zuvor untersuchten n-Alkyl-Adamantan-Derivaten, sitzt bei Ligand 59, 60 und 61 eine zusätzliche CH₂-Gruppe zwischen dem Adamantan-Gerüst und der Aminogruppe, wie es auch bei dem hochaffinen Rimantadin der Fall ist. Bei Ligand 59, mit nur einer zusätzlichen Methylgruppe sind die thermodynamischen Parameter inklusive der Affinität im Vergleich zum Rimantadin praktisch gleich. Hier wird durch eine Verlängerung der Kettenlänge allerdings sofort eine Abnahme der Affinität beobachtet und nicht wie bei den n-Alkyl-Adamantan-Derivaten eine Zunahme bei kurzen Alkylsubstituenten.

4.3.1.7 Ergebnisse für die Enantiomere des Rimantadin

Der in einigen Ländern als Arzneistoff zugelassene Wirkstoff Rimantadin besitzt eine sehr hohe Affinität zum Wildtyp des M2-Protonenkanals. In früheren Arbeiten wurde Rimantadin als Enantiomergemisch vermessen. Um zu überprüfen welchen Anteil die beiden Rimantadin-Enantiomere zur gesamten Wechselwirkung haben, wird die Wechselwirkung der einzelnen Enantiomere mit Udorn bestimmt. Die Strukturformeln der Enantiomere und die jeweiligen Titrationskurven sind in Abbildung 4.47 dargestellt.

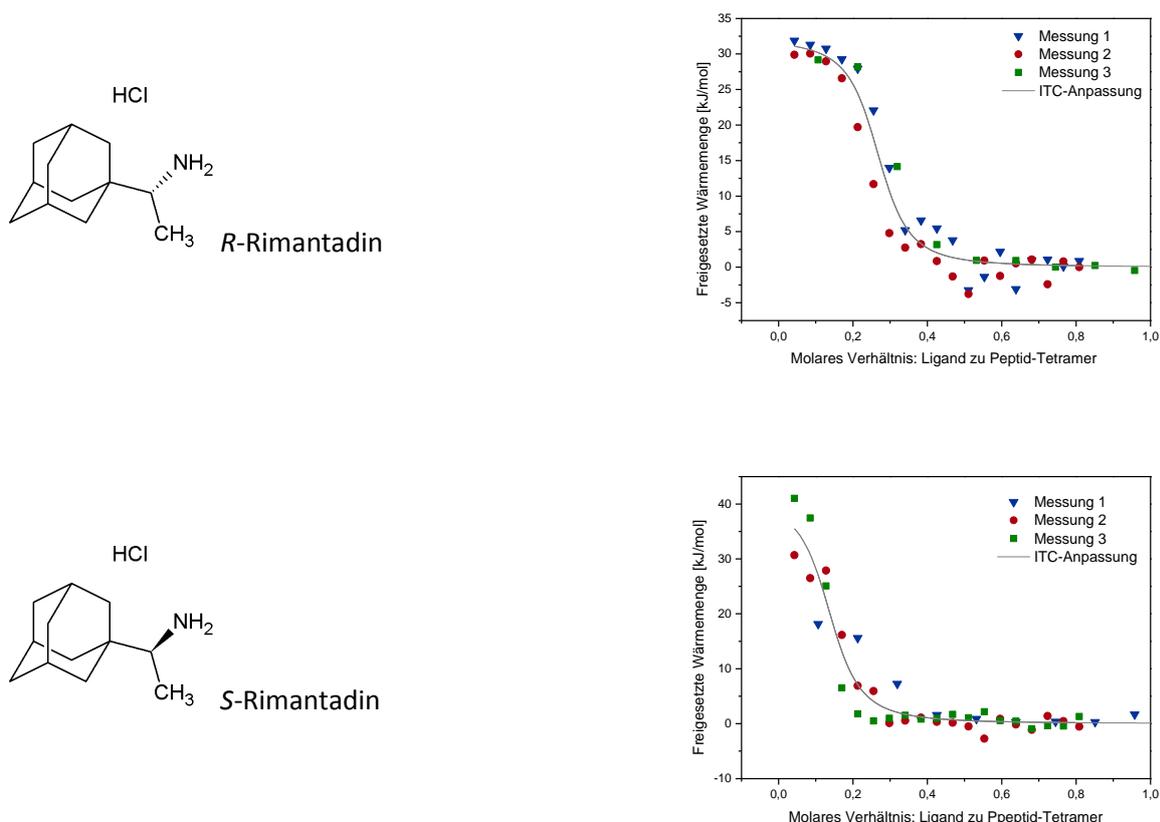


Abbildung 4.47: Strukturformel und Titrationskurve von R-Rimantadin (oben) bzw. S-Rimantadin (unten) mit Udorn

Die Rimantadin-Enantiomere weisen eine sehr hohe Bindungsenthalpie und Affinität zu Udorn auf. Beide Enantiomere besitzen sehr ähnliche Affinitäten zum M2-Protonenkanal. Sie kommen zu etwa gleichen

Teilen im Enantiomergemisch vor und tragen damit auch beide zur Gesamtaffinität des Rimantadin bei. Bei der Dreifachmessung von S-Rimantadin ist zu beobachten, dass sich die freigesetzten Wärmemengen der drei Messungen vor allem zu Beginn der Titration deutlich unterscheiden und eine globale Anpassung sehr schwierig machen. Beachtet man die grünen Messpunkte in Abbildung 4.47, weisen diese auf eine hohe Bindungsenthalpie hin, die blauen im Vergleich dazu auf eine deutlich niedrigere. Verwendet man eine unabhängige Anpassung der Kurven und mittelt diese, werden sehr ähnliche thermodynamische Parameter wie beim R-Enantiomer erhalten. Dies ist vor allem sinnvoll wenn davon ausgegangen wird, dass sich bei den verschiedenen Messungen unterschiedliche Konzentrationen an funktionalem Peptid-Tetramer gebildet haben. Die Peptid-Tetramer-Konzentration kann dann unabhängig aus der Anpassung jeder einzelnen Messung erhalten werden. Die thermodynamischen Parameter der Enantiomere des Rimantadin, die einmal durch eine globale Anpassung und einmal durch eine unabhängige Anpassung der Titrationskurven erhalten werden, sind in Abbildung 4.48 dargestellt.

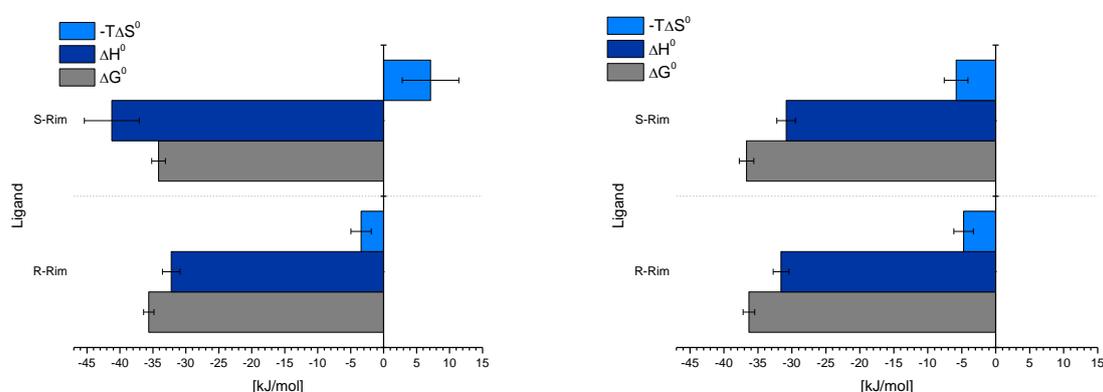


Abbildung 4.48: Thermodynamisches Profil der Wechselwirkung der Enantiomere des Rimantadin mit Udorn. Links ist die Auswertung durch die globale Anpassung in Origin, rechts durch unabhängige Anpassung der Kurven in Digitam dargestellt.

Die Wechselwirkung des R-Rimantadin und S-Rimantadin mit Udorn ist Enthalpie dominiert. Rimantadin passt optimal in die Bindungstasche und bildet Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten des Val27, Ala30, Ser31 und Gly34 aus. Der entropische Anteil zur Wechselwirkung ist relativ gering.

Tabelle 4.9: Vergleich der thermodynamischen Parameter von Rimantadin und dessen Enantiomeren (bei 20°C)

	Auswertung Origin (globale Anpassung)		Auswertung Digitam	
	$\Delta H^{293\text{ K}}$ [kJ/mol]	K_D [μM]	$\Delta H^{293\text{ K}}$ [kJ/mol]	K_D [μM]
Rimantadin [80]	-22,32±1,15	0,81±0,22		
S-Rimantadin	-41,23±4,16	0,83±0,35	-30,84±1,37	0,32±0,16
R-Rimantadin	-32,21±1,33	0,45±0,14	-31,60±1,16	0,34±0,12

Unterschiede bei der Bestimmung der Affinitäten der Enantiomere und des Racemats können auch durch leicht unterschiedliche Reinheiten der Substanzen verursacht werden. Die Reinheit der verwendeten Enantiomere beträgt 90% für das R-Enantiomer und 95% für das S-Enantiomer.

4.3.2 S31N

Die Mutante S31N ist funktional äquivalent zum Wildtyp des M2-Protonenkanals, das heißt die Weiterleitung der Protonen ist bei S31N nicht eingeschränkt. Amantadin-resistente Stämme, die diese Punktmutation besitzen, traten schon lange vor dem Einsatz von Amantadin auf und sind nicht aufgrund des Selektionsdrucks entstanden [81]. Molekulardynamische (MD) Simulationen lassen vermuten, dass die Pore der S31N-Mutante enger ist als die des Wildtyps. Die Porenweite ist an der Stelle des Asn31 nur 1,4 Å statt 2,6 Å bei Ser31 des Wildtyps [82]. Amantadin bindet auch an S31N, allerdings nur noch mit einer sehr geringen Affinität. Andere potente Inhibitoren des Wildtyps zeigen nur eine sehr geringe bis keine Affinität zu S31N-M2.

4.3.2.1 Ergebnis für Ligand 37

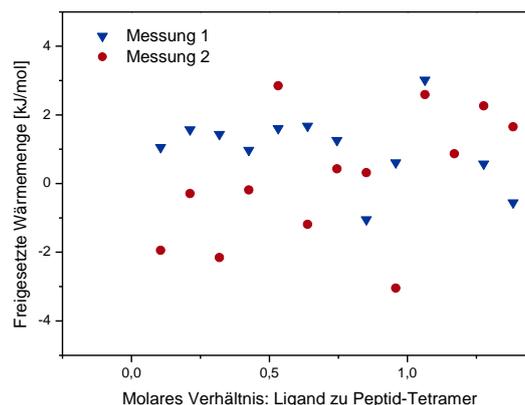


Abbildung 4.49: Titrationskurve von Ligand 37 mit S31N

Betrachtet man Abbildung 4.49 wird deutlich, dass zwischen S31N und dem Liganden 37 keine messbare Wechselwirkung auftritt, wohingegen bei gleichen Bedingungen eine deutliche Affinität zwischen Udorn und demselben Liganden besteht.

Anders als beim Wildtyp-M2, haben sich Wirkstoffe, die die offene Form des M2-S31N ($open_{out}$ - $closed_{in}$) stabilisieren, als potente Inhibitoren herausgestellt [83]. Durchgeführte ITC-Messungen mit S31N zeigten jedoch nur eine sehr geringe Affinität. Vermutlich ist die Bildung eines funktionalen Rezeptors als Tetramer aus Peptiden nicht so leicht zu erreichen wie bei Udorn, da auch bei erhöhter DPC-Konzentration keine erhöhte Affinität gemessen wurde.

4.3.3 Temperaturabhängigkeit

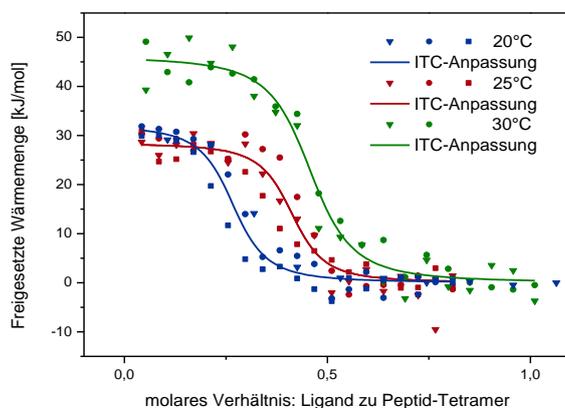


Abbildung 4.50: Titrationskurven von R-Rimantadin mit Udorn bei den Temperaturen 20°C, 25°C, und 30°C

Die Messungen bei verschiedenen Temperaturen zwischen 20 und 30 °C zeigen, dass die Affinität durch Erhöhung der Temperatur nur leicht erhöht wird. Auffällig ist bei steigender Temperatur die zunehmende Verschiebung der Titrationskurven nach rechts zu höheren molaren Verhältnissen von Ligand zu Peptid-Tetramer. Dies weist auf eine deutlich verbesserte Bildung des M2TM-Tetramers bei höheren Temperaturen hin. Beträgt die Konzentration an funktionalem Rezeptor in der Messzelle bei gleicher Menge an eingewogenem Rezeptor bei 20°C noch 16 µM, so steigt sie bei 25°C auf 24 µM und bei 30°C sogar auf 29 µM. Die Messung bei 30°C zeigt auch eine deutlich höhere Bindungsenthalpie als die Messungen bei niedrigerer Temperatur. Unter der Annahme, dass die Wärmekapazität bei konstantem Druck C_p für kleine Temperaturänderungen annähernd konstant bleibt, kann diese aus den gezeigten Messungen (Abbildung 4.50) berechnet werden. Für die Berechnung werden die Enthalpien der Messungen bei 20°C und 30°C verwendet. Der Verlauf der Titrationskurve bei 25°C sieht zu Beginn deutlich flacher aus als bei den beiden anderen Temperaturen. Dies lässt vermuten, dass hier eine zu geringe freigesetzte Wärmemenge gemessen wurde, da die Bindungsenthalpie bei 25°C theoretisch über der Bindungsenthalpie bei 20°C liegen müsste.

Tabelle 4.10: Einfluss der Temperatur auf die Bindungsenthalpie, -entropie und Affinität von R-Rimantadin zu Udorn.

Temperatur (T)	ΔH^T [kJ/mol]	K_D [µM]	$-T\Delta S^0$ [kJ/mol]
293,15 K (20°C)	-32,21	0,45	-3,41
298,15 K (25°C)	-28,46	0,27	-8,40
303,15 K (30°C)	-46,20	0,33	9,83

Bei der unabhängigen Anpassung der Kurven mit der ITC-Software Digitam (siehe Tabelle im Anhang, Abschnitt 7.3) bestehen keine signifikanten Unterschiede zu den durch die globale Anpassung in Origin erhaltenen Werten. Einzig die Bindungsenthalpie bei 30°C liegt hier mit $\Delta H^T = -38,76 \pm 2,08$ kJ/mol etwas außerhalb des ermittelten Fehlers.

Aus den Kirchhoff'schen Gesetzen leitet sich folgende Gleichung ab:

$$\Delta H_{T_2} = \Delta H_{T_1} + \Delta C_p(T_2 - T_1) \quad \text{Gl. 4-2}$$

Daraus folgt

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad \text{Gl. 4-3}$$

und

$$\Delta S_{T_2} = \Delta S_{T_1} + \Delta C_p \cdot \ln\left(\frac{T_2}{T_1}\right) \quad \text{Gl. 4-4}$$

Tabelle 4.11: Berechnung der Wärmekapazität C_p aus den Bindungsenthalpien von R-Rimantadin bei $T = 293,15 \text{ K}$ und $T = 303,15 \text{ K}$

Temperatur	ΔH^\ddagger	C_p
293,15 K (20°C)	$-32,21 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$	$\frac{-13,99 \text{ kJ}}{10 \text{ mol}} = -1,40 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$
303,15 K (30°C)	$-46,20 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$	

Berechnet man für die Messung bei 298,15 K die Enthalpie aus Gl. 4-2 unter der Annahme, dass C_p im Temperaturbereich zwischen 293,15 K - 303,15 K konstant ist, erhält man für $\Delta H^{298 \text{ K}} = -39,2 \text{ kJ/mol}$ und für $\Delta S = -12,06 \text{ kJ/mol}$. Diese Werte sind plausibel, da bei zunehmender Temperatur mit einer zunehmenden Enthalpie zu rechnen ist. Vergleicht man die thermodynamischen Parameter allerdings mit den gemessenen bei 298,15 K treten deutliche Unterschiede auf. In den Dreifachmessungen zeigt sich, dass die Enthalpie bei 298,15 K im Vergleich zur Enthalpie bei 293,15 K praktisch gleich bleibt.

Aufgrund der Temperaturerhöhung muss bei 303,15 K zusätzlich der Messbereich des Kalorimeters von sonst 30 μW auf 100 μW erhöht werden, um ein Signal innerhalb des Messbereichs zu erhalten. Trotz statischer Kalibrierung nach der Einstellung der neuen Temperatur, sind die Messungen dadurch etwas weniger miteinander vergleichbar als Messungen, die im gleichen Leistungsbereich des Kalorimeters durchgeführt werden. Die thermodynamischen Parameter der Messungen von R-Rimantadin bei 293,15 K und 303,15 K sind zum Vergleich in Abbildung 4.51 dargestellt.

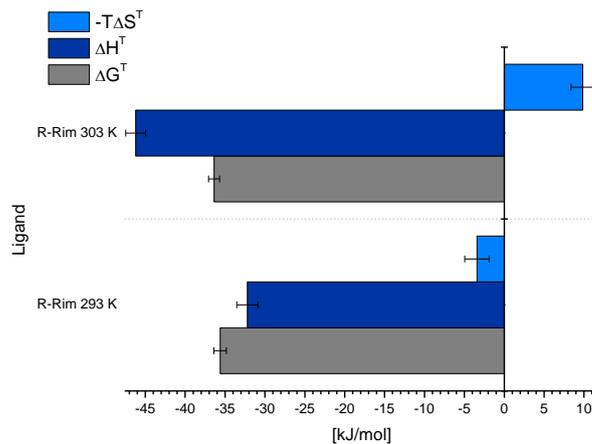


Abbildung 4.51: Thermodynamisches Profil der Wechselwirkung zwischen Udorn und R-Rimantadin bei 20°C (T=293 K) und bei 30°C (T=303 K)

Bei höherer Temperatur nimmt der Beitrag der Enthalpie zur Wechselwirkung zu. Die freie Enthalpie bleibt dabei nahezu gleich. Die Enthalpie ist bei höherer Temperatur erhöht. Dies wird durch einen negativen entropischen Anteil kompensiert.

4.3.4 Kurzzusammenfassung

Die Wechselwirkungen zwischen dem Wildtyp der Transmembrandomäne des M2-Proteins (Udorn) und Liganden mit Aminoadamantan-Struktur werden untersucht und in Form thermodynamischer Profile dargestellt. Vergleicht man enthalpische und entropische Anteile der Wechselwirkungen mit sukzessiven Änderungen der Molekülstruktur, so können daraus Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der Struktur des Liganden und seiner Affinität zum M2-Protonenkanal abgeleitet werden. Anhand eines Beispiels ist gezeigt, dass klassische Liganden, wie in der Literatur beschrieben, eine sehr geringe Affinität zur Mutante S31N zeigen. Allgemein ist die freigesetzte Wärme bei der Wechselwirkung dieser Liganden mit S31N sehr gering, sodass bei der Verwendung üblicher Peptid- und Ligandmengen kein auswertbares Signal detektiert wird, aus dem thermodynamische Parameter berechnet werden können. Der Zusammenhang zwischen der Temperatur, bei der die Bindungsreaktion stattfindet und der Affinität eines Liganden zu Udorn ist am Beispiel von R-Rimantadin dargestellt. Die Erhöhung der Temperatur führt dabei vor allem zu einer verstärkten Bildung an funktionalem M2-Tetramer.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Immunoassays für die Immunsuppressiva Tacrolimus, Cyclosporin A und Mycophenolsäure an heterogener Phase entwickelt. Die Detektion erfolgte markierungsfrei mithilfe der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Die besten Ergebnisse wurden bei allen Arzneistoffen durch kovalente Immobilisierung des Arzneistoffs über eine Carboxygruppe an die mit Polyethylenglykol abgeschirmte Transduceroberfläche erzielt. Beim Mycophenolsäure-Assay konnte dazu der Arzneistoff selbst immobilisiert werden, für die Immobilisierung von Tacrolimus und Cyclosporin A wurden, mangels geeigneter funktioneller Gruppen, Carboxy-Derivate dieser Arzneistoffe verwendet. Durch die kovalente Immobilisierung wurden bei Tacrolimus und Mycophenolsäure hohe Belegungen der Oberfläche erzielt, was sich an den hier beobachteten linearen Bindungssignalen (diffusionslimitiert) erkennen lässt. Bei Cyclosporin A ist die Belegung der Oberfläche vergleichsweise niedrig und die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche kinetisch kontrolliert. Eine indirekte Detektion der Arzneistoffe, die eine niedrige molare Masse besitzen, wurde durch einen Bindungs-Hemmtest als Assayformat realisiert. Für alle drei Immunsuppressiva wurden Kalibrierungen in Puffer durchgeführt. Die beiden Makrolidlaktone Everolimus und Sirolimus unterscheiden sich untereinander in ihrer Struktur nur minimal und weisen eine starke Ähnlichkeit zu Tacrolimus auf. Das Auftreten von Kreuzreaktivitäten dieser Arzneistoffe zum Tacrolimus-Antikörper wurde untersucht. In heterogenen direkten Assayformaten zeigten sich Kreuzreaktivitäten beider Arzneistoffe zum Tacrolimus-Antikörper, in homogener Phase trat dagegen keine relevante Wechselwirkung zwischen dem Tacrolimus-Antikörper und Everolimus auf.

Durch die markierungsfreie Detektion mittels RlFS wurden wichtige Informationen über die Wechselwirkung zwischen Antikörper und immobilisiertem Antigen auf der Oberfläche erhalten. Dennoch zeigte sich die Grenze dieser Methode, da die sehr niedrigen geforderten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Tacrolimus und Cyclosporin A auf diese Weise nicht erreicht wurden. Um die Sensitivität zu erhöhen wurden Fluoreszenzmarker eingesetzt. Die auf Glastransducern optimierte Oberflächenchemie wurde dazu auf die Oberfläche magnetischer Partikel übertragen, um einerseits einen Regenerationsschritt der Oberfläche einzusparen und andererseits die Möglichkeit einer Anreicherung der Probe nutzen zu können. Während der Wechselwirkungsphase zwischen Antigen und Antikörper fand der Assay in Lösung (in homogener Phase) statt. Mithilfe eines Permanentmagneten konnten die Partikel während der notwendigen Wachschriffe festgehalten werden und für die Detektion der Fluoreszenz im Volumen wieder losgelassen werden. Die Fluoreszenzdetektion wurde auf diese Weise vereinfacht, da das Anregungslicht in einem auf laser-induzierter-Fluoreszenz (LIF) basierenden Aufbau in Form einer aufgefächerten Linie auf das gesamte Flusszellenvolumen gerichtet wurde und nicht wie bei der TIRF (*engl. total internal reflection fluorescence*) präzise in den Transducer eingekoppelt werden musste.

Als Modellsystem für einen fluoreszenzbasierten Assay für die Detektion mittels LIF wurde die Mycophenolsäure ausgewählt, da dieser Assay schon bei der markierungsfreien Detektion mittels RlFS sehr stabile und robuste Signale lieferte und zudem kein Derivat zur Immobilisierung des Arzneistoffs benötigt.

Zur Überprüfung des Erfolgs der Immobilisierung von MPA-Antikörpern auf der Oberfläche magnetischer Partikel wurde die RlFS verwendet. Durch eine gerichtete Immobilisierung des Antikörpers über rekombinantes Protein A/G wurden reproduzierbar hohe Bindungssignale erhalten, die sich durch Zugabe

von MPA inhibieren ließen. Dies konnte bei Partikeln in der Größenordnung bis 250 nm in der RfS gezeigt werden.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden das kompetitive Assayformat und der Bindungshemmtest getestet. Bei der Verwendung kleiner Partikel ($\varnothing < 250$ nm) wurde nur eine geringe oder keine Fluoreszenz detektiert, was vermutlich auf eine starke Absorption oder Streuung des Fluoreszenzlichts durch die Partikel zurückzuführen ist. Bei der Verwendung größerer Partikel mit Durchmesser im μm -Bereich war das detektierte Fluoreszenzsignal vergleichsweise hoch, jedoch traten oft unspezifische Wechselwirkungen der Partikel zum Fluoreszenzfarbstoff auf. Durch die Abschirmung mit Polyethylenglykol konnte die unspezifische Wechselwirkung zum fluoreszenzmarkierten MPA-Derivat minimiert, jedoch nicht vollständig unterbunden werden.

Statt der Immobilisierung des MPA-Antikörpers, wurde in einem veränderten Assay die Mycophenolsäure direkt an der Oberfläche magnetischer Partikel immobilisiert. Dazu wurden Partikel mit einer mit PEG abgeschirmten Oberfläche verwendet. Als Assayformat wurde der Bindungshemmtest ausgewählt. Um die Affinität des MPA-Antikörpers nicht zu erniedrigen, wurde hierbei der MPA-Antikörper allerdings nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Stattdessen wurde, nachdem die Interaktion zwischen Antikörper und der auf der Partikeloberfläche immobilisierten MAP stattgefunden hatte, ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper gegen den MPA-Antikörper hinzugefügt. Als alternative Möglichkeit zum Anbringen eines Fluoreszenzmarkers, wurde der MPA-Antikörper auf der Oberfläche fluoreszierender Silica-Partikel immobilisiert. Durch die Vielzahl an Fluorophoren in einem Silica-Partikel konnte dadurch die Fluoreszenz verstärkt und erste konzentrationsabhängige Messungen erhalten werden. Allerdings nahmen durch den Einsatz zusätzlicher Partikel materialbedingt die unspezifischen Wechselwirkungen zu. Durch das Minimieren der benötigten Waschschriffe, kleineren Änderungen im Assayablauf und Optimierungen im LIF-Aufbau, wurde schließlich eine Kalibrierung für Mycophenolsäure unter Verwendung eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers erhalten. Die beobachteten unspezifischen Wechselwirkungen bei der Verwendung von Mikropartikeln führten allerdings zu einem relativ hohen Fluoreszenzsignal bei eigentlich maximaler Inhibition. Zum Vergleich wurden einige konzentrationsabhängige Messungen mit Nanopartikeln (50 nm) durchgeführt. Hier trat bei der maximalen Inhibition praktisch kein Fluoreszenzsignal auf.

Bei der Entwicklung der Assays wurde immer in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gemessen, die mit unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen gespikt wurde. Die letztendlich zu messenden Patientenproben weisen zwei erhebliche Unterschiede zu diesem System auf; einmal liegt die Temperatur der frischen Dialysatprobe über der Raumtemperatur, zum zweiten besteht das Dialysat abgesehen vom Arzneistoff, hauptsächlich aus einer Fettemulsion, die als Perfusat verwendet wird. Der Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Bindung zwischen Antigen und Antikörper wurde mithilfe der RfS untersucht. Beide Faktoren beeinflussen die Bindung nur minimal.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mittels der isothermen Titrationskalorimetrie die Wechselwirkung der Transmembrandomäne des Protonenkanals M2, der im Lebenszyklus des Influenza A-Virus eine wichtige Rolle spielt, mit verschiedenen Liganden untersucht. Das Ziel war es, dadurch Bindungsvorgänge besser zu verstehen, um in Zukunft neue Arzneistoffkandidaten für Amantadin-resistente Influenza-Stämme zu finden. Diese unterscheiden sich von den Arzneistoff-sensitiven zum Teil nur durch wenige Punktmutationen im M2-Protonenkanal. Thermodynamische Profile der Liganden wurden erfasst und

aufgrund dessen Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Struktur und dem Bindungsverhalten am M2-Protonenkanal erhalten.

Astrahan et al. [47] zeigten bereits, dass es durch die Enge der Pore des M2-Protonenkanals bei Liganden mit zunehmender Größe der Reste bzw. bei Resten mit eingeschränkter Flexibilität zu einer Abnahme der konformativen Freiheitsgrade und damit zu einem reduzierten möglichen Entropiegewinn kommt. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Wechselwirkung von Adamantan-Derivaten zum nicht-resistenten Wildtyp Udorn zeigte sich, dass die Wechselwirkung bei Liganden mit unverzweigten Alkylresten enthalpisch dominiert ist. Bei cyclischen, aromatischen und verzweigten Resten machte teilweise die Entropie einen enormen Anteil der Wechselwirkung aus. Anhand des klassischen Bindungspartners Rimantadin wurde gezeigt, dass für die Bindung am Rezeptor nicht ausschließlich ein bestimmtes Enantiomer verantwortlich ist, sondern beide Enantiomere zu ungefähr gleichen Teilen beitragen. Bei der Durchführung der Titrationsexperimente bei verschiedenen Temperaturen nahm die Affinität der Bindung mit zunehmender Temperatur nur in geringem Maße zu, die Bildung des funktionalen Tetramers aber war begünstigt. Das Auftreten einer Punktmutation in der Transmembrandomäne führt zur Resistenz der Influenza-Stämme gegen Amantadin. Anhand eines Beispiels wurde gezeigt, dass die klassischen Liganden, die an Udorn binden, keine durch die ITC messbare Affinität zu S31N besitzen.

5.2 Ausblick

Die Übertragung der Partikel-basierten Fluoreszenzmessungen von Puffer auf Dialysat und die Kalibrierung der Assays mit verschiedenen Immunsuppressiva ist der nächste Schritt auf dem Weg zu Online-Bestimmungen direkt am Patientenbett. Außerdem ist es mit dem LIF-Aufbau möglich, in Anlehnung an den entwickelten MPA-Assay auf der Partikeloberfläche, weitere Arzneistoffe und Biomarker im Blut zu bestimmen. Dies ermöglicht ein schnelleres Eingreifen in kritischen Situationen durch die genaue Kenntnis der Verläufe der Blutspiegel und spart zudem Zeit des Personals für häufige Blutentnahmen und Analytik im Zentrallabor. Bei der Optimierung und Kalibrierung der Assays ist vor allem die Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen der Partikel mit sämtlichen Oberflächen der Fluidik und mit Probenbestandteilen von entscheidender Bedeutung.

Bei der Untersuchung der Wechselwirkung verschiedener Liganden zum Wildtyp der Transmembrandomäne des M2-Proteins wurden Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Struktur des Liganden und Affinität der Bindung erhalten. Hochaffine Liganden für die Mutante S31N zu finden, stellt dennoch eine große Herausforderung dar. Um möglichst stabile Tetramere zu erhalten, würde es sich anbieten, auch größere Teile des M2-Proteins als Rezeptor zu verwenden. Die Verwendung von Membranen statt Mizellen, in die sich die Tetramere einlagern, könnte zusätzlich zur Stabilisierung beitragen.

6 Literatur

1. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013) Mutschler Arzneimittelwirkungen, 10. Auflage. Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
2. Ward GE, Carey KL, Westwood NJ (2002) Using small molecules to study big questions in cellular microbiology. *Cellular Microbiology* 4 (8):471-482. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00205.x
3. Kang J-S, Lee M-H (2009) Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine* 24 (1):1-10. doi:10.3904/kjim.2009.24.1.1
4. Annesley TM, McKeown DA, Holt DW, Mussell C, Champarnaud E, Harter L, Calton LJ, Mason DS (2013) Standardization of LC-MS for therapeutic drug monitoring of tacrolimus. *Clinical Chemistry* 59 (11):1630-1637. doi:10.1373/clinchem.2013.209114
5. Adams DH, Sanchez-Fueyo A, Samuel D (2015) From immunosuppression to tolerance. *Journal of Hepatology* 62 (1, Supplement):S170-S185. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.042
6. Vashist SK, Luppia PB, Yeo LY, Ozcan A, Luong JHT (2015) Emerging technologies for next-generation point-of-care testing. *Trends in Biotechnology* 33 (11):692-705. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.001
7. Pohanka A, Rosenborg S, Lindh JD, Beck O (2016) Experiences from using LC-MS/MS for analysis of immunosuppressive drugs in a TDM service. *Clinical Biochemistry* 49 (13-14):1024-1031. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.06.013
8. Hermida J, Tutor JC (2009) Falsely increased blood tacrolimus concentrations using the ACMIA assay due to circulating endogenous antibodies in a liver transplant recipient: a tentative approach to obtaining reliable results. *Therapeutic Drug Monitoring* 31 (2):269-272. doi:10.1097/FTD.0b013e31819c6d5c
9. Wallemacq PE (2004) Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC* 42 (11):1204-1211. doi:10.1515/cclm.2004.242
10. Filler G, Alvarez-Elías AC, McIntyre C, Medeiros M (2016) The compelling case for therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil therapy. *Pediatric Nephrology*:1-9. doi:10.1007/s00467-016-3352-2
11. Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G (2016) Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79:257-268. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.016
12. O'Connell MT, Tison F, Quinn NP, Patsalos PN (1996) Clinical drug monitoring by microdialysis: application to levodopa therapy in Parkinson's disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 42 (6):765-769
13. Baldini F (2010) Microdialysis-based sensing in clinical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (3):909-916. doi:10.1007/s00216-010-3626-7
14. Demtröder W (2009) 2. Elektrizität und Optik, 5. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
15. Hecht E (2014) Optik, 6. Auflage. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München
16. Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, Nahm W (1993) Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers. *Sensors and Actuators B: Chemical* 11 (1):21-27. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005(93)85234-2
17. Pröll F (2010) iRIfS-imaging Reflectometric Interference Sensor : Ein System für die hochparallele und markierungsfreie Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen. Dissertation, Tübingen
18. Valet G (2003) Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 17 (3):213-222
19. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (6071):674-679. doi:10.1038/321674a0
20. Toseland CP (2013) Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology* 6 (3):85-95. doi:10.1007/s12154-013-0094-5

21. Atkins PW, De Paula J (2013) *Physikalische Chemie*, 5. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim
22. Göpel W, Ziegler C (1996) *Einführung in die Materialwissenschaften: physikalisch-chemische Grundlagen und Anwendungen*. Teubner Verlag, Stuttgart
23. Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Auflage. Springer Science+Business Media, LLC, New York
24. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>. (abgerufen am 7. Dezember 2016).
25. Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A (1997) Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36 (7):1581-1597. doi:10.1021/bi962514+
26. Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Janeway Immunologie*, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
27. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) *Stryer Biochemie*, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
28. Stevens FJ (1987) Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Molecular Immunology* 24 (10):1055-1060
29. Pehler J (1997) *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. Dissertation, Tübingen
30. Reder S (1999) *Etablierung eines Immunoassays mit TIRF zur simultanen Bestimmung des Gehalts mehrerer endokriner Disruptoren im Abwasser*. Diplomarbeit, Tübingen
31. Eddowes MJ (1987) Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations. *Biosensors* 3 (1):1-15
32. Proll G, Ehni M (2014) Immunoassays. In: *Handbook of Spectroscopy*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 1313-1334. doi:10.1002/9783527654703.ch36
33. Cox K, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S (2012, Updated 2014) *Immunoassay Methods, Assay Guidance Manual* [Internet].
34. Findlay JW, Dillard RF (2007) Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 9 (2):E260-267. doi:10.1208/aapsj0902029
35. gbe-bund.de. (n.d.). *Anzahl der Sterbefälle infolge von Grippe in Deutschland in den Jahren 1998 bis 2014*. In *Statista - Das Statistik-Portal*. (abgerufen am 8. September 2016, von <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/5942/umfrage/sterbefaelle-in-folge-von-grippe-seit-1998/>)
36. Wang J, Li F, Ma C (2015) Recent progress in designing inhibitors that target the drug-resistant M2 proton channels from the influenza A viruses. *Biopolymers* 104 (4):291-309. doi:10.1002/bip.22623
37. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2010) *Molekulare Virologie*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
38. Wang C, Lamb RA, Pinto LH (1995) Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophysical Journal* 69 (4):1363-1371. doi:10.1016/s0006-3495(95)80003-2
39. Ma C, Polishchuk AL, Ohigashi Y, Stouffer AL, Schon A, Magavern E, Jing X, Lear JD, Freire E, Lamb RA, DeGrado WF, Pinto LH (2009) Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (30):12283-12288. doi:10.1073/pnas.0905726106
40. Sharma M, Yi M, Dong H, Qin H, Peterson E, Busath DD, Zhou HX, Cross TA (2010) Insight into the mechanism of the influenza A proton channel from a structure in a lipid bilayer. *Science (New York, NY)* 330 (6003):509-512. doi:10.1126/science.1191750
41. Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, Tereshko V, Nanda V, Stayrook S, DeGrado WF (2008) Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* 451 (7178):596-599. doi:10.1038/nature06528

42. Wang J, Ma C, Fiorin G, Carnevale V, Wang T, Hu F, Lamb RA, Pinto LH, Hong M, Klein ML, DeGrado WF (2011) Molecular dynamics simulation directed rational design of inhibitors targeting drug-resistant mutants of influenza A virus M2. *Journal of the American Chemical Society* 133 (32):12834-12841. doi:10.1021/ja204969m
43. Khurana E, Devane RH, Dal Peraro M, Klein ML (2011) Computational study of drug binding to the membrane-bound tetrameric M2 peptide bundle from influenza A virus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808 (2):530-537. doi:10.1016/j.bbame.2010.03.025
44. Leonov H, Astrahan P, Krugliak M, Arkin IT (2011) How do aminoadamantanes block the influenza M2 channel, and how does resistance develop? *Journal of the American Chemical Society* 133 (25):9903-9911. doi:10.1021/ja202288m
45. Schnell JR, Chou JJ (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451 (7178):591-595. doi:10.1038/nature06531
46. Kozakov D, Chuang GY, Beglov D, Vajda S (2010) Where does amantadine bind to the influenza virus M2 proton channel? *Trends in Biochemical Sciences* 35 (9):471-475. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.006
47. Astrahan P, Kass I, Cooper MA, Arkin IT (2004) A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug. *Proteins* 55 (2):251-257. doi:10.1002/prot.20018
48. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA (2005) Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 56 (1):23-46. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.03.012
49. Schrem H, Barg-Hock H, Strassburg CP, Schwarz A, Klempnaue J (2009) Nachsorge bei Organtransplantierten. *Deutsches Ärzteblatt International* 106(9):148-156
50. Rote Liste Online (abgerufen am 12. Dezember 2016)
51. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K, Wonigeit K, et al. (1995) Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Therapeutic Drug Monitoring* 17 (6):642-654
52. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber LT, Westley IS, Mourad M (2009) Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Therapeutic Drug Monitoring* 31 (2):139-152. doi:10.1097/FTD.0b013e318198d092
53. Yatscoff RW, Boeckx R, Holt DW, Kahan BD, LeGatt DF, Sehgal S, Soldin SJ, Napoli K, Stiller C (1995) Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of rapamycin: report of the consensus panel. *Therapeutic Drug Monitoring* 17 (6):676-680
54. Hummel M (2005) Recommendations for use of Certican® (Everolimus) after heart transplantation: results from a German and Austrian consensus conference. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 24 (4, Supplement):S196-S200. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2005.01.010
55. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, Tonshoff B, Holt DW, Chapman J, Gelder T (2010) Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 5 (2):341-358. doi:10.2215/cjn.07111009
56. database Ecpr (2011) Was ist ein „Nanomaterial“? Europäische Kommission legt erstmals gemeinsame Definition vor.
57. He J, Huang M, Wang D, Zhang Z, Li G (2014) Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 101:84-101. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.017
58. Rios A, Zougagh M, Bouri M (2013) Magnetic (nano)materials as an useful tool for sample preparation in analytical methods. A review. *Analytical Methods* 5 (18):4558-4573. doi:10.1039/C3AY40306H
59. Lu A-H, Salabas EL, Schüth F (2007) Magnetische Nanopartikel: Synthese, Stabilisierung, Funktionalisierung und Anwendung. *Angewandte Chemie* 119 (8):1242-1266. doi:10.1002/ange.200602866

60. Wolfbeis OS (2015) An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews* 44 (14):4743-4768. doi:10.1039/C4CS00392F
61. Lee CS, Chang HH, Jung J, Lee NA, Song NW, Chung BH (2012) A novel fluorescent nanoparticle composed of fluorene copolymer core and silica shell with enhanced photostability. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 91:219-225. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.11.010
62. Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W (2006) Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and non-specific binding. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 22 (9):4357-4362. doi:10.1021/la052797j
63. Steed JW, Turner DR, Wallace KJ (2007) *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
64. Du X, Li Y, Xia Y-L, Ai S-M, Liang J, Sang P, Ji X-L, Liu S-Q (2016) Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (2):144. doi:10.3390/ijms17020144
65. Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E (2015) Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 1278:183-204. doi:10.1007/978-1-4939-2425-7_11
66. Fechner P, Bleher O, Ewald M, Freudenberger K, Furin D, Hilbig U, Kolarov F, Krieg K, Leidner L, Markovic G, Proll G, Proll F, Rau S, Riedt J, Schwarz B, Weber P, Widmaier J (2014) Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (17):4033-4051. doi:10.1007/s00216-014-7834-4
67. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* 179 (1):131-137
68. Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, Diehl F, Hoheisel JD (2003) Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* 3 (3):254-264. doi:10.1002/pmic.200390038
69. Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, Lindberg M, Uhlén M (1988) Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 4323-4327.
70. Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA (1993) Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *Journal of Virology* 67 (9):5585-5594
71. Berner M, Rothmund R, Vollmer S, Schubert M, Hilbig U, Gauglitz G (2016) Silicon thin film photodetectors for multi-channel fluorescence detection in a microfluidic point-of-care testing device. *Physica Status Solidi (a)* 213 (7):1686-1696. doi:10.1002/pssa.201532953
72. Mehne J, Markovic G, Pröll F, Schweizer N, Zorn S, Schreiber F, Gauglitz G (2008) Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (5):1783-1791. doi:10.1007/s00216-008-2066-0
73. Schweizer N (2012) *Charakterisierung von Poly(ethylenglykol)-Derivaten für den Einsatz in der markierungsfreien optischen Biosensorik*. Dissertation, Tübingen
74. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2002). AOAC International
75. Lu B, Smyth MR, O'Kennedy R (1996) Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *The Analyst* 121 (3):29R-32R
76. Krieg AK (2014) *Immunoassay-Entwicklung für die optische Bestimmung von humaner Pankreas-Lipase und dem Arzneistoff Amitriptylin*. Dissertation, Tübingen
77. Grüttner C, Müller K, Teller J, Westphal F, Foreman A, Ivkov R (2007) Synthesis and antibody conjugation of magnetic nanoparticles with improved specific power absorption rates for alternating magnetic field cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1):181-186. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1151
78. Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

79. Frank R (2005) Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik. Dissertation, Tübingen
80. Kolarov F (2014) Molekular geprägte Nanopartikel als biomimetische Erkennungselemente in der optischen Sensorik. Dissertation, Tübingen
81. Furuse Y, Suzuki A, Kamigaki T, Oshitani H (2009) Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology Journal* 6:67. doi:10.1186/1743-422x-6-67
82. Gu RX, Liu LA, Wang YH, Xu Q, Wei DQ (2013) Structural comparison of the wild-type and drug-resistant mutants of the influenza A M2 proton channel by molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 117 (20):6042-6051. doi:10.1021/jp312396q
83. Wang J, Wu Y, Ma C, Fiorin G, Wang J, Pinto LH, Lamb RA, Klein ML, Degrado WF (2013) Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4):1315-1320. doi:10.1073/pnas.1216526110

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
As	Aminosäure
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovine Serum Albumin (<i>engl.</i>), Rinderserumalbumin
CsA	Cyclosporin A
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglykol
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FK506	Tacrolimus
FKBP12	FK506 bindendes Protein 12
GA	Glutarsäureanhydrid
GOPTS	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan
Ig	Immunglobulin
LIF	Laser Induced Fluorescence (<i>engl.</i>), Laser-induzierte Fluoreszenz
Lig	Ligand
LOD	Limit Of Detection (<i>engl.</i>), Nachweisgrenze
LOQ	Limit Of Quantification
MDC	Minimum Detectable Concentration (<i>engl.</i>), minimal erfassbare Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPA	Mycophenolsäure

NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline (<i>engl.</i>), Phosphat gepufferte Salzlösung
POCT	Point-Of-Care testing (<i>engl.</i>), patientennahe Diagnostik
RDL	Reliable Detection Limit (<i>engl.</i>), zuverlässige Erfassungsgrenze
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TM	Transmembran-Domäne
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence (<i>engl.</i>), Totale Interne Reflexions-Fluoreszenz
WFR	Wiederfindungsrate

7.2 Parameter der nicht-linearen ITC-Anpassung

Tabelle 7.1: Parameter der ITC-Anpassung mit Origin

Ligand	b	Standard- fehler	r	Standard- fehler	a	Standard- fehler
Lig 37	0,21062	0,01774	0,22251	0,07223	44,39075	4,98185
Lig 40	0,27312	0,03466	0,24606	0,12212	14,31936	2,43242
Lig 35	0,44541	0,09369	0,48348	0,25919	-12,45155	3,2124
Lig 59	0,32601	0,01507	0,04365	0,01926	22,13022	1,58639
Lig 60	0,50629	0,03778	0,1138	0,0487	12,39709	1,27609
Lig 61	0,54761	0,01628	0,08748	0,01717	25,04925	1,03753
R-Rim	0,27353	0,00768	0,02632	0,00843	32,21204	1,32552
S-Rim	0,14883	0,0105	0,08907	0,03757	41,23348	4,16413
R-Rim (25°C)	0,41623	0,00791	0,01053	0,00365	28,46035	0,85661
R-Rim (30°C)	0,46302	0,00825	0,01404	0,00398	46,19935	1,26485

7.3 Thermodynamische Profile bei unabhängiger Anpassung

Die Parameter wurden aus der Auswertung der einzelnen ITC-Messungen mit der Kalorimeter-Auswertungssoftware Digitam for Windows erhalten. Die im oberen Teil der Tabelle dargestellten Messungen wurden bei 293 K durchgeführt, die beiden Messungen im unteren Teil bei 298 K bzw. 303 K. Die mittleren Fehler der Anpassung, sowie die Standardabweichungen als Maß für die Reproduzierbarkeit sind getrennt aufgeführt.

Ligand	K_D [μM]	mittlerer Fehler [μM]	u (REP) [μM]	$\Delta G^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]	$\Delta H^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]	$\Delta S^{293\text{K}}$ [J/mol·K]	mittlerer Fehler [kJ/mol·K]	u (REP) [kJ/mol·K]	$-\Delta S^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]
37	5,44	1,58	3,43	-29,94	0,80	1,79	-65,66	13,64	28,93	-121,86	46,85	104,70	35,72	13,73	30,69
40	7,17	1,85	5,42	-29,63	0,96	2,65	-17,91	3,37	3,00	39,98	12,10	19,17	-11,72	3,55	5,62
35	14,61	4,88	5,72	-27,05	0,77	0,91	12,85	3,06	4,57	136,12	10,82	12,49	-39,90	3,17	3,66
59	0,70	0,32	0,75	-35,60	1,40	3,43	-21,00	1,24	0,59	49,81	6,51	9,68	-14,60	1,91	2,84
60	4,03	1,63	-	-30,28	0,99	-	-12,48	1,33	-	60,70	5,66	-	-17,79	1,66	-
61	3,29	0,59	-	-30,77	0,44	-	25,13	1,04	-	19,25	3,86	-	-5,64	1,13	-
R-Rim	0,34	0,12	0,07	-36,32	0,86	0,47	-31,60	1,16	1,21	16,10	4,94	5,72	-4,72	1,45	1,68
S-Rim	0,32	0,16	0,16	-36,67	1,06	1,33	-30,84	1,37	11,54	19,86	5,96	34,86	-5,82	1,75	10,22

R-Rim	K_D [μM]	mittlerer Fehler [μM]	u (REP) [μM]	ΔG^T [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]	ΔH^T [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]	ΔS^T [J/mol·K]	mittlerer Fehler [kJ/mol·K]	u (REP) [kJ/mol·K]	$-\Delta S^T$ [kJ/mol]	mittlerer Fehler [kJ/mol]	u (REP) [kJ/mol]
T=298 K, 25 °C	0,31	0,11	0,26	-37,89	0,93	2,43	-28,79	0,98	0,17	30,51	4,55	8,44	-9,10	1,36	2,52
T=303 K, 30 °C	0,34	0,16	0,15	-37,65	1,29	1,12	-38,76	2,08	0,05	-28,33	8,08	3,50	8,59	2,45	1,06

7.4 Veröffentlichungen

7.4.1 Publikationen

“Binding and proton blockage by amantadine variants of the Influenza M2WT and M2S31N explained.” Tzitzoglaki C, Wright A, Freudenberger K, Hoffmann A, Tietjen I, Stylianakis I, Kolarov F, Fedida D, Schmidtke M, Gauglitz G, Cross TA, Kolocouris A. Journal of Medicinal Chemistry. 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01115.

“Alchemical free energy calculations and isothermal titration calorimetry measurements of aminoadamantanes bound to the closed state of Influenza A/M2TM.” Ioannidis H, Drakopoulos A, Tzitzoglaki C, Homeyer N, Kolarov F, Gkeka P, Freudenberger K, Liolios C, Gauglitz G, Cournia Z, Gohlke H, Kolocouris A. Journal of Chemical Information and Modeling, 2016, 56(5):862-76)

“Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs” Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G. Trends in Analytical Chemistry, 2016, 79:257-268.

“Plasmonic vertical dimer arrays as elements for biosensing” Horrer A, Krieg K, Freudenberger K, Rau S, Leidner L, Gauglitz G, Kern DP, Fleischer M. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. 407(27):8225-31

“Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction” Fechner P, Bleher O, Ewald M, Freudenberger K, Furin D, Hilbig U, Kolarov F, Krieg K, Leidner L, Markovic G, Proll G, Pröll F, Rau S, Riedt J, Schwarz B, Weber P, Widmaier J. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(17):4033-51

“Optische Sensoren in medizinischer Diagnostik und Umweltanalytik“ Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G. GDCh, Aktuelle Wochenschau: Woche 31 – Licht in der Diagnostik, <http://www.aktuelle-wochenschau.de/main-navi/archiv/chemie-und-licht-2015/kw31-licht-in-der-diagnostik-optische-sensoren-in-medizinischer-diagnostik-und-umweltanalytik.html>

„NANODEM – Entwicklung eines Gerätes zum Therapeutischen Drug Monitoring von Immunsuppressiva“ Freudenberger K, Gauglitz G. Langfassungen 11. Dresdner Sensor-Symposium, 2013

„Europt(r)ode XII: Twelfth European conference on optical chemical sensors and biosensors.“ Rau S, Weber P, Hilbig U, Freudenberger K, Widmaier J. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(22):5253-4.

„11th Dresdner Sensor Symposium - a conference on sensors, measurement techniques, and medical engineering.“ Widmaier J, Freudenberger K, Rau S, Hilbig U. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(14):3257-8

7.4.2 Vorträge

“Development of an optical sensor for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants” Freudenberger K, Gauglitz G. Europt(r)ode 2014, Athen

„Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Immunsuppressiva im Blut von Transplantationspatienten“ Freudenberger K, Gauglitz G. Doktorandenseminar vom Arbeitskreis für Prozessanalytik 2013, Berlin

„Development of a biosensor for determination of immunosuppressive drugs“ Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G. DAAS 2016, Ulm

7.4.3 Poster

„Entwicklung eines Immunoassays zur Überwachung der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantationen“ Freudenberger K, Gauglitz G. ANAKON 2013, Essen

„Immunoassay for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid“ Freudenberger K, Wortmann C, Gauglitz G. Euroanalysis 2013, Warschau

„Entwicklung eines optischen Sensors zur Bestimmung von Immunsuppressiva in Blut“ Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G. Wissenschaftsforum 2013, Darmstadt

„NANODEM – Entwicklung eines Gerätes zum Therapeutischen Drug Monitoring von Immunsuppressiva“ Freudenberger K, Wortmann C, Gauglitz G. Dresdner Sensorsymposium 2013, Dresden

“Development of an optical sensor for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressants” Freudenberger K, Gauglitz G. Analytica Conference 2014, München

“Therapeutisches Drug Monitoring von Immunsuppressiva mittels eines Biosensors“ Freudenberger K, Hilbig U, Salis F, Orellana G, Descalzo A, Gauglitz G. ANAKON 2015, Graz

„An optical sensor for therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid“ Freudenberger K, Hilbig U, Gauglitz G. BBMEC 2015, Regensburg

“An optical biosensor for cyclosporine A” Freudenberger K, Hilbig U, Salis F, Orellana G, Descalzo A, Gauglitz G. Analytica Conference 2016, München

7.5 Akademische Lehrer

Dr. Christian Beyer, Prof. Dr. Rolf Daniels, Prof. Dr. Gisela Drews, Prof. Dr. Martina Düfer, Prof. Dr. Peter Krippeit-Drews, Prof. Dr. Günter Gauglitz, PD Dr. Bertolt Gust, Prof. Dr. Lutz Heide, Prof. Dr. Stefan Laufer, Dr. Ernst Mechler, PD Dr. Matthias Sausbier, Prof. Dr. Joachim E. Schultz, Prof. Dr. Peter Ruth, Prof. Dr. Martin A. Wahl, Prof. Dr. Oliver Werz, Dr. Werner Zimmermann