

**Einzelmolekül-Kraftspektroskopie zur  
Untersuchung der Wechselwirkungen  
zwischen Tau-Peptiden und monoklonalen  
Antikörpern**

Der Fakultät für Physik und Geowissenschaften  
der Universität Leipzig  
eingereichte

**D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium  
Dr. rer. nat.**

vorgelegt  
von

**Dipl. Phys. Tim Stangner**  
geboren am 15.12.1985 in Erfurt

Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Kremer  
Prof. Dr. Dario Anselmetti

Tag der Verleihung: 31. März 2015



Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte innerhalb der Graduiertenschule BuildMoNa und der Arbeitsgruppe Molekülphysik an der Universität Leipzig. Die Arbeit wurde mit Mitteln aus dem ESF und des Freistaates Sachsen finanziert.



Gefördert aus Mitteln  
der Europäischen Union

Europa fördert Sachsen.  
**ESF**  
Europäischer Sozialfonds





## **Bibliographische Beschreibung:**

Tim Stangner

### **Einzelmolekül-Kraftspektroskopie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Tau-Peptiden und monoklonalen Antikörpern**

Universität Leipzig, Dissertation

123 S., 164 Lit., 34 Abb., 12 Tab., 4 Anlagen

#### **Referat:**

In dieser Dissertation werden die Bindungseigenschaften von Rezeptor-Ligand-Komplexen mit Hilfe von Optischen Pinzetten untersucht. Aufgrund ihrer außerordentlichen Orts- ( $\pm 2$  nm) und Kraftauflösung ( $\pm 0,2$  pN) ist es möglich, diese spezifischen Interaktionen anhand einzelner Bindungsereignisse zu charakterisieren. Als Modellsysteme dienen die Wechselwirkungen zwischen den phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörpern HPT-101 und HPT-104 und dem Morbus Alzheimer relevanten Tau-Peptid. Dieses pathogen veränderte Peptid wird krankheitsspezifisch an den Aminosäuren Threonin<sup>231</sup> und Serin<sup>235</sup> phosphoryliert, so dass die Detektion dieses Phosphorylierungsmusters mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern eine mögliche Früherkennung der Alzheimer-Krankheit darstellt. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist jedoch die exakte Kenntnis der Bindungsstellen des Liganden am Rezeptor. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist es, das Epitop des monoklonalen Antikörpers HPT-101 zu bestimmen. Dazu werden mögliche bindungsrelevante Aminosäuren durch ein Alanin ausgetauscht (Alanin-Scan) und so insgesamt sieben neue Tau-Isoformen aus dem ursprünglichen doppelt-phosphorylierten Peptid Tau[pThr<sup>231</sup>/pSer<sup>235</sup>] hergestellt. Die jeweiligen Interaktionen zwischen den modifizierten Peptiden und dem Antikörper werden mit der dynamischen Kraftspektroskopie untersucht und mit Hilfe eines literaturbekannten Modells analysiert. Die sich daraus ergebenden Bindungsparameter (Lebensdauer der Bindung, charakteristische Bindungslänge, freie Aktivierungsenergie und Affinitätskonstante) werden zusammen mit den relativen Bindungshäufigkeiten erstmals genutzt, um Kriterien für essentielle, sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren im Tau-Peptid zu definieren. Bemerkenswerterweise existieren für insgesamt drei dieser Parameter (Bindungslebensdauer, Bindungslänge und Affinitätskonstante) scharfe Klassengrenzen, mit denen eine objektive Einteilung des Epitops von Antikörper HPT-101 möglich ist. Die erhaltenen Ergebnisse sind in überzeugender Weise im Einklang mit ELISA-Messungen zu diesem Antikörper-Peptid-Komplexen, sie liefern jedoch einen tieferen Einblick in die Natur einer spezifischen Bindung, da den kraftspektroskopischen Messungen auch die Bindungskinetik zugänglich ist. Das zweite Projekt der vorliegenden Dissertation etabliert eine Methodik, um die Datenvarianz in der Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeit zu reduzieren. Anhand einer Kombination aus Fluoreszenz- und kraftspektroskopischen Messungen werden die Wechselwirkungen zwischen dem monoklonalen Antikörper HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[F1-pThr<sup>231</sup>] untersucht. Es wird gezeigt, dass durch Vorsortieren der Peptid-beschichteten Kolloide, entsprechend ihrer Oberflächenbeladung, die Datenvarianz in den Bindungshäufigkeitsmessungen signifikant reduziert wird.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Theoretische Grundlagen . . . . .	5
2.1.1 Die Optische Pinzette . . . . .	5
2.1.1.1 Das Mie-Regime $D_0 \gg \lambda$ . . . . .	6
2.1.1.2 Das Rayleigh-Regime $D_0 \ll \lambda$ . . . . .	7
2.1.1.3 Gültigkeit im Experiment . . . . .	9
2.1.2 Die spezifische Bindung . . . . .	10
2.1.2.1 Spezifität und Affinität . . . . .	11
2.1.2.2 Mechanische Dissoziation einer spezifischen Bindung . . . . .	12
2.1.2.3 Dissoziation einer idealen Bindung unter Krafteinwirkung: Das Bell-Evans-Modell . . . . .	15
2.1.2.4 Das Dudko-Hummer-Szabo-Modell (DHS-Modell) . . . . .	18
2.1.2.5 Das Friddle-De Yoreo-Modell . . . . .	21
2.1.3 Dynamische Kraftspektroskopie . . . . .	22
2.2 Biologische Grundlagen . . . . .	24
2.2.1 Die Alzheimer-Krankheit und ihre Verbindung mit dem Tau-Protein . . . . .	24
2.2.1.1 Die Amyloid-Beta-Hypothese . . . . .	25
2.2.1.2 Neurofibrilläre Knäuel . . . . .	25
2.2.1.3 Monoklonale Antikörper . . . . .	29
2.2.1.4 Tau-Peptide und ihre phosphorylierungsspezifischen, mono- klonalen Antikörper . . . . .	30
<b>3 Experimentelles</b>	<b>35</b>
3.1 Versuchsaufbau, Datenerfassung und -auswertung . . . . .	35
3.1.1 Aufbau der Optischen Pinzette . . . . .	35
3.1.2 Positionsdetektion in drei Dimensionen . . . . .	36

3.1.2.1	Positionsdetektion in der $xy$ -Ebene . . . . .	36
3.1.2.2	Positionsdetektion in $z$ -Richtung: Die Höhendetektion . . . . .	39
3.1.3	Kalibrierung . . . . .	41
3.1.3.1	Ortskalibrierung . . . . .	41
3.1.3.2	Kraftkalibrierung . . . . .	41
3.1.4	Das Messprogramm: Automatische Höhen- und Positionsregulierung . . . . .	43
3.1.5	Experimentelle Durchführung . . . . .	45
3.1.6	Automatische Messdatenauswertung . . . . .	47
3.1.7	Eliminierung von Mehrfachbindungen . . . . .	49
3.1.8	Fehlerrechnung für die Bindungsparameter $\tau_0$ , $x_{ts}$ und $\Delta G$ . . . . .	50
3.1.9	Durchflusszytometrie . . . . .	51
3.2	Probenpräparation und Kontrollexperimente . . . . .	52
3.2.1	Herstellung der Tau-Peptide und ihrer phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper . . . . .	52
3.2.2	Kolloidchemie . . . . .	53
3.2.2.1	Beschichtung von Melaminharz-Partikeln mit Tau-Peptiden . . . . .	55
3.2.2.2	Beschichtung von Melaminharz-Partikeln mit Protein G . . . . .	56
3.2.2.3	Beschichtung von Melaminharz-ProtG-Partikeln mit mono- klonalen Antikörpern . . . . .	57
3.2.3	Kontrollexperimente . . . . .	58
3.2.3.1	Hintergrundmessungen . . . . .	58
3.2.3.2	Bestimmung der optimalen Oberflächenbeladung . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen mAk HPT-101 und Tau-Peptiden: Der Alanin-Scan . . . . .	63
4.1.1	Bestimmung der Bindungshäufigkeiten . . . . .	64
4.1.2	Bestimmung der Bindungsparameter mittels dynamischer Kraftspek- troskopie . . . . .	65
4.1.3	Bestimmung der Bindungsparameter mit dem Modell nach Bell-Evans und Friddle-De Yoreo . . . . .	71
4.1.4	Das Superpositionsmodell . . . . .	72
4.1.5	Vergleich der Affinitätskonstante von mAk HPT-101 aus ELISA- und kraftspektroskopischen Messungen . . . . .	76
4.1.6	Struktursimulationen der Tau-Peptide . . . . .	80
4.1.7	Schlussbemerkung zu Abschnitt 4.1 . . . . .	82
4.2	Wechselwirkungen zwischen dem monoklonalen Antikörper HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] . . . . .	85
4.2.1	Charakterisierung der Oberflächenbeladung von Mikropartikeln . . . . .	85
4.2.2	Vorsortieren von Mikropartikeln mit FACS . . . . .	87
4.2.3	Dynamische Kraftspektroskopie . . . . .	89

---

4.2.4	Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeit und Reduktion der Datenvarianz . . . . .	91
4.2.5	Schlussbemerkung zu Abschnitt 4.2 . . . . .	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>95</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
A.1	Übersicht der Messungen und Experimentatoren . . . . .	99
A.2	Chemikalien- und Pufferverzeichnis . . . . .	100
A.2.1	Chemikalienverzeichnis . . . . .	100
A.2.2	Pufferverzeichnis . . . . .	100
A.3	Median-Test . . . . .	102
A.4	F-Tests . . . . .	103
A.4.1	<i>F</i> -Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede der Varianzen von Oberflächenbeladungsverteilungen (vgl. Abschnitt 4.2.2) . . . . .	103
A.4.2	<i>F</i> -Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede der Varianzen zweier relativer Bindungshäufigkeiten (vgl. Abschnitt 4.2.4) . . . . .	104
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>119</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>123</b>



# Abkürzungsverzeichnis

$\Delta G$ .....	freie Aktivierungsenergie im kraftfreien Zustand bzw. Potentialtiefe
$\dot{F}$ .....	Belastungsrate (englisch: <i>loading rate</i> )
$\lambda$ .....	Wellenlänge des Lichtes (In dieser Arbeit wird eine Laserwellenlänge von 1064 nm verwendet.)
$\Sigma$ .....	Oberflächenbelastung
8(2) pN .....	Angabe eines Messwertes: Messwert(Messfehler) Einheit
h .....	Stunde
min .....	Minute
$\tau(F)$ .....	kraftabhängige Lebensdauer einer Bindung
$\tau_0$ .....	Lebensdauer einer Bindung im kraftfreien Zustand
$c$ .....	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum; $c = 299\,792\,458$ m/s
$D$ .....	Diffusionskonstante
$F^*$ .....	wahrscheinlichste Abrisskraft
$F_{\text{krit}}$ .....	kritische Kraft bei der die Energiebarriere verschwindet
$g$ .....	Fallbeschleunigung; $g \approx 9,81$ m/s <sup>2</sup>
$h$ .....	Plancksches Wirkungsquantum; $h \approx 6,626 \times 10^{-34}$ J s
$h_{\text{B}}$ .....	relative Bindungshäufigkeit
$k_{\text{B}}$ .....	Boltzmann-Konstante; $k_{\text{B}} \approx 1,38 \times 10^{-23}$ J/K
$K_{\text{a}}^{\text{rel.}}$ .....	relative Assoziations- bzw. Affinitätskonstante
$k_{\text{B}}T = \beta^{-1}$ .....	thermische Energie
$k_{\text{Falle}}$ .....	Kraftkonstante der Optischen Pinzette (In dieser Arbeit wird ein Wert von $k_{\text{Falle}} = 0,09$ pN/nm verwendet.)
$k_{\text{off}}$ .....	off- bzw. Dissoziationsrate
$k_{\text{on}}$ .....	on- bzw. Assoziationsrate
$p(F)$ .....	Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abrisskräfte
$T$ .....	absolute Temperatur (In dieser Arbeit wird ein Wert von etwa 298 K angenommen.)
$x_{\text{ts}}$ .....	Bindungslänge
[pThr231] .....	phosphorylierte Aminosäure Threonin an 231. Stelle im Tau-Protein
[Ser235] .....	Aminosäure Serin an 235. Stelle im Tau-Protein
<i>et al.</i> .....	<i>et alii</i> (und andere [Autoren])
<i>in vitro</i> .....	lateinisch: im Glas, bezeichnet organische Vorgänge die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden.
A $\beta$ -Peptid .....	Amyloid-Beta-Peptid

Abb. ....	Abbildung
Ala ....	Alanin (Aminosäure)
APP ....	Amyloid-Vorläuferprotein
Arg ....	Arginin (Aminosäure)
AS ....	Aminosäure
bzw. ....	beziehungsweise
DFS ....	dynamische Kraftspektroskopie
DHS-Modell ....	Modell zur Beschreibung der Dissoziation einer spezifischen Bindung nach Dudko, Hummer und Szabo
DNS ....	Desoxyribonukleinsäure
ELISA ....	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Gl. ....	Gleichung
HPT ....	<i>HyperPhosphorylated Tau</i> , Bezeichnung der monoklonalen anti-Tau-Antikörper
Lys ....	Lysin (Aminosäure)
mAk ....	monoklonaler Antikörper
MT ....	Mikrotubuli
murin ....	aus der Maus
NFT ....	neurofibrilläre Knäuel
PBS ....	phosphatgepufferte Salzlösung
PHF ....	gepaarte helikale Filamente
Pro ....	Prolin (Aminosäure)
ROI ....	<i>Region Of Interest</i> (Bereich von Interesse)
RT ....	Raumtemperatur
Ser ....	Serin (Aminosäure)
Tab. ....	Tabelle
Tau <sup>Iso</sup> [Ser237] ..	Tau-Peptid-Isoform bei dem die Aminosäure Ser237 durch ein Alanin ersetzt wurde (Abschnitt 4.1)
Tau[Fl-pThr231]	fluoreszenzmarkiertes Tau-Peptid mit einer Phosphorylierung an der Aminosäure Thr231 (Abschnitt 4.2)
Thr ....	Threonin (Aminosäure)
u.a. ....	unter anderem
Upm ....	Umdrehungen pro Minute
Val ....	Valin (Aminosäure)
vgl. ....	vergleiche

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Erklärung des Kraftübertrags auf einen dielektrischen Partikel in einem nicht fokussierten Laserstrahl . . . . .	7
2.2	Erklärung des Kraftübertrags auf einen dielektrischen Partikel in einem fokussierten Laserstrahl . . . . .	8
2.3	Energielandschaft einer idealen Bindung . . . . .	13
2.4	Absenkung der Energiebarriere unter Einfluss einer äußeren Kraft . . . . .	16
2.5	Abrisskraftverteilung für eine theoretische Bindung und Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft $F^*$ von der Belastungsrate . . . . .	18
2.6	Potentialverlauf und kraftabhängige Lebensdauer im DHS-Modell . . . . .	20
2.7	Die Selbstaggregation des Tau-Proteins . . . . .	26
2.8	Tau-Kaskade zur Bildung von neurofibrillären Knäuel . . . . .	28
2.9	Aufbau eines IgG-Antikörpers . . . . .	30
2.10	Spezifität der monoklonalen Antikörper HPT-104 und HPT-101 bestimmt durch ELISA-Messungen . . . . .	32
3.1	Experimenteller Aufbau der Optischen Pinzette . . . . .	36
3.2	Positionsbestimmung mittels der eindimensionalen Kreuzkorrelationsmethode . . . . .	38
3.3	Gedrehte Kreuzkorrelationsmethode zur Positionsdetektion bei Paarwechselwirkungsexperimenten . . . . .	39
3.4	Die Höhendetektion und das Referenzpolynom . . . . .	40
3.5	Orts- und Kraftkalibrierung der optischen Falle . . . . .	42
3.6	Ablauf der automatischen Höhen- und Positionsregulierung . . . . .	45
3.7	Durchführung des Experimentes . . . . .	46
3.8	Funktionsweise des Auswerteprogramms . . . . .	48
3.9	Schematische Erklärung der Durchflusszytometrie . . . . .	52
3.10	Beschichtung der MF-Partikel mit Tau-Peptiden . . . . .	55
3.11	Beschichtung der MF-Partikel mit Protein G . . . . .	56
3.12	Beschichtung der MF-ProtG-Partikel mit Antikörpern . . . . .	57
3.13	Kontrollexperimente zur Bestimmung des Hintergrundes . . . . .	59
3.14	Bestimmung der optimalen Oberflächenbeladung . . . . .	60
4.1	Bestimmung der Bindungshäufigkeiten im Alanin-Scan . . . . .	65
4.2	Ergebnis der dynamischen Kraftspektroskopie für die Wechselwirkungen zwischen mAk HPT-101 und dem Peptid Tau <sup>Iso</sup> [Ser237]. . . . .	66
4.3	Übersicht über die Bindungsparameter aus dem Alanin-Scan . . . . .	67

4.4	Bestimmung der Bindungsparameter mit dem Modell nach Bell-Evans und Friddle-De Yoreo . . . . .	71
4.5	Vergleich des Superpositionsmodells mit den Originaldaten der Wechselwirkung zwischen HPT-101 und Tau[pThr231/pSer235] . . . . .	75
4.6	Vergleich der relativen Affinität von mAk HPT-101 berechnet aus ELISA und dynamischer Kraftspektroskopie . . . . .	77
4.7	Charakterisierung der Oberflächenbeladung in Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität . . . . .	87
4.8	2D-Dichtehistogramm von Tau[F1-pThr231]-beschichteten Melaminharz-Partikeln . . . . .	88
4.9	Bestimmung der Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen Tau[F1-pThr231] und mAk HPT-104 . . . . .	90
4.10	Auswirkung einer homogenen Oberflächenbeladung auf die Datenvarianz der Bindungshäufigkeit . . . . .	92

# Tabellenverzeichnis

2.1	Eigenschaften der Tau-Peptide . . . . .	31
2.2	Epitopkartierung . . . . .	33
3.1	Übersicht über die Präparationsmaterialien . . . . .	54
4.1	Übersicht über die Bindungsparameter aus dem Alanin-Scan . . . . .	69
4.2	Vergleich der Bindungsparameter aus dem Alanin-Scan anhand verschiedener theoretischer Modelle . . . . .	72
4.3	Einordnung der Aminosäuren anhand der ELISA- und DFS-Messungen . . . . .	79
4.4	Vergleich der Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen HPT-104 und Tau[F1-pThr231] bzw. Tau[pThr231] . . . . .	91
A.1	Liste der ohne Mitwirkung des Autors durchgeführten Messungen und Simu- lationen . . . . .	99
A.3	Schema zum Durchführen des Median-Tests . . . . .	102
A.4	Varianz $\sigma_{\text{FITC}, x}$ , Stichprobenumfang $N_x$ und Anzahl der Freiheitsgrade $FG_x$ für die Verteilungen A2 aus Abschnitt 4.2.2 . . . . .	104
A.5	Varianz $\sigma_x$ , Stichprobenumfang $N_x$ und Anzahl der Freiheitsgrade $FG_x$ für die relativen Bindungshäufigkeiten aus Abschnitt 4.2.4 . . . . .	104



# 1 Einleitung

Die Alzheimer-Krankheit gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen, deren Symptome sich unter anderem durch Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit, Gedächtnisverlust, Verwirrtheit und Desorientierung darstellen. Aktuellen Studien zufolge leidet jeder achte Erwachsene im Alter von über 65 Jahren und sogar jeder Zweite der über 85-Jährigen an der Alzheimer-Krankheit, so dass 2007 zirka 30 Millionen Menschen weltweit von dieser Form der Demenz betroffen waren [1]. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung in den westlichen Ländern ist dieser Trend ansteigend [2, 3]. Obwohl die Pathologie dieser Krankheit in Form von senilen Plaques aus Amyloid-Beta-Peptiden und neurofibrillären Knäuel aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen [4–9] bereits im Jahr 1906 von Alois Alzheimer beschrieben wurde, konnten trotz intensiver Forschung bis heute keine eindeutigen Auslöser für die Alzheimer-Krankheit gefunden werden. Anhand der sogenannten Braak-Stadien ist es jedoch möglich, einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der gebildeten neurofibrillären Knäuel und dem Fortschritt der Alzheimer-Krankheit herzustellen [10]. Weiterhin ist bekannt, dass krankheitstypische Biomarker, wie das pathogen veränderte, hyperphosphorylierte Tau-Protein mit Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren Threonin231 und Serin235, bis zu zehn Jahre vor dem Auftreten erster Symptome in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (Liquor) gefunden werden können [11]. Somit wäre eine Diagnose der Demenz über solche Marker bereits in der vorklinischen Phase möglich, was den Krankheitsverlauf durch die Gabe entsprechender Medikamente positiv beeinflussen könnte.

Zum Nachweis von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen, die ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster besitzen, können monoklonale Antikörper verwendet werden. Diese wurden erstmals 1975 *in vitro* von Köhler und Milstein hergestellt [12]. Schon in der Originalpublikation stellten die beiden Autoren fest, dass solche Antikörper großes medizinisches und industrielles Potential besitzen. Bereits neun Jahre nach ihrer Veröffentlichung wurden beide Wissenschaftler - zusammen mit Niels Jerne - mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Die ersten medizinischen Anwendungen Ende der 1980er-Jahre scheiterten jedoch, da die Behandlung von Patienten mit *murinen* Antikörpern oft zu allergischen Reaktionen sowie zur Bildung körpereigener Antikörper gegen das verabreichte Medikament führte [13]. Erst mit der Weiterentwicklung gentechnischer Verfahren, die die Herstellung chimärer, humanisierter und humaner Antikörper ermöglichten, gelang die erfolgreiche Anwendung in der Humanmedizin. Heutzutage werden monoklonale Antikörper in einem breiten medizinischen Spektrum eingesetzt. Sie finden Verwendung in der Krebstherapie als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate [14–19], bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Krankheiten wie Morbus Crohn, Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis [19] sowie zur Prophylaxe von

Transplantationsabstoßungen [13]. Neben ihrer Anwendung zur Therapie von Krankheiten können monoklonale Antikörper auch für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Besonders im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Alzheimer-Krankheit), wenn die ersten Symptome heterogen sind und mit denen anderer Krankheitsbilder verwechselt werden können, kann der Einsatz dieser Antikörper von unschätzbarem Vorteil sein [20]. Zur Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen bzw. Fehldiagnosen muss jedoch sichergestellt werden, dass die monoklonalen Antikörper ausschließlich an ihr Zielepitop binden und Kreuzreaktionen zu anderen, gegebenenfalls ähnlichen Epitopen ausgeschlossen sind. Damit stellt die Antikörperspezifität eine zentrale Eigenschaft in den oben aufgezählten Therapie- bzw. Diagnoseformen dar.

Standardmethoden zur Bestimmung der Affinität bzw. Spezifität eines Antikörpers sind immunochemische Prozeduren, wie z.B. ELISA [21, 22] und Western Blot [23]. Diese Hochdurchsatzverfahren ermöglichen es, die Spezifität eines Antikörpers gegen verschiedenste Epitope innerhalb kurzer Zeit zu testen, weswegen sie fester Bestandteil der modernen biochemischen und biopharmazeutischen Grundlagen- und anwendungsbezogenen Forschung sind [24]. In den vergangenen Jahren wurden jedoch auch andere Herangehensweisen entwickelt, um einzelne Rezeptor-Ligand-Komplexe, beispielsweise anhand ihrer Affinitätskonstante, zu charakterisieren. Zu diesen sogenannten *Einzelmolekültechniken* gehören unter anderem Rasterkraftmikroskope [25], Magnetische [26] und Optische Pinzetten [27]. Mit Hilfe der eben genannten Spektroskopiemethoden war es beispielsweise möglich die elastischen Eigenschaften doppel- und einzelsträngiger DNS [28–30], deren Interaktion mit DNS-bindenden Liganden [31, 32] sowie DNS-DNS-Wechselwirkungen [33] zu untersuchen. Weiterhin konnten durch die Verwendung der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie die Energielandschaften von intra- [34–39] und intermolekulare Bindungen [31, 40–45] analysiert werden.

Optische Pinzetten basieren darauf, Mikrometer-große Objekte ausschließlich mittels photonischer Kräfte zu fangen und dreidimensional zu manipulieren. Durch die außerordentliche Orts- ( $\pm 2$  nm), Kraft- ( $\pm 0,2$  pN) und Zeitaufösung ( $\pm 17$  ms) eignet sich die in dieser Arbeit verwendete Optische Pinzette zur dynamischen Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen auf molekularer Ebene. Durch die Charakterisierung einer spezifischen Bindung anhand verschiedener Bindungsparameter, wie z.B. der Bindungsdauer, der Bindungshäufigkeit und der Affinitätskonstante, gewähren optische Fallen auch Einblicke in dynamische Assoziations- und Dissoziationsprozesse [36–38, 46–53]. Neben der Untersuchung einzelner Bindungen ist dies ein weiterer Vorteil gegenüber den statischen Methoden, wie ELISA und Western Blot, mit denen ein grundlegendes Verständnis der Bindungskinetik nicht möglich ist. Diese Informationen können jedoch besonders im Hinblick auf die Detektion von unspezifischen Kreuzreaktionen, die gegebenenfalls zu Nebenwirkungen oder Fehldiagnosen führen können, von großem Wert sein [54].

In dieser Arbeit werden mit Hilfe von Optischen Pinzetten kraftspektroskopische Experimente durchgeführt, um die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Tau-Peptiden und ihren phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörpern auf Einzelbindungsniveau zu untersuchen. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Bestimmung des von Antikörper HPT-101 erkannten Epitops anhand einzelner Aminosäuren (vgl. Abschnitt 4.1) aus dem biphospho-

rylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235]. In diesem Zusammenhang werden objektive Kriterien zur Definition essentieller, sekundärer und nicht-essentieller Aminosäuren aufgestellt und die erhaltenen Ergebnisse mit denen aus ELISA-Messungen verglichen. Im zweiten Projekt dieser Arbeit wird eine kombinierte Methodik aus Fluoreszenz- und Kraftspektroskopiemessungen vorgestellt, um die Datenvarianz in der Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeit zu reduzieren (vgl. Abschnitt 4.2), was eine genauere Bestimmung der Affinitätskonstanten ermöglicht. Zur Demonstration des Prinzips werden die Interaktionen zwischen dem fluoreszenzmarkierten, monophosphorylierten Peptid Tau[F1-pThr231] und seinem spezifischen Antikörper HPT-104 untersucht. Die Grundlagen für die hier durchgeführten Experimente sind in den Abschnitten 2.1 - 3.2 beschrieben.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Theoretische Grundlagen

#### 2.1.1 Die Optische Pinzette<sup>1</sup>

Optische Pinzetten stellen neuartige experimentelle Werkzeuge dar, mit denen es möglich ist, mikroskopische Objekte ausschließlich durch photonische Kräfte berührungsfrei in drei Dimensionen stabil zu halten und zu manipulieren [27]. Damit ein dielektrischer Partikel mit Hilfe eines einzelnen stark fokussierten Lasers (z.B. mit einem TEM<sub>00</sub>-Profil) gefangen werden kann, müssen folgenden Bedingungen erfüllt sein: Zum einen muss der Brechungsindex des verwendeten Kolloids größer sein als der des Umgebungsmediums, so dass gilt:

$$m = \frac{n_{\text{Kolloid}}}{n_{\text{Medium}}} > 1. \quad (2.1)$$

Zum anderen muss die resultierende Kraft, bestehend aus Streu- und Gradientenkraft [56], die brownische Molekularbewegung der Kolloide deutlich dominieren. Hierfür wird in Ashkin *et al.* eine experimentelle Bedingung angegeben [27]:

$$\exp\left(-\frac{U}{k_B T}\right) \ll 1,$$

wobei  $U$  das Potential der Gradientenkraft und  $k_B T$  die thermische Energie ist.

Beim Übergang von Licht aus dem Umgebungsmedium ( $n_{\text{Medium}}$ ) in einen dielektrischen Partikel ( $n_{\text{Partikel}}$ ) kommt es aufgrund von Brechungs-, Reflexions- und Beugungseffekten zum Impulsübertrag sowie zur Änderung der Strahlrichtung. Die daraus resultierenden Kräfte weisen eine starke Größenabhängigkeit der verwendeten Partikel auf und können in drei verschiedene Regime unterteilt werden:

1.  $D_0 \gg \lambda$
2.  $D_0 \ll \lambda$
3.  $D_0 \approx \lambda$

Der Grenzfall, in dem der Partikeldurchmesser  $D_0$  viel größer als die einfallende Wellenlänge  $\lambda$  ist, wird als strahlenoptisches oder Mie-Regime bezeichnet [56]. Dem entgegen steht das Rayleigh-Regime, in dem gilt:  $D_0 \ll \lambda$  [27]. Für diese beiden Annäherungen lassen sich

---

<sup>1</sup>Der folgende Abschnitt ist in ähnlicher Form vom Autor bereits in [55] verwendet worden.

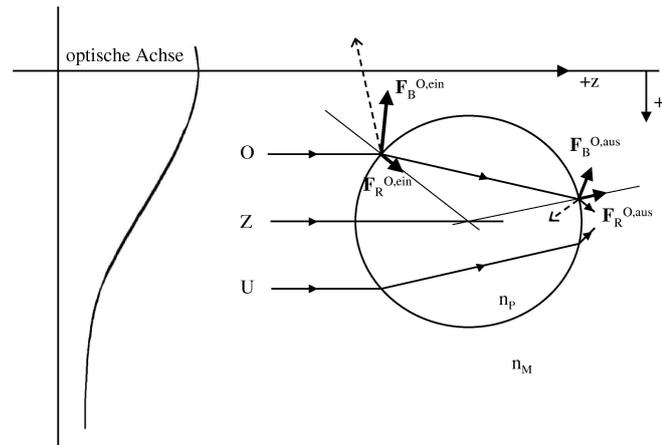
exakte Ausdrücke der Streu- und Gradientenkraft herleiten. Zur adäquaten Beschreibung für das dritte Regime,  $D_0 \approx \lambda$ , müssen komplexe Modelle herangezogen werden, die teilweise nur eine numerische Berechnung der wirkenden Kräfte erlauben. Für genauere Betrachtungen zu diesem sogenannten Lorenz-Mie-Regime wird auf die Literatur verwiesen [57, 58].

### 2.1.1.1 Das Mie-Regime $D_0 \gg \lambda$

Im Mie- oder auch strahlenoptischen Regime wird der Kugeldurchmesser  $D_0$  viel größer als die Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichtes angenommen. Aufgrund dieser Bedingung können die Welleneigenschaften des Lichtes vernachlässigt werden. Im Speziellen betrifft das sämtliche Beugungseffekte, wodurch eine Beschreibung mittels Strahlenoptik ausreichend ist. Dem Formalismus der geometrischen Optik folgend, wird der einfallende Lichtstrahl in viele Einzelstrahlen mit gleicher Ausbreitungsrichtung, Polarisation und entsprechender Intensität zerlegt [56]. Das Kolloid wird als durchsichtige, sphärische Kugel angenommen. Diese verfügt über einen höheren Brechungsindex  $n_{\text{Partikel}}$  als das umgebende Medium  $n_{\text{Medium}}$ , so dass es sich wie eine Sammellinse verhält [59].

Wie bereits erwähnt, wird die resultierende Gesamtkraft über den Impulsübertrag des Lichtes auf den Partikel bestimmt, wenn dieses auf der Oberfläche gebrochen bzw. reflektiert wird. Um den Ursprung der Kraft für einen nicht fokussierten Laserstrahl zu verdeutlichen, werden zunächst drei Strahlen O, Z und U betrachtet, wobei Z durch den Mittelpunkt des Kolloids verläuft (vgl. Abb. 2.1). O und U sind jeweils um den gleichen Betrag in  $+r$ - und  $-r$ -Richtung verschoben, wodurch Strahl O aufgrund des gaußschen Strahlprofils eine größere Intensität aufweist als U [59]. Das Kolloid befindet sich im Strahlungsfeld des Lasers, aber nicht zwingend auf der optischen Achse.

Trifft Strahl O auf die Partikeloberfläche, wird dieser in einen gebrochenen und einen reflektierten Strahl aufgeteilt. Die Intensitäten verhalten sich entsprechend der fresnelschen Reflexions- und Transmissionskoeffizienten [59]. Aufgrund der Brechung entsteht eine Kraft  $F_B^{O,\text{ein}}$ , die Komponenten in Richtung der optischen Achse und senkrecht dazu besitzt. Weiterhin existiert eine Kraft  $F_R^{O,\text{ein}}$ , die durch Teilreflexion an der Oberfläche entsteht. Analoges passiert, wenn der Strahl O den Partikel verlässt.  $F_B^{O,\text{aus}}$  und  $F_R^{O,\text{aus}}$  stehen für die Kräfte durch Brechung bzw. Reflexion auf der Innenseite der Kolloidoberfläche. Die jeweiligen Orientierungen der Kräfte sind aus Abb. 2.1 zu entnehmen. Die Beträge der radialen Komponenten von  $F_B^{O,\text{ein}}$  und  $F_B^{O,\text{aus}}$  sind deutlich größer als die der Reflexion, wodurch diese vernachlässigt werden können [59]. Eine weitere Vereinfachung ergibt sich dadurch, dass sich die radialen Anteile von  $F_B^{O,\text{ein}}$  und  $F_B^{O,\text{aus}}$  in erster Näherung aufheben. Die Vektorsumme über alle verbliebenen Komponenten ergibt eine Nettokraft  $F^O$  in Richtung höchster Lichtintensität, also in Richtung der optischen Achse. Ähnliche Betrachtungen lassen sich für den Strahl U anstellen, nur dass die Nettokraft  $F^U$  in Regionen niedrigerer Strahlintensitäten orientiert ist. Der Mittelpunktstrahl liefert nur Komponenten in  $+z$ -Richtung, so dass das Kolloid vom Ursprung des Lasers weg beschleunigt wird. Um die Gesamtkraft auf den dielektrischen Partikel zu erhalten, müssen die Kraftkomponenten sämtlicher Strahlen aufaddiert



**Abbildung 2.1:** Ein dielektrischer Partikel  $D_0 \gg \lambda$  befindet sich im Strahlungsfeld eines unfokussierten Lasers mit gaußförmigem Strahlprofil (TEM<sub>00</sub>-Profil). Die Strahlen O, Z und U bewirken einen Impulsübertrag an den jeweiligen Grenzflächen. Die resultierenden Kräfte sind für den Fall  $n_{\text{Partikel}} > n_{\text{Medium}}$  eingezeichnet. Die Nettokraft wirkt in +z- und -r-Richtung [59]. (Abbildung nach A. Ashkin [59].)

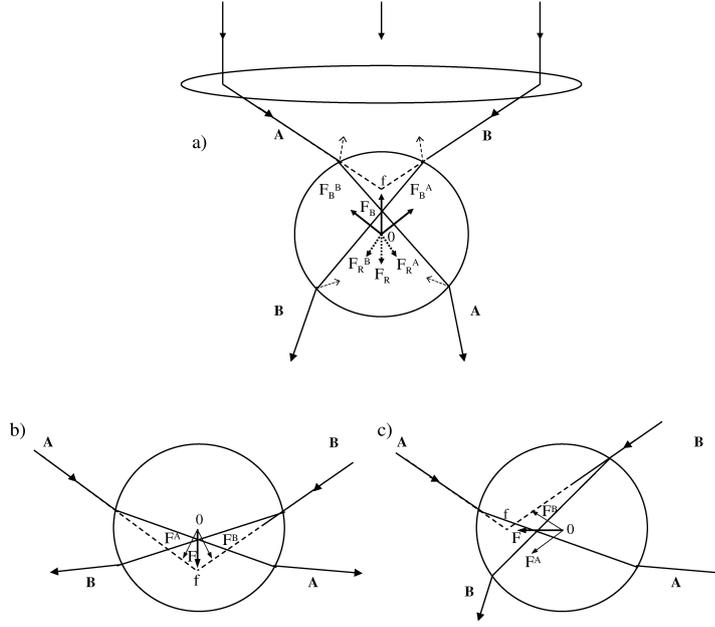
werden. Aufgrund des gaußschen Strahlprofils liefern Strahlen näher der optischen Achse größere Kraftbeiträge als weiter entfernte. Dadurch zeigt die resultierende Kraft zum Intensitätsmaximum (Gradientenkraft, proportional zum Intensitätsgradienten) und in z-Richtung (Streukraft, proportional zur Strahlintensität) [27, 59]. Somit wird das Kolloid in z-Richtung beschleunigt und in Richtung der optischen Achse gezogen.

Um mit einer solchen Anordnung einen dielektrischen Partikel stabil in drei Dimensionen zu fangen, wird der Laser so ausgerichtet, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Streu- und Gravitationskraft einstellt (englisch: *optical levitation trap*) bzw. wird ein weiterer Laser mit entgegengesetzter Orientierung benötigt (englisch: *dual beam trap*).

1986 berichteten A. Ashkin *et al.* das erste Mal über das dreidimensionale Fangen eines Partikels mittels eines einzigen stark fokussierten Lasers [27]. Auch für diesen Fall können explizite Ausdrücke für die wirkenden Kräfte hergeleitet werden. Die physikalische Beschreibung dieser Anordnung ist ähnlich zu der eines nicht fokussierten Lasers (vgl. Abb. 2.2). Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Gradientenkraft nicht mehr in Richtung der optischen Achse orientiert ist, sondern zum Fokuspunkt zeigt. Für den Fall, dass der effektive Brechungsindex  $m$  größer als 1 ist (vgl. Gl. 2.1), dominiert die Gradientenkraft die Streukraft und der Partikel wird in den Fokus gezogen. Im Brennpunkt herrscht ein Gleichgewichtszustand zwischen allen einwirkenden Kräften (z.B.  $F_{\text{Grad}}$ ,  $F_{\text{Streu}}$  und  $F_{\text{Gravitation}}$ ), wodurch das Kolloid stabil im Fokus fixiert wird.

### 2.1.1.2 Das Rayleigh-Regime $D_0 \ll \lambda$

Unter der Annahme, dass der Partikeldurchmesser  $D_0$  hinreichend kleiner als die Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Laserlichtes ist, kann die Beschreibung der photonischen Kräfte anhand der elektromagnetischen Wellentheorie erfolgen. Aufgrund der vernachlässigbaren Größe des Partikels ist die Störung der Wellenfront am Objekt minimal. Somit kann das Kolloid als



**Abbildung 2.2:** a) Schematische Darstellung der photonischen Kräfte die auf einen dielektrischen Partikel in einer optischen Falle (fokussierter Laser) wirken. Die Brechung der Strahlen A und B ruft die Kräfte  $F^A$  und  $F^B$  hervor, deren Vektorsumme  $\vec{F}$  als rücktreibende Kraft zum Fokuspunkt wirkt. b), c) Darstellung der rücktreibenden Kraft  $\vec{F}$  bei b) vertikaler und c) horizontaler Verschiebung des Kolloids gegenüber dem Fokus. Auf die Darstellung der betragsmäßig kleineren Streukraft wurde in allen Abbildungen verzichtet [56, 59]. (Abbildung nach A. Ashkin [56].)

induzierter punktförmiger Dipol behandelt werden. Auch Beugungseffekte, Brechung und Reflexion sind in diesem Regime zu vernachlässigen [56]. Die resultierende Kraft lässt sich erneut in Komponenten von Streu- und Gradientenkraft zerlegen. Die Streukraft resultiert aus dem Impulsübertrag durch die Streuung am induzierten Dipol [27, 56, 60–62]. Da das elektrische Feld harmonisch oszilliert, folgt der induzierte Dipol dieser Bewegung, wobei er Sekundär- und Streuwellen emittiert. Wegen dieser Streuereignisse ändert sich sowohl die Amplitude als auch die Richtung des Energieflusses der einfallenden Welle. Werden alle Beiträge aufsummiert, ergibt sich eine Nettokraft in Richtung des einfallenden Photonenflusses [27, 60, 61, 63]:

$$\begin{aligned}
 F_{\text{Streu}} &= n_{\text{Medium}} \frac{\sigma_{\text{Streu}} \langle S(\vec{x}, t) \rangle_T}{c} \\
 &= \frac{128\pi^5 R_0^6}{3\lambda^4} \frac{n_{\text{Medium}}}{c} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I_0,
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

wobei  $\langle S(\vec{x}, t) \rangle_T$  der zeitlich gemittelte Poynting-Vektor,  $\sigma_{\text{Streu}}$  der Streuquerschnitt des Partikels,  $R_0$  der Partikelradius,  $m$  der effektive Brechungsindex,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit,  $\lambda$  die Wellenlänge und  $I_0$  die Intensität des einfallenden Lichtes ist.

Die Gradientenkraft beschreibt den Einfluss der Lorentzkraft auf den induzierten Dipol. Ausgehend von den Maxwellgleichungen, lässt sich die Lorentzkraft als eine Kombination aus elektrischem Feldstärkevektor  $\vec{E}$  und magnetischem Feldstärkevektor  $\vec{B}$  beschreiben [60]:

$$F_{\text{Lorentz}} = [p(\vec{x}, t) \cdot \nabla] E(\vec{x}, t) + \underbrace{\frac{1}{c} \frac{dp(\vec{x}, t)}{dt}}_{=0} \times B(\vec{x}, t). \quad (2.3)$$

Hierbei entspricht  $p(\vec{x}, t)$  dem elektrischen Dipolmoment. Der zweite Term in Gl. 2.3 ist für einen kontinuierlich arbeitenden Laser gleich Null. Die resultierende Gradientenkraft ist eine zeitgemittelte Version von Gl. 2.3 und ergibt sich zu [63]:

$$F_{\text{Grad}} = -\frac{2\pi R_0^3}{c} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I. \quad (2.4)$$

Somit gilt auch im Rayleigh-Regime, dass die Streu- und Gradientenkraft ausschließlich von den Eigenschaften des Partikels (insbesondere vom Radius  $R_0$ ) und des Lasers (insbesondere von der Intensität  $I_0$  bzw. der ersten Ableitung  $\nabla I$ ) abhängen. Die Streukraft zeigt in Richtung des einfallenden Photonennflusses und die Gradientenkraft wirkt für  $m > 1$  in Richtung höchster Intensität, also zum Fokus des Lasers. Um ein Kolloid stabil im Fokus des Lasers zu halten, muss die Voraussetzung  $F_{\text{Grad}} > F_{\text{Streu}}$  erfüllt sein, analog zum Mie-Regime.

### 2.1.1.3 Gültigkeit im Experiment

Die in dieser Arbeit verwendeten Kolloide besitzen einen Radius  $R_0 \approx 1 \mu\text{m}$  und liegen damit im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ). Somit kann weder der Mie- noch der Rayleigh-Formalismus zur Bestimmung der Fallenkräfte herangezogen werden. Um jedoch aufwendige Berechnungen im Lorenz-Mie-Regime zu vermeiden, kann auf spezielle Kalibrierungsmethoden zurückgegriffen werden.

Für ein sphärisches Kolloid in einem stark fokussierten, gaußförmigen Laser kann das Potential der optischen Falle bei kleinen Auslenkungen  $x_i$  des Partikels um seine Gleichgewichtslage für jede Dimension  $i \in [1, 3]$  als harmonisch angenommen werden [64, 65]:

$$V(x_i) = \frac{k_i}{2} x_i^2, \quad (2.5)$$

wobei  $k_i$  die Kraftkonstante der optischen Falle darstellt. Durch diese Beziehung kann die rücktreibende Kraft wie folgt berechnet werden:

$$F = -\frac{dV(x_i)}{dx_i} = -k_i x_i. \quad (2.6)$$

Somit kann die auf ein Kolloid wirkende Kraft bei Kenntnis der Kraftkonstante  $k_i$  aus der Verschiebung  $x_i$  bestimmt werden [63, 64]. Methoden, die zur experimentellen Berechnung von  $x_i$  und  $k_i$  verwendet werden können, werden in Abschnitt 3.1.2 bzw. 3.1.3 genauer beschrieben.

Zur experimentellen Umsetzung einer dreidimensionalen optischen Falle wird ein Mikroskopobjektiv mit hoher numerischer Apertur ( $\approx 1,2$ ) benötigt [27, 56]. Mit solch einer An-

ordnung können neben dielektrischen Partikeln auch biologische Objekte, wie Blutzellen und Viren, manipuliert werden [56, 63]. Um an diesen Proben Schäden durch Lichtabsorption zu vermeiden, wird die Verwendung eines Nahinfrarot-Lasers (z.B.  $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) empfohlen [61]. Weiterhin müssen Temperaturgradienten beachtet werden, die lokale Erwärmungen in Fokussnähe hervorrufen. Diese hängen von den Absorptionseigenschaften der gefangenen Objekte, der Laserwellenlänge und dessen Leistungsdichte sowie der Art des Umgebungsmediums ab. In Peterman *et al.* [66] wurde die laserinduzierte Erwärmung einer Messzelle durch einen stark fokussierten Laser ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) anhand der Fluktuationsanalyse eines in der optischen Falle gefangenen Partikels bestimmt. Für eine wässrige Lösung (z.B. PBS<sup>2</sup>) ergab sich eine Wärmerate von  $8(1) \text{ W/K}$  im Fokus. Die in dieser Arbeit verwendete Laserleistung beläuft sich auf  $200 \text{ mW}$  (vgl. Abschnitt 3.1.1). Somit ergibt sich eine Temperaturerhöhung von ungefähr  $1,6 \text{ K}$ . Durch den regelmäßigen Austausch des Umgebungsmediums ist dieser Effekt in Anbetracht der Messgenauigkeit vernachlässigbar.

### 2.1.2 Die spezifische Bindung

Unter biologischen Bindungen werden schwache, nicht-kovalente Wechselwirkungen verstanden. Diese zwischenmolekularen Interaktionen besitzen typische Bindungsenergien im Bereich von  $7 - 30 k_B T$  [68], wobei mehrere solcher Rezeptor-Ligand-Bindungen beispielsweise die räumliche Konformation von Makromolekülen stabilisieren sowie hochspezifische Wechselwirkungen zwischen Molekülen vermitteln [69]. Aus physikalischer Sicht basiert jede dieser Bindungen auf dem Zusammenspiel von vier<sup>3</sup> anziehenden, kurzreichweitigen Wechselwirkungen. Dazu gehören elektrostatische Wechselwirkungen (Bindungsenergie:  $4,8 - 11,7 k_B T$  [71]), Van der Waals-Wechselwirkungen (Bindungsenergie:  $0,02 - 6 k_B T$  [68]), Wasserstoffbrückenbindungen (Bindungsenergie:  $1,5 - 15 k_B T$  [71]) und hydrophobe Wechselwirkungen (Bindungsenergie:  $\approx 1 k_B T$  [68]). Durch die verhältnismäßig niedrigen Bindungsenergien<sup>4</sup> haben Rezeptor-Ligand-Bindungen nur eine begrenzte Lebensdauer, die von wenigen Sekunden bis hin zu mehreren Tagen variieren kann [72, 73]. Damit können Rezeptoren und Liganden kurzweilig mit einander interagieren und sich nach „getaner Arbeit“ wieder voneinander lösen. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für alle dynamischen Prozesse (z.B. die Immunantwort [68]) in Lebewesen. Zur Charakterisierung von spezifischen Bindungen zwischen Biomolekülen werden verschiedene Parameter und Theorien benötigt, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

---

<sup>2</sup>Die phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: *phosphate buffered saline*) ist eine Pufferlösung mit pH-Wert 7,4, die den selben osmotischen Druck besitzt, wie der menschliche Organismus [67].

<sup>3</sup>Manche Autoren beziffern die tatsächliche Anzahl von Wechselwirkungen deutlich höher. Diese zusätzlichen Kräfte liefern jedoch oft nur kleine Beiträge zur Bindungsenergie, weswegen sie hier vernachlässigt werden. Für eine ausführliche Diskussion wird auf die Literatur verwiesen [68, 70].

<sup>4</sup>Kovalente Bindungen weisen Bindungsenergien von  $\approx 140 k_B T$  auf [68].

### 2.1.2.1 Spezifität und Affinität

Grundsätzlich haben spezifische und unspezifische Wechselwirkungen (z.B. elektrostatische Interaktionen an geladenen Gruppen der Moleküle) denselben physikalischen Ursprung. Eine Möglichkeit, diese beiden Prozesse zu unterscheiden, stellt die Einführung der Spezifität dar. Unter diesem Begriff wird die Fähigkeit von Biomolekülen verstanden, zwischen verschiedenen, chemisch verwandten Strukturen zu differenzieren. Ein eindrucksvolles Beispiel dafür ist das Immunsystem, das ein Falsches aus  $10^9$  Molekülen erkennt [68]. Eine erste heuristische Erklärung, dass bestimmte Moleküle ausschließlich an ihr Zielepitop<sup>5</sup> binden, wurde 1894 von Emil Fischer vorgestellt. Dieses heute als Schlüssel-Schloss-Prinzip (auch molekulare Erkennung genannt) bekannte Modell nimmt an, dass Biomoleküle, die spezifisch miteinander wechselwirken, chemisch und topologisch komplementär sind [75]. Dies impliziert, dass neben dem Aufbau der Moleküle und ihren Wechselwirkungspotentialen auch deren Topologie essentiell für ihre Funktionalität ist. Das Bild von „starrten“ Interaktionspartnern stimmt jedoch nur unter Vorbehalt, da diese thermischen Fluktuationen unterliegen. Dies bedingt, dass die Schlüssel und Schlösser flexibel sind. Somit treten bei der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden gegenseitige Anpassungen der Molekülstruktur auf, was zur Reduktion der freien Energie und somit zur Stabilisierung der Bindung führt [68]. Dieses Verfahren wird als induzierte Passung (englisch: *induced fit*) bezeichnet [76].

Die Affinität beschreibt die Stärke der Bindung zwischen Rezeptoren und Liganden. Sie ist verwandt mit der Spezifität, es muss jedoch beachtet werden, dass eine Bindung sehr stark - mit hoher Affinität - aber dennoch unspezifisch sein kann [68]. Somit ist die Spezifität einer Bindung ein rein phänomenologischer Parameter, wohingegen die Affinität durch reale Messgrößen definiert ist.

Beschrieben wird die Affinität mit Hilfe der Affinitätskonstante<sup>6</sup>  $K_a$  (Einheit:  $M^{-1} = L/mol$ ). Sie dient der Erklärung einer Rezeptor-Ligand-Bindung im thermodynamischen Gleichgewicht. Ausgehend vom Massewirkungsgesetz kann bestimmt werden, wie viel Mol eines Produktes von zwei Edukten, z.B.  $A$  und  $B$ , im Gleichgewicht gebildet werden:



Durch das Einführen von molaren Konzentrationen kann das Massenwirkungsgesetz wie folgt umformuliert werden:

$$\frac{[A_{eq.}][B_{eq.}]}{[AB_{eq.}]} = K_d = \frac{1}{K_a}, \quad (2.8)$$

wobei  $[A_{eq.}]$  und  $[B_{eq.}]$  die molaren Konzentrationen der Edukte  $A$  und  $B$  sind.  $K_d$  stellt die Dissoziationskonstante dar und gibt an, auf welcher „Seite“ das Gleichgewicht liegt. Für große Dissoziationskonstanten liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte und für kleine auf der der Produkte. Für viele biologische Prozesse reicht eine Beschreibung mit Hilfe von Gleichgewichtskonstanten jedoch nicht aus, da sie fernab vom Gleichgewicht verlaufen.

<sup>5</sup>Das Epitop ist die definierte Bindungsstelle an einem Antigen, das durch einen Antikörper oder einen Antigen-Rezeptor erkannt wird [74].

<sup>6</sup>In der Literatur wird die Affinitätskonstante auch gelegentlich als Assoziationskonstante bezeichnet.

Abhilfe schafft die Einführung von kinetischen Raten, so dass sich die oben beschriebene bimolekulare Reaktion (vgl. Gl. 2.7) wie folgt umformulieren lässt [77]:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}} [A] [B] - k_{\text{off}} [AB] \stackrel{!}{=} 0, \quad (2.9)$$

wobei  $k_{\text{on}}$  (Einheit:  $(\text{sM})^{-1}$ ) und  $k_{\text{off}}$  (Einheit:  $\text{s}^{-1}$ ) für die on-Rate bzw. die off-Rate steht. Die Bedingung, dass die Anzahl der gebildeten Komplexe  $[AB]$  unabhängig von der Zeit ist, ist dem detaillierten Gleichgewicht (englisch: *detailed balance*) geschuldet. Es gibt an, dass im Gleichgewicht jeder Prozess durch seinen Gegenprozess ausgeglichen wird [78]. Damit kann die Affinitätskonstante in Abhängigkeit der on- und off-Rate ausgedrückt werden und stellt den Zusammenhang zwischen Thermodynamik im Gleichgewicht und phänomenologischer Kinetik her [79, 80]:

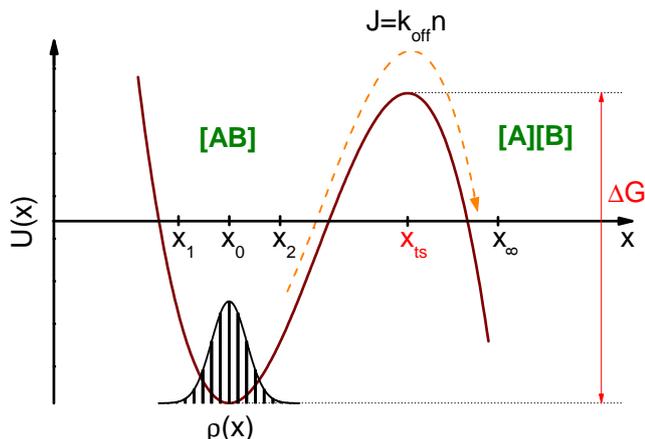
$$K_{\text{a}} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}. \quad (2.10)$$

Die mittlere Lebensdauer einer Bindung ist definiert als das Inverse der zeitunabhängigen off-Rate:  $\tau_0 = k_{\text{off}}^{-1}$  [81]. Mit Hilfe von Gl. 2.10 kann zum Beispiel erklärt werden, warum manche Rezeptor-Ligand-Paare kurzlebige Bindungen ausbilden, wohingegen andere mehr Zeit benötigen, um stabile Bindungen zu realisieren [77].

Mit dem Konzept von Spezifität, Affinität sowie thermodynamischer Gleichgewichts- und Ratenkonstanten ( $k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$ ) lassen sich demnach grundlegende Eigenschaften von Rezeptor-Ligand-Bindungen erklären [82]. Allerdings wurde innerhalb der letzten Jahrzehnte beobachtet, dass externe Kräfte einen großen Einfluss auf die Natur biologischer Wechselwirkungen haben [83]. Diese dynamischen Prozesse verlaufen jedoch im Nicht-Gleichgewicht und können mit den zuvor hergeleiteten Gleichungen nicht beschrieben werden.

### 2.1.2.2 Mechanische Dissoziation einer spezifischen Bindung

Die theoretische Beschreibung der kraftinduzierten Dissoziation einer spezifischen Bindung leitet sich aus dem allgemeinen Konzept der thermisch aktivierten Überwindung einer Energiebarriere unter dem Einfluss eines externen Feldes ab [81]. Dazu wird eine ideale Bindung angenommen. Das bedeutet, dass der gebundene Zustand  $[AB]$  in einer eindimensionalen Energielandschaft als Minimum beschrieben wird, welches durch eine einzelne Energiebarriere begrenzt ist. Aus Abb. 2.3 geht hervor, dass diese Barriere an der Stelle  $x_{\text{ts}}$  ein Maximum der Höhe  $\Delta G$  (freie Aktivierungsenergie) besitzt. Die Reaktionskoordinate  $x$  entspricht dem energetisch bevorzugten Pfad durch diese Energielandschaft, dem die Dissoziationsreaktion folgt, und ist frei gewählt. Die stochastische Rate, mit der das System in den gebundenen Zustand  $[AB]$  kommt, wird als on-Rate  $k_{\text{on}}$  bezeichnet. Die Dissoziationsrate ist durch die off-Rate  $k_{\text{off}}$  gegeben. Die Annahme einer idealen Bindung stellt jedoch eine starke Idealisierung dar. Die reale Energielandschaft ist in der Regel mehrdimensional und strukturiert, wodurch die Potentialform von der hier gemachten Annahme abweichen kann. Allerdings lassen sich mit dem eben beschriebenen Konzept eine Großzahl von Rezeptor-Ligand-Bindungen beschreiben [80, 81, 84, 85]. Die kinetischen Raten, mit der die bimolekulare Reaktion (vgl.



**Abbildung 2.3:** Die Abbildung zeigt die eindimensionale Energielandschaft einer idealen Bindung entlang der Reaktionskoordinate  $x$ . Der gebundene Zustand  $[AB]$  ist durch ein ausgeprägtes Minimum an der Stelle  $x_0$  (Quelle) dargestellt und wird durch eine Energiebarriere der Höhe  $\Delta G$  begrenzt (Maximum bei  $x = x_{ts}$ ). Der quasi-statische Wahrscheinlichkeitsfluss  $J$  aus dem gebundenen Zustand  $[AB]$  in den ungebundenen Zustand  $[A][B]$  wird über das Produkt aus off-Rate  $k_{\text{off}}$  und Teilchenzahl  $n$  definiert, wobei  $\rho(x)$  das Reservoir aller zur Verfügung stehenden Moleküle im gebundenen Zustand angibt. (Abbildung nach Vorlage von E. Evans et al. [80] und R. Friddle [81].)

Gl. 2.7 und 2.8) abläuft, lassen sich mit Hilfe von Kramers Reaktionsratentheorie herleiten [86]. Ein Spezialfall dieser Theorie beschreibt die überdämpfte Kinetik<sup>7</sup> chemischer Reaktionen in kondensierten Flüssigkeiten auf der Basis von Einsteins Diffusionstheorie [87, 88]. Die Trajektorien von Molekülen (z.B.  $A$  und  $B$ ), die sich frei in einer Flüssigkeit bewegen, unterliegen der Diffusionsgleichung:

$$\frac{\partial \rho(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \rho(x,t)}{\partial x^2}, \quad (2.11)$$

wobei  $D$  die Diffusionskonstante und  $\rho(x,t)$  die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Moleküle am Ort  $x$  zum Zeitpunkt  $t$  darstellt [81]. Mit Hilfe der Kontinuitätsgleichung kann der Fluss  $J$  von Molekülen an einem Punkt  $x$  bei Vorhandensein eines externen Kraftfeldes  $U(x)$  durch die Smoluchowski-Gleichung [89] dargestellt werden:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho(x,t)}{\partial t} &= -\frac{\partial}{\partial x} J(x,t) \\ &= \frac{\partial}{\partial x} \left( \frac{k_B T}{\eta} \frac{\partial \rho(x,t)}{\partial x} + \frac{1}{\eta} \rho(x,t) \frac{dU(x)}{dx} \right). \end{aligned} \quad (2.12)$$

Hierbei wurde die einsteinsche Beziehung für die Diffusionskonstante  $D = k_B T \eta^{-1}$  verwendet, wobei  $\eta$  der Reibungskoeffizient ist. Für ein glattes Potential  $U(x)$ , das an der Stelle  $x_0$  ein Minimum (Quelle) und bei  $x_{ts}$  ein Maximum besitzt (vgl. Abb. 2.3), kann der quasi-statische Fluss aus dem gebundenen Zustand über die Energiebarriere berechnet werden [81]:

<sup>7</sup>Die Annahme einer überdämpften Kinetik ist für biologische Fragestellungen damit zu rechtfertigen, dass die Zeitskala, auf der sich die kinetischen Raten ( $t_{\text{Rate}} \approx 1/\text{s} - 10^{-7}/\text{s}$  [80]) abspielen, viel größer ist als die der thermischen Fluktuation ( $t_{\text{Brown}} \approx 10^{-12}/\text{s}$  [81]).

$$J = \frac{k_B T}{\eta} \frac{\rho(x_0) \exp[U(x_0)/k_B T]}{\int_{x_0}^{x_\infty} \exp[U(x)/k_B T] dx}. \quad (2.13)$$

Als Randbedingung wird angenommen, dass  $\rho(x_\infty) \equiv 0$  ist und die Integration im Intervall  $x \in [x_0, x_\infty]$  ausgeführt. Ein allgemeiner Ausdruck für die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  lässt sich über das Verhältnis aus Fluss  $J$  und der Anzahl von Molekülen  $n$ , die sich im gebundenen Zustand befinden, berechnen. In der Nähe von  $x_0$  kann angenommen werden, dass der Fluss nahezu null ist, wodurch sich die Menge an Molekülen durch eine quasi-statische Boltzmann-Verteilung  $\rho(x)$  beschreiben lässt. Durch die Summation über alle Teilchen in einem schmalen Bereich um das Minimum ( $x \in [x_1, x_2]$ ) ergibt sich für die Partikelpopulation folgende Gleichung [81]:

$$n = \rho(x_0) \int_{x_1}^{x_2} \exp[(U(x_0) - U(x))/k_B T] dx. \quad (2.14)$$

Durch Verwendung von Gl. 2.13 und 2.14 berechnet sich die Dissoziationsrate zu:

$$k_{\text{off}} = \frac{J}{n} = \frac{k_B T}{\eta} \underbrace{\left( \int_{x_0}^{x_\infty} \exp[U(x)/k_B T] dx \right)^{-1}}_{\text{Übergangszustand}} \underbrace{\left( \int_{x_1}^{x_2} \exp[-U(x)/k_B T] dx \right)^{-1}}_{\text{gebundener Zustand}}. \quad (2.15)$$

Diese allgemeine Lösung für die off-Rate kann für eine ideale Energielandschaft, wie sie in Abb. 2.3 dargestellt ist, vereinfacht werden. Hierbei wird das Potential um den gebundenen Zustand  $x_0$  sowie um den Übergangszustand  $x_{\text{ts}}$  als näherungsweise parabolisch beschrieben [81, 86]. Es gilt:

$$U(x) = \begin{cases} \frac{\kappa_0}{2}(x - x_0)^2, & \text{gebundener Zustand} \\ \Delta G - \frac{\kappa_b}{2}(x - x_{\text{ts}})^2, & \text{Übergangszustand.} \end{cases} \quad (2.16)$$

Dabei ist  $\Delta G$  die freie Aktivierungsenergie,  $\kappa_0 = U''(x_0)$  und  $\kappa_b = |U''(x_{\text{ts}})|$  die Krümmung des Potentialminimums bzw. der Energiebarriere. Daraus ergibt sich Kramers Dissoziationsrate für ein überdämpftes Molekül:

$$\begin{aligned} k_{\text{off}} &= \frac{\sqrt{\kappa_0 \kappa_b}}{2\pi\eta} \exp[-\Delta G/k_B T] \\ &= A \exp[-\Delta G/k_B T]. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Analoge Betrachtungen können auch für die Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$  angestellt werden [80].

### 2.1.2.3 Dissoziation einer idealen Bindung unter Krafteinwirkung: Das Bell-Evans-Modell

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene Theorie für thermisch induzierte Übergänge über eine Energiebarriere soll nun für den Fall einer konstanten, extern wirkenden Kraft erweitert werden. Phänomenologische Pionierarbeiten zu diesem Thema wurden von G. Bell 1978 durchgeführt [90]. Der Krafteinfluss auf eine Bindung hat zur Folge, dass die Barrierenhöhe  $\Delta G$  reduziert wird (vgl. Abb. 2.4), wodurch diese in Gl. 2.17 eine Funktion vom Kraftpotential  $V(x, x_{\text{Feder}})$  wird:

$$\Delta G(x, x_{\text{Feder}}) = \Delta U(x, x_{\text{Feder}}) = \Delta G - V(x, x_{\text{Feder}}) \quad (2.18)$$

Hierbei wurde vorausgesetzt, dass die Reaktionskoordinate des bevorzugten Pfades  $x$  durch die Richtung der Kraft  $F_{\text{ext}}$  festgelegt wird und mit ihr übereinstimmt [80]. Weiterhin kann die Barriere in ihrer Form sowie Position leicht verändert werden, was in den folgenden Betrachtungen jedoch vernachlässigt werden soll. Das Kraftpotential ist in den meisten Fällen durch das parabolische Potential einer Feder gegeben [81]:  $V(x, x_{\text{Feder}}) = \frac{k_{\text{Feder}}}{2}(x - x_{\text{Feder}})^2$ .  $k_{\text{Feder}}$  steht für die Federkonstante und  $x_{\text{Feder}}$  für den intermolekularen Abstand. Für den Fall, dass sich der gebundene Zustand bei  $x_0 = 0$  befindet, kann Gl. 2.18 unter Verwendung des hookschen Gesetzes<sup>8</sup> ( $F = k_{\text{Feder}}x_{\text{Feder}}$ ) wie folgt umgeschrieben werden:

$$V(x, F) = \frac{F^2}{2k_{\text{Feder}}} - Fx + \frac{k_{\text{Feder}}}{2}x^2. \quad (2.19)$$

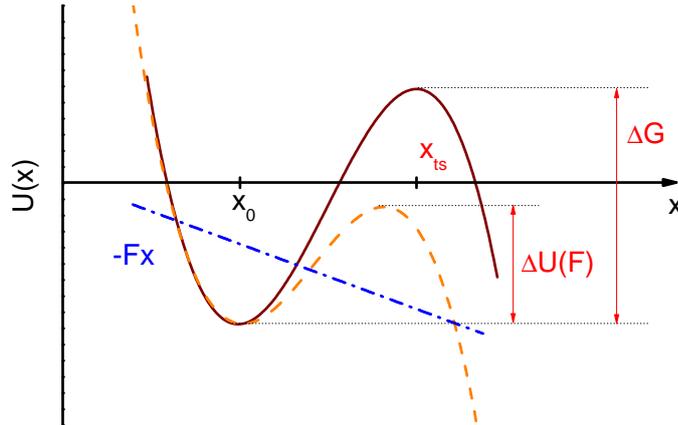
Der erste Term aus Gl. 2.19 entspricht dem Energiebetrag, um den der gebundene Zustand angehoben wird. Er spielt jedoch zur Berechnung der kinetischen off-Rate keine Rolle und kann vernachlässigt werden. Somit ergibt sich die Barrierenhöhe unter Einwirkung von  $V(x, F)$  zu:

$$\begin{aligned} \Delta U(F) &= U(x_{\text{ts}}) + V(x_{\text{ts}}, F) - [U(0) + V(0, F)] \\ &= \Delta G - Fx_{\text{ts}} + \frac{k_{\text{Feder}}}{2}x_{\text{ts}}^2. \end{aligned} \quad (2.20)$$

Hierbei wurde der intermolekulare Abstand  $x$  gleich der Bindungslänge  $x_{\text{ts}}$  gesetzt. Für weiche Federn und große Ziehkräfte kann weiterhin der dritte Term in  $\Delta U(F)$  verworfen werden [81]. Die kraftabhängige off-Rate ergibt sich durch Einsetzen von Gl. 2.20 in 2.17 (Bell-Gleichung):

$$\begin{aligned} k_{\text{off}}(F) &= A \exp[-\Delta U(F)/k_{\text{B}}T] \\ &= k_{\text{off}}^0 \exp[Fx_{\text{ts}}/k_{\text{B}}T], \end{aligned} \quad (2.21)$$

<sup>8</sup>Die Annahme des hookschen Gesetzes ist allerdings nur für sehr weiche Federn gerechtfertigt. Ist dies nicht der Fall, müssen Bindung und anliegende Kraft als zwei parallel gebundene Federn betrachtet werden. Dies wird im Folgenden jedoch vernachlässigt. Für eine detaillierte Beschreibung wird auf die Literatur verwiesen [91, 92].



**Abbildung 2.4:** Die Abbildung zeigt die Absenkung der Energiebarriere unter dem Einfluss eines Kraftfeldes  $-Fx$ . Dies hat zur Folge, dass die Potentialtiefe  $\Delta G$  reduziert wird und die Wahrscheinlichkeit einer Bindungsdissoziation steigt. Im Bell-Evans-Modell wird angenommen, dass sich die Barriere in ihrer Form sowie Position nicht verändert. (Abbildung nach Vorlage von E. Evans et al. [80].)

wobei  $k_{\text{off}}^0 = 1/\tau_0$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante aus Gl. 2.10 ist. Sie ist gleichbedeutend mit der off-Rate im unbelasteten, kraftfreien Zustand. Aus der eben hergeleiteten Beziehung folgt, dass die Lebenszeit einer idealen Bindung  $\tau_0$  mit steigender Belastung sinkt. Dieses Verhalten wird als „normale Bindung“ bezeichnet. Bindungen, für die die Lebenszeit mit größer werdender Kraft steigt, heißen „fangende Bindung“ (englisch: *catch bonds*) [93]. In den Experimenten, die in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschrieben werden, wird die angelegte Kraft jedoch stetig vergrößert, wodurch für die adäquate Beschreibung der Messdaten noch ein weiterer Parameter eingeführt werden muss. Neben der kraftabhängigen Lebensdauer einer spezifischen Bindung muss beachtet werden, dass mit steigender Belastung auch die Wahrscheinlichkeit eines Bindungsbruches steigt. Somit spielt die Rate, mit der eine Bindung belastet wird, die sogenannte *loading rate* bzw. *Belastungsrate*  $\dot{F} = dF/dt$ , eine zentrale Rolle in der Beschreibung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen [65]. Die theoretische Darstellung für diesen Fall erfolgt über einen Zwei-Zustand-Markov-Prozess [81, 94]. Dabei wird angenommen, dass sich das System zu Beginn im gebundenen Zustand (Anfangszustand oder englisch: *initial state*) und nach der Dissoziation im nicht-gebundenen Zustand (Endzustand oder englisch: *final state*) befindet. Somit kann die Wahrscheinlichkeit  $p_{\text{on}}$ , dass die Bindung zum Zeitpunkt  $t$  noch intakt ist, in Abhängigkeit von den zeitabhängigen kinetischen Raten  $k_{\text{on}}(t)$  und  $k_{\text{off}}(t)$  ausgedrückt werden:

$$\frac{d}{dt}p_{\text{on}}(t) = -k_{\text{off}}(t)p_{\text{on}}(t) + k_{\text{on}}(t)p_{\text{off}}(t). \quad (2.22)$$

Unter der Annahme, dass beide Wechselwirkungspartner nach dem Bindungsbruch schnell voneinander entfernt werden, kann die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Bindung vernachlässigt werden<sup>9</sup>. Dies ist bei den in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschriebenen Experimenten der Fall. Weiterhin kann  $p_{\text{on}}(t)$  einer intakten Bindung durch Ausnutzen von  $dt = \dot{F}^{-1}dF$  in eine

<sup>9</sup>Ein Modell das diesen Prozess berücksichtigt wird in Abschnitt 2.1.2.5 vorgestellt.

kraftabhängige Wahrscheinlichkeit umgewandelt werden. Für die Ratengleichung 2.22 ergibt sich [84]:

$$\frac{dp_{\text{on}}(F)}{dF} = -\frac{1}{\dot{F}(F)}k_{\text{off}}(F)p_{\text{on}}(F). \quad (2.23)$$

Daraus folgt für die Wahrscheinlichkeit, dass sich das System im gebundenen Zustand befindet, unter der Randbedingung  $p_{\text{on}}(0) = 1$ , zu:

$$p_{\text{on}}(F) = \exp \left[ -\int_0^F \dot{F}(F')^{-1} k_{\text{off}}(F') dF' \right]. \quad (2.24)$$

Die Verteilung der Abrisskräfte  $p(F)$  ist proportional zu der Anzahl von Bindungsdissoziationen im Zeitintervall  $[t, t+dt]$ , geteilt durch die Dauer des Intervalls  $dt$  [81]:  $p(t) = -dp_{\text{on}}(t)/dt$ . Unter Ausnutzung der Beziehung zwischen Kraft  $F$  und Zeit  $t$  (vgl. Belastungsrate) ergibt sich für  $p(F)$ :

$$\begin{aligned} p(F) &= \frac{1}{\dot{F}(F)}k_{\text{off}}(F)p_{\text{on}}(F) \\ &= \frac{1}{\dot{F}(F)}k_{\text{off}}(F) \exp \left[ -\int_0^F \dot{F}(F')^{-1} k_{\text{off}}(F') dF' \right]. \end{aligned} \quad (2.25)$$

Für eine linear ansteigende Kraft, d.h. für eine kraftunabhängige Belastungsrate, und unter Verwendung der bellschen off-Rate (2.21) kann Gl. 2.25 analytisch gelöst werden [81, 84]:

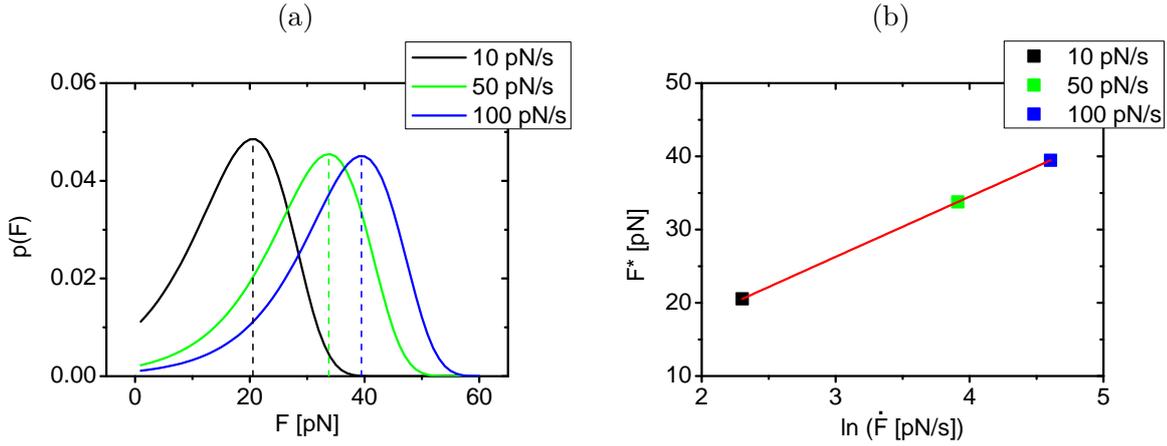
$$p(F) = \frac{1}{\dot{F}}k_{\text{off}}^0 \exp \left[ \frac{Fx_{\text{ts}}}{k_{\text{B}}T} \right] \exp \left[ -\frac{k_{\text{off}}^0 k_{\text{B}}T}{\dot{F}x_{\text{ts}}} \left( \exp \left[ \frac{Fx_{\text{ts}}}{k_{\text{B}}T} \right] - 1 \right) \right]. \quad (2.26)$$

Mit Hilfe dieses Ausdrucks lassen sich aus den experimentell gewonnenen Abrisskraftverteilungen die Bindungsparameter  $k_{\text{off}}^0$  und  $x_{\text{ts}}$  gewinnen. Dabei steht  $k_{\text{off}}^0$  für das Inverse der Lebensdauer einer Rezeptor-Ligand-Bindung im kraftfreien Zustand  $\tau_0$  und  $x_{\text{ts}}$  für die Bindungslänge [84].

Die eben hergeleitete Beziehung ist jedoch zur Bestimmung der beiden Bindungsparameter zu ungenau, da sie vielen Einschränkungen, die durch die Verwendung der Bell-Rate eingeführt werden, unterliegt. Eine weitaus exaktere Methode ergibt sich, indem die Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft  $F^*$  von der Belastungsrate  $\dot{F}$  betrachtet wird. Diese ist definiert als das Maximum der Abrisskraftverteilung ( $dp(F)/dF = 0$ ). Somit gilt:

$$F^*(\dot{F}) = \frac{k_{\text{B}}T}{x_{\text{ts}}} \ln \left( \frac{\dot{F}x_{\text{ts}}}{k_{\text{off}}^0 k_{\text{B}}T} \right). \quad (2.27)$$

Dieser Zusammenhang ist in Abb. 2.5 für drei theoretische Bindungen bei einer Belastungsrate von 10 pN/s (schwarze Kurve), 50 pN/s (grüne Kurve) bzw. 100 pN/s (blaue Kurve) dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich die Abrisskraftverteilungen für steigende Belastungsraten hin zu größeren Abrisskräften verschieben. Somit steigt auch die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  (vgl. Abb. 2.5 (a), gestrichelte Linien). Abb. 2.5 (b) zeigt, dass ein linearer Zusammenhang



**Abbildung 2.5:** (a) Die Verteilungen der Abrisskräfte  $p(F)$  einer theoretischen Bindung sind für die an der Optischen Pinzette realisierbaren Belastungsraten 10 pN/s (schwarze Linie), 50 pN/s (grüne Linie) sowie 100 pN/s (blaue Linie) dargestellt. Der Berechnung liegen folgende Bindungsparameter zugrunde:  $k_{\text{off}}^0 = 0,1/\text{s}$  und  $x_{\text{ts}} = 0,5$  nm. Mit steigender Belastungsrate verschiebt sich die wahrscheinlichste Abrisskraft (gestrichelte Linien) hin zu größeren Abrisskräften. (b) Die lineare Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft  $F^*$  vom Logarithmus der Belastungsrate (Gl. 2.27) ist für dieselbe Bindung aus (a) dargestellt (rote Linie). Die wahrscheinlichsten Abrisskräfte  $F^*$  sind für Belastungsraten von 10 pN/s (schwarz), 50 pN/s (grün) und 100 pN/s (blau) aus (a) durch Vierecke hervorgehoben.

zwischen der häufigsten Abrisskraft  $F^*$  und dem natürlichen Logarithmus der Belastungsrate  $\dot{F}$  besteht [80, 84, 95]. Es soll jedoch erwähnt werden, dass die Anwendbarkeit von Gl. 2.27 begrenzt ist, da dieser Zusammenhang für hinreichend große und kleine Zugraten versagt. Für sehr kleine Raten muss die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Bindung (englisch: *rebinding*) beachtet werden<sup>10</sup> [96]. Für große Kraftraten treffen mikroskopisch hergeleitete Theorien bessere Vorhersagen als das phänomenologische Modell von Bell und Evans. Ein solcher Ansatz soll im Folgenden beschrieben werden.

#### 2.1.2.4 Das Dudko-Hummer-Szabo-Modell (DHS-Modell)

Das Dudko-Hummer-Szabo-Modell [85, 97] ist eine Weiterentwicklung des Bell-Evans-Modells, indem es die Energielandschaft einer idealen Bindung neben der Lebenszeit  $\tau_0$ , der Bindungslänge  $x_{\text{ts}}$  anhand eines weiteren Parameters charakterisiert.  $\Delta G$  stellt dabei die freie Aktivierungsenergie im kraftfreien Zustand dar. Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei  $\Delta G$  nicht um die freie Energie einer Bindung handelt, aus der die Affinitätskonstante  $K_a$  (vgl. Gl. 2.8) berechnet werden kann. Dieser Parameter beschreibt ausschließlich die Höhe der Energiebarriere, die das System überwinden muss, um im unbelasteten Fall aus dem gebundenen in den ungebundenen Zustand zu gelangen (vgl. Abb. 2.3). Weiterhin wird im DHS-Modell berücksichtigt, dass sich die Form sowie Position der Energiebarriere unter dem Einfluss eines äußeren Kraftfeldes verändern kann.

Die Herleitung für die off-Rate  $k_{\text{off}}$  erfolgt über Kramers Reaktionsratentheorie [86]. Das Integral aus Gl. 2.25 kann für zwei weitere Potentialformen analytisch gelöst werden:

<sup>10</sup>Ein Modell, welches das erneute Binden berücksichtigt, wird in Abschnitt 2.1.2.5 vorgestellt.

$$U_{\text{zacken}}(x) = \begin{cases} \Delta G \left( \frac{x}{x_{\text{ts}}} \right)^2, & x < x_{\text{ts}} \\ -\infty, & x \geq x_{\text{ts}} \end{cases} \quad (2.28)$$

$$U_{\text{kubisch}}(x) = \frac{3}{2} \Delta G \left( \frac{x}{x_{\text{ts}}} - 0,5 \right) - 2 \Delta G \left( \frac{x}{x_{\text{ts}}} - 0,5 \right)^3. \quad (2.29)$$

Dabei beschreibt Gl. 2.28 ein zackenförmiges und Gl. 2.29 eine linear-kubisches Potential<sup>11</sup> (vgl. Abb. 2.6 (a)). Im Rahmen dieses Formalismus lässt sich die off-Rate für den Fall einer konstanten Belastungsrate  $\dot{F}$  in einer geschlossenen Form berechnen [85, 97]:

$$k_{\text{off}}^{\text{DHS}}(F) = \frac{1}{\tau_{\text{DHS}}(F)} = k_{\text{off}}^0 \left( 1 - \frac{\nu F x_{\text{ts}}}{\Delta G} \right)^{1/\nu-1} \exp \left[ \frac{\Delta G}{k_{\text{B}}T} \left( 1 - \left( 1 - \frac{\nu F x_{\text{ts}}}{\Delta G} \right)^{1/\nu} \right) \right], \quad (2.30)$$

wobei  $\nu$  ein geometrischer Faktor ist, der die Form der Energielandschaft beschreibt.  $\nu = 1/2$  entspricht dem zackenförmigen (Gl. 2.28) und  $\nu = 2/3$  dem linear-kubischen Potential (Gl. 2.29). Für  $\nu = 1$  folgt der bellsche Ausdruck für die Dissoziationsrate (Gl. 2.21). Unter Verwendung von Gl. 2.25 kann mit Hilfe der kraftabhängigen off-Rate die Verteilung der Abrisskräfte  $p_{\text{DHS}}(F)$  bestimmt werden:

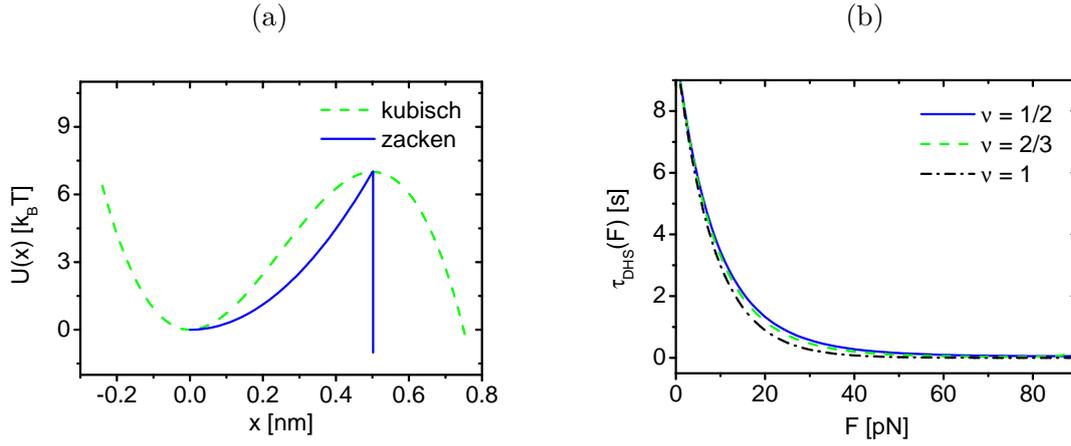
$$p_{\text{DHS}}(F) = \frac{1}{\dot{F} \tau_0} \left\{ \exp \left[ \frac{\Delta G}{k_{\text{B}}T} \left( 1 - \left( 1 - \frac{\nu F x_{\text{ts}}}{\Delta G} \right)^{\frac{1}{\nu}} \right) \right] - \left( \frac{-1 + \exp \left[ \frac{\Delta G}{k_{\text{B}}T} \left( 1 - \left( 1 - \frac{\nu F x_{\text{ts}}}{\Delta G} \right)^{\frac{1}{\nu}} \right) \right]}{x_{\text{ts}} \dot{F} \tau_0} \right) k_{\text{B}}T \right] \left( 1 - \frac{\nu F x_{\text{ts}}}{\Delta G} \right)^{-1+\frac{1}{\nu}} \right\}. \quad (2.31)$$

Auch die Theorie von Dudko, Hummer und Szabo unterliegt gewissen Limitationen, außerhalb derer sie ihre Gültigkeit verliert. Für Kräfte unterhalb einer kritischen Kraft ( $F < F_{\text{krit}}$ ) ist die off-Rate eine positive, monoton wachsende Funktion von  $F$ . Für den Fall  $F = F_{\text{krit}}$  gilt:

$$k_{\text{off}}^{\text{DHS}}(F_{\text{krit}}) = 0 \quad \Rightarrow \quad F_{\text{krit}} = \frac{\Delta G}{\nu x_{\text{ts}}}. \quad (2.32)$$

Die verschwindende off-Rate ist gleichbedeutend mit einer unendlich großen Lebensdauer  $\tau_{\text{DHS}}$ , was besonders für die Betrachtung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ein unphysikalisches Verhalten darstellt. Die Erklärung für diese Einschränkung liegt darin, dass die Energiebarriere bei  $F_{\text{krit}}$  verschwindet, was jedoch im Widerspruch zur Annahme der Kramers-Theorie steht. Darin wird ausdrücklich eine hohe Energiebarriere angenommen [86, 97]. Zur Lösung dieses Problems müsste eine genauere Beschreibung der off-Rate herangezogen werden [98], was jedoch zur Folge hat, dass das Integral in Gl. 2.25 nicht mehr analytisch lösbar ist [97]. Das Problem der unphysikalischen off-Rate besteht nicht für das Bell-Evans-Modell ( $\nu = 1$ ), da  $k_{\text{off}}(F)$  für alle Kräfte immer monoton steigend ist.

<sup>11</sup>Das linear-kubische Potential wurde um den Faktor  $0,5x_{\text{ts}}$  verschoben. Dieses Vorgehen hat jedoch keinen Einfluss auf die resultierende off-Rate, sondern dient ausschließlich der besseren Gegenüberstellung beider Potentialformen in Abb. 2.6 (a).



**Abbildung 2.6:** (a) Darstellung der Energielandschaften, die zur Herleitung der Dissoziationsrate im DHS-Modell verwendet wurden. Das zackenförmige Potential (blaue Linie) entspricht  $\nu = 1/2$  und das linear-kubische (grün gestrichelte Linie) entspricht  $\nu = 2/3$ . Der Berechnung der Kurven nach Gl. 2.28 und 2.29 liegen folgende typische Bindungsparameter zugrunde:  $\Delta G = 7 k_B T$ ;  $x_{ts} = 0,5 \text{ nm}$ ;  $k_{\text{off}}^0 = 0,1/\text{s}$ . Die Reaktionskoordinate  $x$  wurde so festgelegt, dass sich der Ursprung an der Position des Energieminimums befindet. (b) Für die Bindungsparameter aus (a) ist die Lebenszeit  $\tau_{\text{DHS}}(F)$  nach Gl. 2.30 für  $\nu = 1/2$  (blaue Linie),  $\nu = 2/3$  (grün gestrichelte Linie) und  $\nu = 1$  (schwarze Punkt-Strich-Linie) dargestellt.  $\nu = 1$  entspricht dem Bell-Evans-Modell. Für alle drei Energielandschaftsparameter  $\nu$  stimmen die berechneten Kurven weitestgehend überein.

Zur Bestimmung der drei charakteristischen Bindungsparameter wird von Dudko, Hummer und Szabo geraten, die Abrisskraftverteilungen  $p_{\text{DHS}}(F)$  für verschiedene Belastungsraten zu messen. Die dazu entsprechende kraftabhängige Lebenszeit  $\tau_{\text{DHS}}(F)$  muss für alle Belastungsraten auf einer Masterkurve kollabieren (vgl. Abb. 2.6 (b)). Ist dies nicht der Fall, sind die gemachten Annahmen zur Herleitung von Gl. 2.30 nicht haltbar und es liegt ein komplexerer physikalischer Mechanismus vor. Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Parameter unabhängig von der bei der Herleitung verwendeten Form der Energielandschaft sind, wird empfohlen, die Anpassung für  $\nu = [1/2, 2/3, 1]$  durchzuführen (vgl. Abb. 2.6 (b)). Es ist zu erwarten, dass die charakteristischen Bindungsgrößen für das zackenförmige ( $\nu = 1/2$ ) sowie das linear-kubische Potential ( $\nu = 2/3$ ) im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmen. Für das Bell-Evans-Modell ( $\nu = 1$ ) können Abweichung hin zu kleineren Werten auftreten [97]. In den in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschriebenen Experimenten werden Abrisskraftverteilungen gemessen und anschließend in diskrete Abrisskrafthistogramme umgewandelt. Die Auswertung dieser Daten mit dem DHS-Modell geschieht anhand folgender Anleitung: Für ein Histogramm mit  $N$  Klassen der Breite  $\Delta F$ , das bei  $F_0$  startet und bei  $F_N = F_0 + N\Delta F$  endet, kann die diskrete Funktion der kraftabhängigen Lebensdauer wie folgt berechnet werden:

$$\tau \left[ F_0 + \left( k - \frac{1}{2} \right) \Delta F \right] = \frac{\left( \frac{h_k}{2} + \sum_{i=k+1}^N h_i \right) \Delta F}{h_k \dot{F} \left[ F_0 + \left( k - \frac{1}{2} \right) \Delta F \right]}. \quad (2.33)$$

Dabei steht  $h_i = C_i / (N_{\text{tot}} \Delta F)$  für die Klassenhöhe,  $C_i$  für die Anzahl der Abrisse in einer Klasse und  $N_{\text{tot}}$  für die Gesamtanzahl aller Abrissereignisse.  $k = 1, 2, \dots$  ist der Laufindex [85]. Für Datensätze, die Ausreißer aufweisen oder zu sehr kleinen Abrisskräften verschoben

sind, kann Gl. 2.33 nicht verwendet werden. In einem solchen Fall wird  $\tau(\bar{F})$  über folgende Beziehung berechnet:

$$\tau(\bar{F}) = \frac{3}{4} \frac{\delta F}{\dot{F}(\bar{F})}, \quad (2.34)$$

wobei  $\delta F = F_3 - F_1$  der Interquartilsabstand ist. Das bedeutet, dass 25% aller Abrisskräfte größer als  $F_3$  und 25% kleiner als  $F_1$  sind [85]. Die Datenanpassung zur Bestimmung der Bindungsparameter erfolgt in beiden Fällen (Gl. 2.33 und Gl. 2.34) anhand von Gl. 2.30.

### 2.1.2.5 Das Friddle-De Yoreo-Modell

Zum Vergleich der mit dem DHS-Modell bestimmten Bindungsparameter soll eine weitere Theorie vorgestellt werden, mit der es möglich ist  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  aus den Abrisskraftverteilungen zu extrahieren. Die Interpretation von Friddle und De Yoreo geht davon aus, dass der Rezeptor-Ligand-Komplex bei einer kraftinduzierten Dissoziation zwei Phasen durchläuft [96]. Dies ist zunächst eine Gleichgewichtsphase, in der die Moleküle für kleine Ziehgeschwindigkeiten  $v$  erneut binden können. Daran schließt sich die kinetische Phase für große Belastungsraten an, in welcher der Komplex endgültig dissoziiert. Der Übergang zwischen beiden Zuständen wird durch die Gleichgewichtskraft  $F_{eq.}$  charakterisiert. Die theoretische Herleitung des Modells folgt zunächst dem der Bell-Evans-Theorie (vgl. Abschnitt 2.1.2.3), zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Abrisskraft wird allerdings davon abgewichen. Die Wahrscheinlichkeit  $p_{on}(t)$ , dass sich die Bindung zum Zeitpunkt  $t$  noch intakt befindet, kann über einen Zwei-Zustand-Markov-Prozess beschrieben werden (vgl. Gl. 2.22). Für die Ratengleichungen zur Beschreibung der on- und off-Rate werden folgende Ausdrücke verwendet<sup>12</sup>:

$$k_{on}(F) = k_{off}(t) \exp \left[ \beta \left( \Delta G - \frac{F^2}{2k_{Feder}} \right) \right] \quad (2.35)$$

$$k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp \left[ \beta \left( F x_{ts} - \frac{k_{Feder}}{2} x_{ts}^2 \right) \right]. \quad (2.36)$$

Hierbei ist  $\beta = (k_B T)^{-1}$  die inverse thermische Energie. Die Gleichgewichtskraft  $F_{eq.}$  ergibt sich, wenn die Ratengleichungen 2.35 und 2.36 sich schneiden:

$$F_{eq.} = \sqrt{2k_{Feder}\Delta G}, \quad (2.37)$$

wobei im Folgenden  $k_{Feder}$  gleich der Fallensteifigkeit der optischen Falle  $k_{Falle}$  (vgl. Abschnitt 3.1.3.2) gesetzt wird. Mit Hilfe dieser Beziehung kann die Wahrscheinlichkeit  $p'_{on}(t)$  für den Dissoziationsprozess wie folgt dargestellt werden [96]:

<sup>12</sup>Es soll hervorgehoben werden, dass Gl. 2.36 Gl. 2.21 entspricht, mit dem Unterschied das im Modell von Friddle und De Yoreo der dritte Term aus Gl. 2.20 nicht verworfen wird.

$$\int_1^{p_{\text{on}}} \frac{dp'_{\text{on}}}{p'_{\text{on}}} = \frac{1}{\dot{F}} \int_{F_{\text{eq.}}}^F k_{\text{off}}(F') dF'. \quad (2.38)$$

Dabei wurde eine kraftunabhängige Belastungsrate  $\dot{F}$  angenommen. Durch Einsetzen von Gl. 2.36 in Gl. 2.38 ergibt sich die Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft  $F^*$  von der Belastungsrate  $\dot{F}$  zu:

$$F^*(\dot{F}) = F_{\text{eq.}} + F_{\beta} \ln \left( 1 + \frac{\dot{F} e^{-\gamma}}{k_{\text{off}}(F_{\text{eq.}}) F_{\beta}} \right). \quad (2.39)$$

$\gamma = 0,577$  ist die Eulerkonstante und  $F_{\beta} = k_{\text{B}} T x_{\text{ts}}^{-1}$  die Skala der thermischen Kraft.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der in diesem Kapitel vorgestellten Eigenschaften (Spezifität, Affinitätskonstante und Bindungsparameter) von nicht-kovalenten spezifischen Bindungen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen sehr genau klassifiziert sowie untereinander verglichen werden können.

### 2.1.3 Dynamische Kraftspektroskopie

Unter dynamischer Kraftspektroskopie (englisch: *dynamic force spectroscopy*, *DFS*) wird die Untersuchung von Dissoziationsprozessen einzelner spezifischer Bindungen unter Einwirkung einer äußeren Kraft verstanden [26, 72, 80, 99, 100]. Diese Methodik erlaubt es, intra- und intermolekulare Kräfte ohne Markierung (z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen) und mit hoher Sensitivität zu analysieren [100]. Die Messungen können unter physiologischen Bedingungen<sup>13</sup> durchgeführt werden, weswegen sie sich besonders zur Aufklärung biologischer und biophysikalischer Fragestellungen eignen.

Allerdings muss bei der Interpretation der aus dem Experiment gewonnenen Informationen beachtet werden, dass diese von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst werden [77, 101]. Bei der theoretischen Analyse der Messdaten muss beispielsweise zwischen zwei verschiedenen experimentellen Herangehensweisen differenziert werden: Zum einen wird der Bindungsbruch durch das Anlegen einer konstanten Kraft hervorgerufen. Das Resultat aus diesen Messungen ist die Verteilung der Lebensdauer der Bindung, aus der mit Hilfe von Gl. 2.21 Rückschlüsse auf die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften geschlossen werden können. Dieser Modus wird hauptsächlich in hydrodynamischen Scherkraft-Experimenten eingesetzt [72]. Zum anderen wird der Großteil der kraftspektroskopischen Experimente jedoch durchgeführt, indem die angelegte Kraft mit der Zeit vergrößert wird. Wie in Abschnitt 2.1.2.3 (vgl. Gl. 2.27) gezeigt wurde, spielt die sogenannte Belastungsrate eine fundamentale Rolle in solchen Messungen, da die gemessenen Abrisskraftverteilungen von ihr abhängen. Aus diesem Grund

<sup>13</sup>Unter physiologischen Bedingungen wird eine wässrige Lösung mit neutralem pH-Wert ( $\sim 7,4$ ), einer Ionenstärke von  $\sim 300$  mM und einer Temperatur im Bereich  $T \in [273, 313]$  K verstanden [72].

müssen solche Experimente bei mehreren Ziehgeschwindigkeiten<sup>14</sup> durchgeführt werden. Nur dann sind die mittels Gl. 2.27, 2.30 und 2.39 extrahierten Bindungsparameter vertrauenswürdig.

Kraftspektroskopische Messungen werden in der Regel mit oberflächenimmobilisierten Molekülen<sup>15</sup> durchgeführt. Eine Voraussetzung, dass die untersuchten Abrissereignisse nur aus den spezifischen Interaktionen der Biomoleküle resultieren, ist, dass diese möglichst fest auf der Substratoberfläche verankert sind. Dabei kann zwischen Adsorption und spezifischer sowie kovalenter Immobilisierung an Oberflächengruppen unterschieden werden. Nach einem Review von R. Merkel [72], wird jedoch zum letzteren Verfahren geraten, da die kovalente Koppelung über beispielsweise Amino- ( $-\text{NH}_2$ ), Thiol- ( $-\text{SH}$ ) oder Carboxylgruppen ( $-\text{COOH}$ ) die sicherste Wahl für die Kraftspektroskopie darstellt. Unabhängig von der Art des Immobilisierungsverfahrens muss bei allen Methoden garantiert werden, dass die native Struktur und Funktion der Biomoleküle konserviert wird sowie alle aktiven Seiten (z.B. die Bindungstasche eines Antikörpers oder das Epitop auf einem Peptid) für den jeweiligen Wechselwirkungspartner zugänglich bleiben.

In diesem Zusammenhang spielen auch die Eigenschaften der Verbindungsmoleküle (englisch: *Linker*), mit denen die Biomoleküle auf dem Substrat verankert werden, eine wichtige Rolle. Dies ist zum Beispiel der Fall in der Herleitung der Gleichung für die kraftabhängige off-Rate (vgl. Gl. 2.30). Für ein flexibles Polymer der Länge  $L$  und Persistenzlänge<sup>16</sup>  $l_P$  wird die Belastungsrate  $\dot{F}$  zu einer Funktion der anliegenden Kraft und kann mit Hilfe der wurmartigen Kette (englisch: *worm-like chain* [102]) beschrieben werden [85]. Weiterhin hat die Steifigkeit der Verbindungsmoleküle einen direkten Einfluss auf die bestimmte Dissoziationskonstante oberflächenimmobilisierter Moleküle  $k_{\text{off}}^0$ . Diese kann jedoch anhand der Dissoziationskonstante  $k_{\text{off}}^{\text{frei}}$  zweier Moleküle, die sich frei in Lösung bewegen, ausgedrückt werden [103]:

$$k_{\text{off}}^0 = k_{\text{off}}^{\text{frei}} \sqrt{\frac{k_{\text{R}} + k_{\text{L}}}{k_{\text{L}}}}, \quad (2.40)$$

wobei  $k_{\text{R}}$  und  $k_{\text{L}}$  die Steifigkeiten der Verbindungsmoleküle darstellen, mit denen der Rezeptor bzw. der Ligand auf dem Substrat verankert ist.

Ein weiterer Vorteil der Kraftspektroskopie ist, aus einem Nicht-Gleichgewichtsexperiment detaillierte Informationen über thermodynamische Gleichgewichtsparameter gewinnen zu können [26]. Ein Beispiel dafür ist die Affinitätskonstante  $K_{\text{a}}$ , die über das Verhältnis aus on- und off-Rate definiert wurde (vgl. Gl. 2.10). Dennoch ist eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen klassischer Untersuchungsmethoden, bei denen die Moleküle frei beweglich in Lösung vorliegen, aufgrund der verschiedenen Dissoziationskonstanten (vgl. Gl. 2.40) nur bedingt gegeben [65, 104]. Dabei muss besonders beachtet werden, dass es sich bei kraftspektroskopischen Messungen um induzierte Bindungsbrüche handelt, die über einen „unnatürlichen“ Übergangszustand führen [51]. Dennoch kann die Affinität aus den in Abschnitt 4.1 vorgestellten

<sup>14</sup>Die Ziehgeschwindigkeit ist für sehr weiche Federn direkt proportional zur Belastungsrate. Für einen nicht elastischen Linker gilt:  $\dot{F} = k_{\text{Feder}} v_{\text{zieh}}$  [91].

<sup>15</sup>Im Fall von Experimenten mit Optischen Pinzetten werden die Moleküle auf Mikrometer-großen, dielektrischen Partikeln fixiert (vgl. Abschnit 3.2.2).

<sup>16</sup>Die Persistenzlänge ist ein Maß für die Biegesteifigkeit eines semiflexiblen Polymers [68].

Messungen verwendet werden, um einzelne Rezeptor-Ligand-Bindungen untereinander oder mit Trends aus anderen Untersuchungen zu vergleichen.

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2.1 erwähnt, besitzen Rezeptor-Ligand-Komplexe Bindungsenergien von wenigen  $k_B T$  sowie Bindungslängen im Nanometer-Bereich. Daraus ergeben sich Bindungskräfte von 1–100 Piconewton ( $1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ N}$ ). Moderne Einzelmolekül-Techniken erlauben es, solche Kräfte auszuüben und zu messen. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden gehören unter anderem Optische Pinzetten [27, 59], Rasterkraftmikroskope [25] und Magnetische Pinzetten [26]. Für eine detaillierte Beschreibung der Vor- und Nachteile dieser Techniken soll auf die Literatur verwiesen werden [26].

Die ersten Experimente mit dynamischer Kraftspektroskopie wurden vor nunmehr 20 Jahren durchgeführt. Sie stammen von Florin *et al.* [46], Lee *et al.* [47] und Moy *et al.* [48], die im selben Jahr Daten zur Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin veröffentlichten. Diese Wechselwirkung ist mit einer Affinitätskonstante von  $K_a = 10^{15}/\text{M}$  die stärkste bekannte spezifische Bindung. In den darauffolgenden Jahren wurden mit Hilfe der Kraftspektroskopie zum Beispiel die elastischen Eigenschaften von doppelsträngiger DNS [30, 105, 106] sowie ihre Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren [107], Architekturproteinen [108–112] und interkalierenden Farbstoffen [33] untersucht. Weiterhin wurde auch eine Vielzahl von Rezeptor-Ligand-Paaren analysiert. Eine ausführliche Übersicht über diese Messungen ist in Bizzarri *et al.* [113] aufgelistet.

## 2.2 Biologische Grundlagen

### 2.2.1 Die Alzheimer-Krankheit und ihre Verbindung mit dem Tau-Protein

Die Alzheimer-Krankheit wurde das erste Mal im Jahr 1906 von dem deutschen Psychiater Alois Alzheimer beschrieben [114]. Dieser fand heraus, dass altersbedingte Lern- und Erinnerungsdefizite nicht zwingend auf Senilität zurückgeführt werden können, sondern einen krankhaften Prozess darstellen. In der pathologischen Untersuchung der Gehirne von betroffenen Patienten konnte A. Alzheimer zwei typische Veränderungen beobachten: Zum einen waren das zerebrale Plaques, die aus Amyloid-Beta- ( $A\beta$ )-Peptiden bestehen, zum anderen neurofibrilläre Knäuel, deren Hauptbestandteile Filamente des hyperphosphorylierten Tau-Proteins sind. Trotz der intensiven Forschung in den letzten Jahrzehnten sind die Auslöser für diese neurodegenerative Krankheit nicht geklärt. Weiterhin herrscht auch keine einhellige Meinung darüber, welcher der beiden pathologischen Merkmale den ursprünglichen Anlass zur Ausprägung der Alzheimer-Krankheit darstellt oder ob die  $A\beta$ -Plaques und die Tau-Knäuel nur krankheitsspezifische Marker sind [9]. Es existieren jedoch zwei Theorien, die versuchen, die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit zu erklären, welche im Folgenden beschrieben werden sollen.

### 2.2.1.1 Die Amyloid-Beta-Hypothese

Die Amyloid-Beta-Hypothese [9] geht davon aus, dass  $\beta$ -Amyloid die Ursache für die Alzheimer-Krankheit darstellt und beschreibt die Entstehung des neurotoxischen  $A\beta$ -Peptides aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (englisch: *amyloid-precursor-protein*, *APP*). Der Hauptbestandteil der senilen Plaques ist ein 42 Aminosäuren langes Fragment ( $A\beta_{42}$ ), das durch fehlerhafte Prozessierung des APP durch Sekretasen<sup>17</sup> ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) entsteht. Es können jedoch auch kürzere Fragmente, wie das  $A\beta_{40}$ , entstehen. Diese Peptide besitzen ein hohes Potential zur Selbstaggregation und sind vermutlich in ihrer monomeren oder oligomeren Form toxisch für neuronales Gewebe. Die Ursachen, die zur Fehlfunktion der Sekretasen führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise auf genetische Faktoren [9]. So wurden 1991 Mutationen auf dem Gen entdeckt, welches das APP codiert [116–118]. Dies führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz in der  $A\beta$ -Region im APP. Daraus resultiert die sogenannte familiäre Demenz, die bereits ab dem sechsten Lebensjahrzehnt erste Symptome hervorrufen kann [9]. Weiterhin wird die Alzheimer-Krankheit auch mit einer Überproduktion von APP in Verbindung gebracht. So erkrankten Menschen mit dem Down-Syndrom oft schon im vierten Lebensjahrzehnt an Demenz, weil das APP-codierende Gen auf Chromosom 21 liegt. Neben direkter Mutation im Amyloid-Vorläuferprotein können auch Veränderungen in der  $\gamma$ -Sekretase die Entstehung der  $A\beta$ -Peptide begünstigen. Weitere, nicht genetische Faktoren, wie beispielsweise ein erhöhter Cholesterinspiegel, können sich ebenfalls begünstigend auf das Vorhandensein von senilen Plaques auswirken [119–121].

### 2.2.1.2 Neurofibrilläre Knäuel

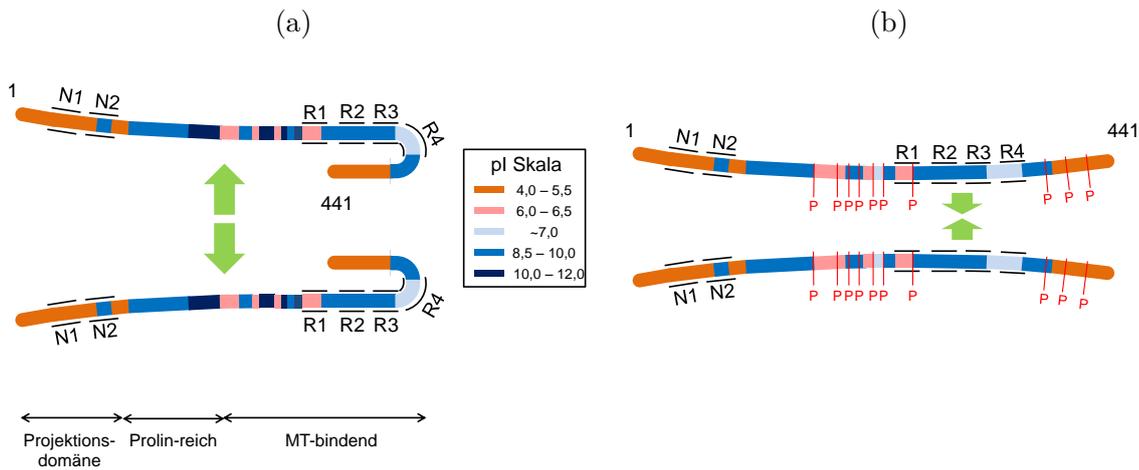
Eine andere Hypothese, die Entstehung der Alzheimer-Krankheit zu beschreiben, basiert auf der Formierung neurofibrillärer Knäuel. Diese bestehen aus Agglomeraten von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen. Das Tau-Protein gehört zur Klasse der Mikrotubuli-(MT)-bindenden Moleküle und besitzt eine Vielzahl von Aufgaben im menschlichen Körper. Dazu gehören unter anderem der axonale Transport sowie Wechselwirkungen mit der Plasmamembran und dem Aktin-Zytoskelett [7]. Im nicht pathogenen Fall liegt die Hauptaufgabe des Tau-Proteins jedoch im Aufbau und in der Stabilisierung der Mikrotubuli<sup>18</sup> in Neuronen [5]. Hierbei wirkt Tau als das Verbindungsstück zwischen den einzelnen Tubulin-Untereinheiten.

Im Gehirn eines erwachsenen Menschen finden sich insgesamt sechs Isoformen des Tau-Proteins, die durch alternatives Spleißen<sup>19</sup> eines auf Chromosom 17 liegenden Gens entstehen. Die längste humane Isoform besteht aus 441 Aminosäuren, welche an insgesamt 79

<sup>17</sup>Sekretasen gehören zur Familie der Proteasen und sind Enzyme, die Proteinbindungen aufspalten. Sie werden nach dem Ort bezeichnet, an dem sie am Protein ansetzen und dieses schneiden [115].

<sup>18</sup>Mikrotubuli sind röhrenartige Filamente die aus einzelnen Tubulin-Molekülen bestehen, einen Durchmesser von ca. 250 Å besitzen und ein Hauptbestandteil des Zytoskelets sind. In Neuronen wird die Stabilität durch das Tau-Protein gewährleistet [115].

<sup>19</sup>Unter Spleißen wird ein Prozess zwischen der Transkription und der Translation eines Proteins verstanden. Dieser Vorgang ermöglicht, dass verschiedene Endprodukte aus demselben prä-mRNS-Molekül produziert werden können [7].



**Abbildung 2.7:** (a) Darstellung der längsten humanen Isoform des Tau-Proteins, das insgesamt aus 441 Aminosäuren besteht. Grundsätzlich kann das Tau-Protein in eine saure Projektionsdomäne, in eine positiv geladene Prolin-reiche sowie in eine Mikrotubuli-(MT)-bindende Region (R1–R4) unterteilt werden. Die jeweiligen Isoformen werden durch die Anzahl der vorhandenen Tubulin-Bindungsmotive sowie dem Vorhandensein der beiden Einschübe N1 und N2 in der Projektionsdomäne unterschieden. Im Fall eines normalen Tau-Proteins wirken die beiden negativ geladenen Enden am C- und N-Terminus sowie die gesamte Proteinladung hemmend für aggregationsfördernde Tau-Tau-Wechselwirkungen. Die Farbskala steht für die entsprechenden isoelektrischen Punkte (pI) der jeweiligen Fragmente. (b) Durch die krankhafte Hyperphosphorylierung in der Prolin-reichen sowie in der Tubulin-bindenden Region wird das Tau-Protein größtenteils elektrisch neutralisiert und es kommt zu konformellen Änderungen am C-Terminus. Dadurch wird deren inhibierende Wirkung aufgehoben und die Tau-Proteine beginnen, über die Mikrotubuli-bindenden Regionen miteinander zu aggregieren. Die durch die Hyperphosphorylierung auftretenden Fehlfunktionen des Tau-Proteins resultieren in den sogenannten Tauopathien (z.B. die Alzheimer-Krankheit). (Abbildung nach K. Iqbal [4]. Die Abbildung sowie die Abbildungsunterschrift wurden modifiziert.)

Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert werden kann [6]. Im gesunden Zustand trägt das Tau-Protein jedoch nur zwei bis drei Phosphatgruppen, über die die Affinität zu den Mikrotubuli gesteuert wird. Die einzelnen Isoformen weisen keine geordnete Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt) auf, weswegen kein hochaufgelöstes Strukturmodell vorliegt. Trotzdem kann das Tau-Protein in mehrere Unterdomänen unterteilt werden (vgl. Abb. 2.7 (a)). Am N-Terminus befindet sich die sogenannte Projektionsdomäne, die einen sauren pH-Wert aufweist. Daran schließt sich eine positiv geladene Prolin-reiche Region an, gefolgt von dem MT-bindenden Bereich, der aus der Wiederholung von bis zu vier Tubulin-Bindungsmotiven (R1 – R4) besteht. Die basischen Regionen (vgl. Abb. 2.7 (a), dunkelblaue Segmente) sowie die Bereiche um den C- und N-Terminus hemmen die Selbstaggregation, wodurch Tau-Tau-Wechselwirkungen unterbunden werden. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der Tubulin-erkennenden Regionen (entweder drei oder vier) sowie durch die An- oder Abwesenheit von ein oder zwei Einschüben der Länge von 29 Aminosäuren (N1, N2) in der Projektionsdomäne. So wird beispielsweise die Isoform, die vier Tubulin-Bindungsregionen und beide Einschübe N1 und N2 besitzt, als  $\tau$ 4R2N bezeichnet. Grundsätzlich erfüllen jedoch alle Isomere des Tau-Proteins die gleichen Aufgaben im menschlichen Körper. Die Funktionsfähigkeit des Tau-Proteins wird durch reversible, posttranslationale Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Kinasen bzw. Phosphatasen reguliert. Ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört und zu Gunsten der Kinasen verlagert, kommt es zu einer Hyperphosphory-

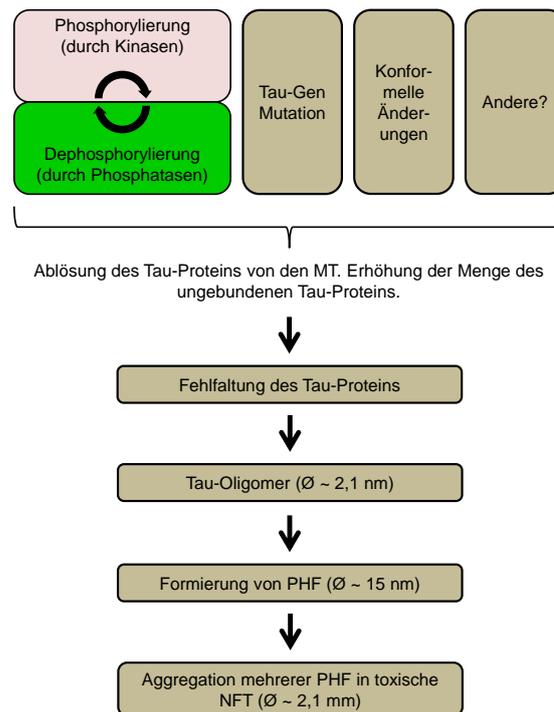
lierung in der Prolin-reichen sowie Mikrotubuli-bindenden Region an mehreren Serin- und Threonin-Resten. Die damit verbundene Aggregation und Ablagerung des Tau-Proteins manifestiert sich in den sogenannten Tauopathien, zu denen auch die Alzheimer-Krankheit gehört [4–7, 9, 122]. Durch die zusätzlichen Phosphatgruppen in der Prolin-reichen sowie in der Tubulin-bindenden Region werden die basischen Bereiche im Protein neutralisiert und es kommt zu konformellen Änderungen am C-Terminus (vgl. Abb. 2.7 (b)). Diese Modifikationen haben zur Folge, dass die Affinität zu den Tubulin-Molekülen deutlich reduziert wird und die selbstaggregationsinhibierende Eigenschaft des Tau-Proteins verloren geht. Deshalb kommt es über die Mikrotubuli-bindenden Regionen R2 und R3 zu Tau-Tau-Wechselwirkungen, wodurch die Proteine zunächst zu zirka 2,1 nm großen Tau-Oligomeren kondensieren [4–6]. Neben dem Ungleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen existieren jedoch auch andere Faktoren, die die Bildung von Tau-Agglomeraten begünstigen. Diese können unter anderem Mutationen im Tau-Gen, das Vorhandensein von A $\beta$ -Plaques [8] oder auch oxidativer Stress<sup>20</sup> sein [7]. Der Ablauf der Tau-Kaskade ist in Abb. 2.8 dargestellt. Nach dem Ablösen der Tau-Proteine von den Tubulin-Molekülen und der Ausbildung der Tau-Oligomere kondensieren diese weiter zu gepaarten helikalen Filamenten (englisch: *paired helical filaments*, *PHF*) oder in gerade Filamente (englisch: *straight filaments*, *SF*), die einen Durchmesser von  $\approx 15$  nm besitzen und deren Name sich aus ihrer zweifach verdrillten Bänderstruktur ableitet [8]. Sie sind inert und binden weder an Tubulin-Moleküle noch unterstützen sie den Aufbau der Mikrotubuli. Anschließend kommt es zur Selbstorganisation der PHF in neurofibrilläre Knäuel (englisch: *neurofibrillary tangles*, *NFT*), die bis zu 2,1  $\mu$ m groß werden können. Die toxischen Eigenschaften der NFT resultieren wahrscheinlich aus ihrer relativen Größe, wodurch es zu einer physikalischen Störung der Zellfunktionen sowie des axonalen Transportes kommt. In diesem Kontext soll allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und der Formierung von PHF/NFT noch nicht eindeutig geklärt ist. So wurde in Barrantes *et al.* gezeigt, dass sich Tau-Agglomerate auch in Abwesenheit von Aggregationsauslösern auf einer sehr langen Zeitskala bilden [123].

Interessanterweise polymerisieren jedoch nicht alle hyperphosphorylierten Tau-Proteine in PHF und anschließend in NFT. Ungefähr 40 % verbleiben gelöst im Zytosol<sup>21</sup> [4]. Dieses zytosolische Tau weist neben der unterdrückten Affinität zu den Tubulin-Molekülen noch eine weitere negative Eigenschaft auf. Es sequestriert unter anderem andere Mikrotubuli-bindende Moleküle, wie z.B. das gesunde Tau-Protein oder MAP1A/B, wodurch weitere Mikrotubuli zerstört werden. Weiterhin fördert die zunehmende Menge an freiem zytosolischem Tau die Bildung von PHF. Dieses Merkmal stellt die zweite toxische Eigenschaft des hyperphosphorylierten Tau-Proteins dar.

Obwohl die Auslöser für die Entwicklung der Tau-Ablagerungen noch immer nicht vollständig bekannt sind, können die einzelnen Stadien der Alzheimer-Krankheit sehr genau beschrieben und teilweise vorhergesagt werden. Braak *et al.* fanden 1991 heraus, dass die Tau-

<sup>20</sup>Unter oxidativem Stress wird die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen reduzierenden und oxidierenden Molekülen zugunsten der oxidativen Stoffe verstanden. Eine Folge sind massive Zellschäden [7].

<sup>21</sup>Das Zytosol ist der flüssige Bestandteil des Zytoplasmas von eukaryotischen (mit Zellkern) und prokaryotischen (ohne Zellkern) Zellen [115].



**Abbildung 2.8:** Das Schema zeigt den vermutlichen Ablauf der Tau-Kaskade zur Bildung von neurofibrillären Knäuel anhand mehrerer Stufen. Die Auslösemechanismen, die zur Reduktion der Affinität des Tau-Proteins gegenüber den Tubulin-Molekülen führen, sind bis heute noch nicht vollständig bekannt. Als wahrscheinlich gilt, dass ein Ungleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung vorliegt, was zur Hyperphosphorylierung der Tau-Proteine führt. Dies hat zur Folge, dass konformelle Änderungen im Protein auftreten, welche anschließend zu kleinen Tau-Oligomeren (auch Pretangles genannt) aggregieren. Ist der Aggregationsprozess einmal in Gang gekommen, bilden sich im weiteren Verlauf gepaarte helikale Filamente (englisch: *paired helical filaments*, PHF). Abschließend formieren sich aus diesen Strukturen die neurotoxischen neurofibrillären Knäuel (englisch: *neurofibrillary tangles*, NFT). (Abbildung nach C. Ballatore [7]. Die Abbildungsunterschrift wurde geändert.)

Aggregationspathologie, die von einer vorklinischen Phase, in der sich die Tau-Oligomere bilden, bis hin zum Endstadium, in dem Neuronen durch NFT absterben und zum kognitiven Verfall führen, einer klar definierten Sequenz folgt. Diese kann in sechs festgelegte Braak-Stadien unterteilt werden. Damit war gezeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der gebildeten neurofibrillären Knäuel und dem Fortschritt der Alzheimer-Krankheit besteht [10]. Eine solche Kausalität existiert nicht für die  $A\beta$ -Hypothese, da mit steigendem Alter auch bei Menschen, die nicht an der Alzheimer-Krankheit leiden, vergleichbare Mengen an  $A\beta$ -Plaques im Gehirn gefunden wurden [5].

Die Diagnose der Alzheimer-Krankheit wird heutzutage auf neuropsychologische Tests, klinische Beurteilungen und Bildgebung des Gehirns begründet [65]. Krankheitstypische Symptome, die solche Untersuchungen veranlassen, treten jedoch erst auf, wenn der neurodegenerative Prozess schon weit fortgeschritten ist und bereits irreversible Schäden angerichtet hat. Die mittlere Lebensdauer nach Ausbruch der Krankheit beträgt somit nur zirka sieben Jahre [124]. Erste Abnormitäten treten jedoch schon 25 – 30 Jahre vor dem Krankheits-

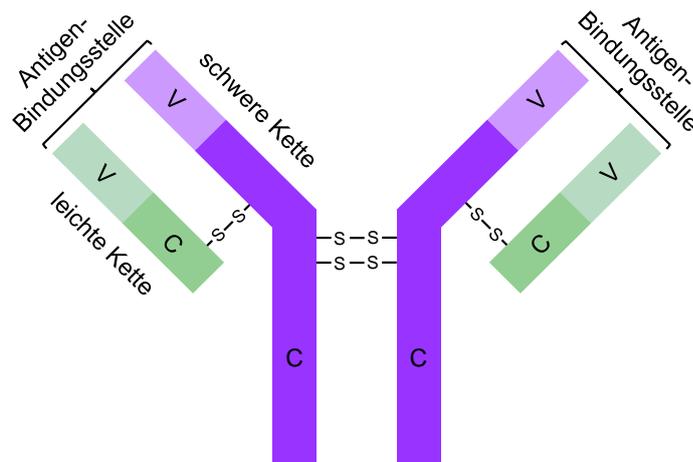
ausbruch auf. So finden sich beispielsweise krankheitsspezifische Biomarker, wie hyperphosphorylierte Tau-Proteine, bis zu zehn Jahre vor dem Krankheitsausbruch in der Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit (Liquor, englisch: *cerebrospinal fluid*, *CSF*) [11]. Somit könnte eine Diagnose bereits im vorklinischen Stadium gestellt werden, wodurch mit Hilfe gezielter Therapien der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst und verlangsamt werden kann [11]. Eine mögliche Früherkennung, beispielsweise über Alzheimer-spezifische Phosphorylierungsstellen (wie an Threonin231 und Serin235 [4]) im Tau-Protein, stellt die Verwendung von phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörpern dar. Dazu wird jedoch eine hohe Antikörper-Spezifität benötigt, worauf in den folgenden Abschnitten weiter eingegangen wird.

### 2.2.1.3 Monoklonale Antikörper

Antikörper (Ak) sind eine multigene Proteinfamilie, die auch Immunoglobuline (Ig) genannt wird. Sie entstehen im Zuge der Immunantwort von Menschen und Tieren auf beispielsweise Krankheitserreger und Giftstoffe, welche auch als Antigene (englisch: *Antibody Generator*) bezeichnet werden. Im menschlichen Körper werden Antikörper in den B-Lymphozyten (kurz: B-Zellen) hergestellt und sind Teil des adaptiven Immunsystems<sup>22</sup>. Aus struktureller Sicht bestehen Antikörper aus vier Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken zu einem Y-förmigen Molekül verbunden sind (vgl. Abb. 2.9). Am oberen Ende der leichten und schweren Ketten befindet sich die sogenannte variable Region (V). Sie ist von Antikörper zu Antikörper unterschiedlich und dient der spezifischen Erkennung des Antigen-Epitops (vgl. Abschnitt 2.1.2.1). Dieser Bereich wird auch als Bindungstasche bezeichnet. An diese flexiblen Abschnitte schließen sich konstante Regionen (C) an. Sie sind für alle Antikörper einer Klasse identisch und dienen unter anderem der Inaktivierung und Zerstörung eines antigenen Fremdkörpers. Anhand der schweren Ketten im unteren Bereich des Antikörpers können fünf verschiedene Ak-Klassen definiert werden: IgM, IgG, IgA, IgD und IgE [74, 125]. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur sowie Funktion. Der IgG-Antikörper ist der häufigste Antikörpertyp und wirkt gegen in Lymphe und Blut zirkulierende Bakterien, Viren und Toxine [125]. Für eine detaillierte Übersicht der Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Antikörperklassen soll auf die Literatur verwiesen werden [74]. Es muss allerdings erwähnt werden, dass auch die leichten Ketten eine konstante Region aufweisen, welche jedoch nicht zur Klassifizierung beiträgt.

Neben der Unterscheidung nach ihrer Struktur können Immunoglobuline auch in polyklonale und monoklonale Antikörper (mAk) eingeteilt werden. Alle in Menschen und Tieren vorkommenden Antikörper sind polyklonal. Das heißt, sie sind das Produkt aus vielen verschiedenen B-Zellenklonen, die zwar spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind, jedoch nicht zwangsläufig an das gleiche Epitop binden [125]. Dagegen richten sich Antikörper aus einer einzelnen B-Zelle, d.h. monoklonalen Ursprungs, nur gegen ein Antigen und sind vollkommen identisch. 1975 entdeckten Köhler und Milstein ein Verfahren, mit dem es möglich wurde, große Men-

<sup>22</sup>Unter dem adaptiven Immunsystem wird das Zusammenspiel aus zellvermittelter (zytotoxische T-Zellen) und humoraler (B-Zellen) Immunantwort verstanden [74].



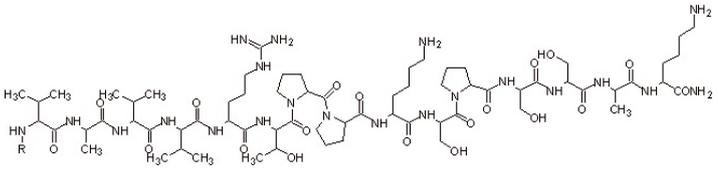
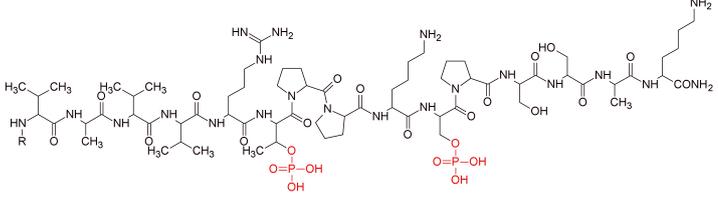
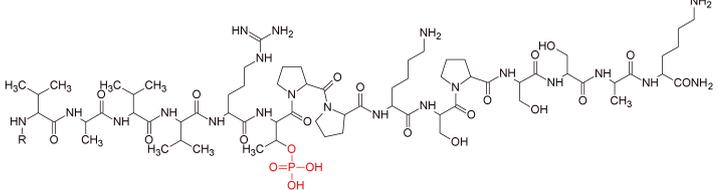
**Abbildung 2.9:** Die Darstellung zeigt die typische Y-Form eines IgG-Antikörpers, der aus jeweils zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. An den oberen Enden der jeweiligen Ketten befindet sich eine variable Region (V), über die die spezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkung vermittelt wird. Sie ist für jeden Antikörper verschieden. Die konstante Region (C) am Fuß des Antikörpers ist für eine Antikörperklasse identisch und dient als Klassifizierungsmerkmal. (Abbildung nach N. Campbell [125]. Die Abbildungsunterschrift wurde geändert.)

gen dieser monoklonalen Antikörper herzustellen [12]. Seither finden sie breite Anwendung in der Medizin, unter anderem in der Krebstherapie [14–16, 18] sowie in der Behandlung chronischer Krankheiten [19]. Neben der medizinischen Applikation monoklonaler Antikörper werden diese auch in der Immunhistochemie [126, 127] sowie in der Durchflusszytometrie [128] für diagnostische Zwecke eingesetzt. Besonders für die Früherkennung neurodegenerativer Krankheiten, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, in denen die ersten Symptome mehrdeutig sind und mit denen anderer Erkrankungen verwechselt werden können, ist die Spezifität monoklonaler Antikörper von großem Wert [20].

#### 2.2.1.4 Tau-Peptide und ihre phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben wurde, spielt das anormal phosphorylierte Tau-Protein eine bedeutende Rolle in der Ausprägung der Alzheimer-Krankheit. Im pathogenen Fall kann das Tau-Protein an bis zu 30 Aminosäuren gleichzeitig phosphoryliert sein [4]. Diese Stellen befinden sich hauptsächlich in der Prolin-reichen sowie der Mikrotubuli-bindenden Region (vgl. Abb. 2.7 (b)). Doch trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen, Alzheimer-typische Phosphorylierungsstellen im Tau-Protein eindeutig zu identifizieren. Es ist jedoch bekannt, dass Phosphorylierungen an Serin262, Threonin231 und Serin235 die Bindung an die Mikrotubuli um  $\sim 35\%$ ,  $\sim 25\%$  bzw. um  $\sim 10\%$  inhibieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Phosphatgruppen unter anderem an Threonin231 und Serin235 das gesunde Tau-Protein in das neurotoxische Tau umwandeln können. Die Phosphorylierungen an Threonin231 und Serin396/422 fördern zudem auch die Selbstorganisation der Tau-Proteine zu Filamenten [4, 122]. Aus diesen Gründen stehen die Phosphorylierungen

**Tabelle 2.1:** Überblick über die Sequenz, die Phosphorylierungsstelle, den isoelektrischen Punkt pI, die monoisotopische Masse  $M_r$  und die Strukturformel der in dieser Arbeit verwendeten Tau-Peptide. Bei pThr231 und pSer235 handelt es sich um phosphorylierte Aminosäuren. (Tabelle nach C. Wagner [65].)

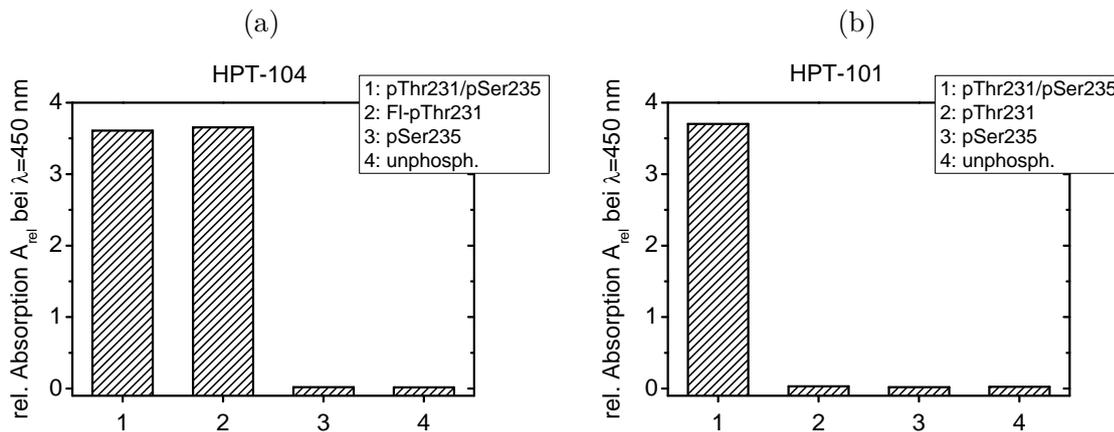
<b>Tau226-240: Val-Ala-Val-Val-Arg-pThr-Pro-Pro-Lys-pSer-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys</b>			
Phosphorylierungsstelle	pI	$M_r$ / Da	Strukturformel
unphosph.	11,17	1552,8	
pThr231/pSer235 <sup>a</sup>	6,98	1785,9	
pThr231 <sup>b</sup>	8,67	2331,2	

<sup>a</sup>Dieses Peptid wurde N-terminal um ein Cystein (Cys) verlängert.

<sup>b</sup>Dieses Peptid wurde N-terminal um folgende Sequenz verlängert: Cys–Lys[5(6)-Carboxyfluorescein]–Gly–Pro.

an den genannten Aminosäuren mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tau-Peptide beinhalten die Aminosäuren 226 – 240, bezogen auf die längste humane Isoform (vgl. Tab. 2.1). Die Peptide wurden synthetisch durch Festphasenpeptidesynthese hergestellt und unterscheiden sich in ihrem Phosphorylierungsmuster, ihrer monoisotopischen Masse und ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Das monophosphorylierte Peptid Tau226 – 240[F1-pThr231] (kurz: Tau[F1-pThr231]) ist an der Aminosäure Threonin231 phosphoryliert und besitzt einen pI von 8,67. Es wurde N-terminal durch die Sequenz Cys–Lys[5(6)-Carboxyfluorescein]–Gly–Pro verlängert, wodurch es neben den kraftspektroskopischen auch in Fluoreszenzmessungen eingesetzt werden kann (vgl. Abschnitt 4.2). Das zweifach-phosphorylierte Peptid Tau226 – 240[pThr231/Ser235] (kurz: Tau[pThr231/ pSer235]) trägt zwei Phosphorylierungsstellen, hat einen pI von 6,98 und wird in den Kraftspektroskopiemessungen in Abschnitt 4.1 eingesetzt. Das nicht modifizierte, unphosphorylierte Peptid wird nur für Referenzmessungen im ELISA (englisch: *enzyme-linked immunosorbant assay*) verwendet, um die Spezifität der monoklonalen Antikörper HPT-101 und HPT-104 (englisch: *hyperphosphorylated tau*) gegen die oben genannten Peptide zu untersuchen. In Abb. 2.10 (a) ist das Ergebnis der immunchemischen Untersuchung für den



**Abbildung 2.10:** Bestimmung der Spezifität der phosphorylierungsspezifischen mAk HPT-104 und HPT-101 gegen das an Thr231/Ser235 (1), Thr231 (2), Ser235 (3) phosphorylierte und das unphosphorylierte (4) Peptid mit Hilfe von ELISA-Messungen. (a) Es ist zu erkennen, dass mAk HPT-104 das monophosphorylierte Peptid Tau[Fl-pThr231] sowie das doppelt-phosphorylierte Peptid Tau[pThr231/pSer235] spezifisch bindet. Zu den beiden anderen Peptidisoformen wird keine Affinität beobachtet. (b) Der mAk HPT-101 bindet hingegen nur an das doppelt-phosphorylierte Peptid Tau[pThr231/pSer235]. Kreuzreaktivitäten zu den anderen Tau-Isoformen werden nicht beobachtet. Die gezeigten Daten stehen repräsentativ für mehrere Messungen [127].

phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper HPT-104 dargestellt. Dieser bindet spezifisch an das einfach an Thr231 phosphorylierte sowie an das doppelt-phosphorylierte Peptid Tau[pThr231/pSer235]. Dies weist darauf hin, dass der Antikörper spezifisch für die Phosphorylierung an Thr231 ist, wobei die Bindung durch die benachbarte Phosphorylierungsstelle an Ser235 scheinbar nicht beeinflusst wird. Abb. 2.10 (b) zeigt das Ergebnis der ELISA-Messung für mAk HPT-101. Wie zu erkennen ist, bindet dieser monoklonale Antikörper ausschließlich an das biphosphorylierte Peptid Tau[pThr231/pSer235]. Kreuzreaktivitäten zu den anderen Tau-Isoformen werden nicht beobachtet.

Um die Affinität des mAk HPT-101 gegenüber dem Epitop des zweifach-phosphorylierten Peptids genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich ein sogenannter Alanin-Scan durchgeführt. Dafür wurde einzeln jede Aminosäure im Peptid Tau[pThr231/pSer235] sukzessiv durch ein Alanin ausgetauscht und anschließend die Affinität des Antikörpers gegenüber den so entstandenen 15 Peptiden im ELISA bestimmt. Alanin wird zum Austausch verwendet, da es sich dabei um eine kleine Aminosäure handelt, die als funktionelle Gruppe nur einen Methylrest besitzt. Somit wird eine Affinitätsreduktion des Antikörpers durch sterische Wechselwirkungen weitestgehend verhindert [79]. Die der Peptidsequenz zugehörigen Alaninreste werden durch ein Glycin<sup>23</sup> ausgetauscht. Das Ergebnis der Epitopkartierung für den monoklonalen Antikörper HPT-101 ist in Tab. 2.2 dargestellt. Das für eine Wechselwirkung essentielle Epitop ist rot hinterlegt. Werden diese Aminosäuren ausgetauscht, wird keine Bindung des Antikörpers HPT-101 zum Peptid im ELISA detektiert. Sekundäre Aminosäuren, die zur Bindung beitragen, sind grün markiert. Weiß hinterlegte Aminosäuren sind nicht an der spezifischen Interaktion zwischen Antigen und Antikörper beteiligt.

<sup>23</sup>Glycin ist ebenfalls nur eine kleine Aminosäure, die nur ein Proton als funktionelle Gruppe besitzt. Aufgrund der flexiblen Eigenschaften dieses Moleküls können jedoch Änderungen in der Sekundärstruktur des Peptides auftreten.

Damit bieten die monoklonalen Antikörper HPT-101 und HPT-104 die Option, das Vorhandensein einer Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin231 und Serin235 in Tau-Proteinen oder Ausschnitten zu detektieren und zu quantifizieren [65]. Somit wäre ein Einsatz dieser mAk zur Detektion von Alzheimer-spezifischen Biomarkern im Rahmen einer Früherkennung möglich [129].

**Tabelle 2.2:** Epitop-Kartierung des monoklonalen Antikörpers HPT-101 anhand des biphosphorylierten Peptids. Die Phosphorylierungsstellen, die spezifisch erkannt werden, sind unterstrichen. Das für eine Wechselwirkung essentielle Epitop ist rot hinterlegt dargestellt. Sekundäre Aminosäuren, die zur Bindung beitragen, sind mit grünen Hintergrund markiert. Nicht-essentielle Aminosäuren sind in weiß dargestellt.

Sequenz	Val	Ala	Val	Val	Arg	<u>pThr</u>	Pro	Pro	Lys	<u>pSer</u>	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
HPT-101	Val	Ala	Val	Val	Arg	pThr	Pro	Pro	Lys	pSer	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
[pThr231/pSer235]															



## 3 Experimentelles

### 3.1 Versuchsaufbau, Datenerfassung und -auswertung

#### 3.1.1 Aufbau der Optischen Pinzette<sup>24</sup>

In das Inversmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wird ein Infrarot-(IR)-Laser (LCS-DTL 322, Laser 2000, Wessling, Deutschland) mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 1064\text{nm}$  eingekoppelt und durch das Linsensystem auf die Ebene des Objektivs fokussiert (vgl. Abb. 3.1). Der verwendete Nd:YAG-Infrarotlaser emittiert linear polarisiertes Licht mit einer Leistung von maximal 1 Watt und schwingt in der TEM<sub>00</sub>-Mode. Wasser weist für die ausgestrahlte Wellenlänge eine geringe Absorption auf, wodurch die Temperaturgradienten innerhalb der Messzelle minimiert werden können [61]. Eine Leistungsstabilisierung garantiert gute Langzeitstabilität der Fallensteifigkeit (vgl. Abschnitt 3.1.3.2) sowie der räumlichen Position der Falle. Zur Überprüfung dieser Eigenschaft reflektiert ein Strahlteiler 1% des ankommenden Lichtes auf eine Photodiode, welche mit einem Analog-Digital-Konverter (ADC) (NI-PCI 6120 DAQ, National Instruments, München, Deutschland) verbunden ist. Das detektierte Signal ist proportional zur aktuellen Laserleistung. Sobald der Momentanwert von der eingestellten Laserleistung abweicht, reguliert ein selbstgeschriebenes *LabView*-Programm (National Instruments) nach, so dass eine dauerhafte Stabilisierung gewährleistet ist. Vor dem Eintritt des Laserstrahls in das Mikroskop wird dieser über einen Pumplicht-Sperrfilter (RG 850, Linos Photonics, Göttingen, Deutschland) gelenkt. Anschließend wird der Strahl um zirka das Dreifache mit Hilfe eines Linsensystems aufgeweitet, durch einen dichroitischen Spiegel in die rückwertige Apertur des Objektivs (Plan-Neofluor 100 × 1.30 Oil, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) eingekoppelt und damit in die Messzelle fokussiert. Die Messzelle besteht aus einem Edelstahlkorpus mit Eingängen für die Mikropipette und dem Ein- und Auslass zum Austauschen der Umgebungsflüssigkeit mittels einer elektrisch betriebenen Spritzenpumpe. Das Zellvolumen beträgt zirka 300  $\mu\text{L}$ . Die selbstgezogene Mikropipette mit einem Innendurchmesser von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  wird in die Messzelle eingeklebt (vgl. Abb. 3.1 oben links). Sie dient zum Fixieren eines Kolloids durch Kapillarkräfte. Die Messzelle wird auf einem *xyz*-Piezotisch (P-562.3, Physik Instruments, Karlsruhe, Deutschland) positioniert. Unter Verwendung spezieller Stellelemente, die Piezoaktoren enthalten, ist es möglich, dreidimensionale Bewegungen in Nanometerschritten durchzuführen. Die Position des Tisches wird mit einem Multikanal-Digital-Piezokontroller (E-710.3, Physik Instruments, Karlsruhe,

---

<sup>24</sup>Der folgende Abschnitt ist in ähnlicher Form vom Autor bereits in [55] verwendet worden.

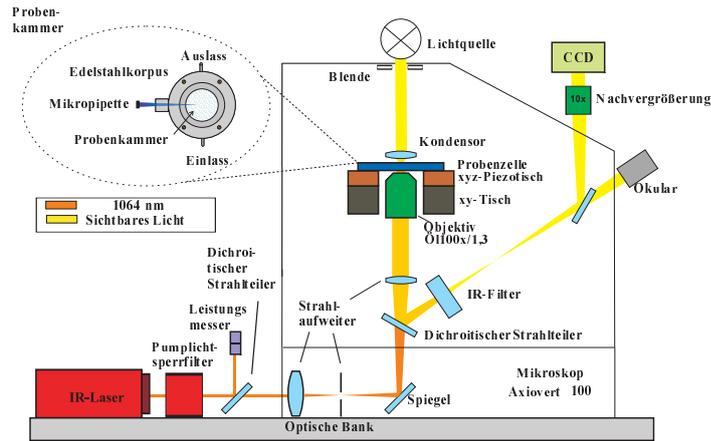


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau und Strahlengang der Optischen Pinzette

Deutschland) bestimmt. Die Steuerung erfolgt mittels *LabView* Software. Zur Bewegung über größere Distanzen mit geringerer örtlicher Auflösung wird ein durch Servomotoren bewegter Tisch, der sich horizontal in  $x$ - und  $y$ -Richtung verschieben lässt, verwendet. Beleuchtet wird die Probe mit sichtbarem Licht von einer sich außerhalb des Mikroskops befindlichen Kaltlichtquelle (LQ 1700, Linos, Göttingen, Deutschland). Das Licht wird über ein Glasfaserkabel eingekoppelt, wodurch thermische Effekte, wie die Drift der Fokusslage der Optischen Pinzette, minimiert werden. Der gesamte Aufbau befindet sich in einem klimatisierten Raum mit einer Temperatur von  $T = 298(1)$  K. Die Positionsdetektion wird über eine Digitalkamera (KPF 120, Hitachi, Düsseldorf, Bildrate:  $f = 60$  Hz) gewährleistet. Die dazu benötigten Algorithmen sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

### 3.1.2 Positionsdetektion in drei Dimensionen

#### 3.1.2.1 Positionsdetektion in der $xy$ -Ebene

Die dynamische Analyse von Rezeptor-Ligand-Komplexen auf Einzelmolekül-Niveau setzt eine genaue Positions- und Kraftbestimmung voraus, da die untersuchten Objekte Bindungslängen von wenigen Nanometern sowie Wechselwirkungskräfte im Piconewton-Bereich aufweisen. In den Experimenten mit Optischen Pinzetten sind die interagierenden Moleküle auf Mikrometer-großen Partikeln immobilisiert (vgl. Abschnitt 3.2.2), die als Kraftsensor dienen. Somit reduzieren sich die Positions- und Kraftbestimmung auf die exakte Kenntnis der Kolloidposition sowie deren Nachverfolgung, wenn die Partikel aus ihrer Ruhelage ausgelenkt werden. Dies kann über drei verschiedene Verfahren realisiert werden, die die Kolloide in der  $xy$ -Ebene, aber auch in drei Dimensionen lokalisieren können [63, 130, 131]. Basierend auf der Analyse von Beugungsbildern können Vierquadrantendiode (englisch: *quadrant photo diode*, *QPD*), holografische Videomikroskopie oder Bildanalyse-Algorithmen verwendet werden. Im Folgenden wird jedoch nur auf die Bildanalyse eingegangen. Die sogenannte Kreuzkorrelati-

onsmethode<sup>25</sup> ermöglicht die Kolloiddetektion mit einer Bildrate von bis zu 10 kHz bei einer Genauigkeit von  $\pm 2$  nm [132]. Hierbei muss jedoch der Unterschied zwischen der Präzision der Auswertelgorithmen und der optisch erreichbaren Auflösung beachtet werden. Letztere ist durch das Abbe-Limit begrenzt, welches besagt, dass zwei Objekte, deren Abstand kleiner als die halbe Wellenlänge des einfallenden Lichtes ist, mit einem konventionellen Mikroskop nicht aufgelöst werden können [133]. Die Lokalisation eines einzelnen Objektes kann jedoch, bei Kenntnis seiner Geometrie, mit Hilfe von Bildanalyse-Algorithmen deutlich genauer sein als die optische Auflösung. Durch die Verwendung geeigneter Verfahren ermöglicht die Bildanalyse ebenfalls die gleichzeitige Lokalisation mehrerer Partikel im Sichtfeld sowie die artefaktfreie, schnelle und reproduzierbare Detektion von Paarwechselwirkungen. Voraussetzung für eine optimale Positionsdetektion ist ein hoher Bildkontrast, damit die aufgenommenen Intensitätsverteilungen ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen.

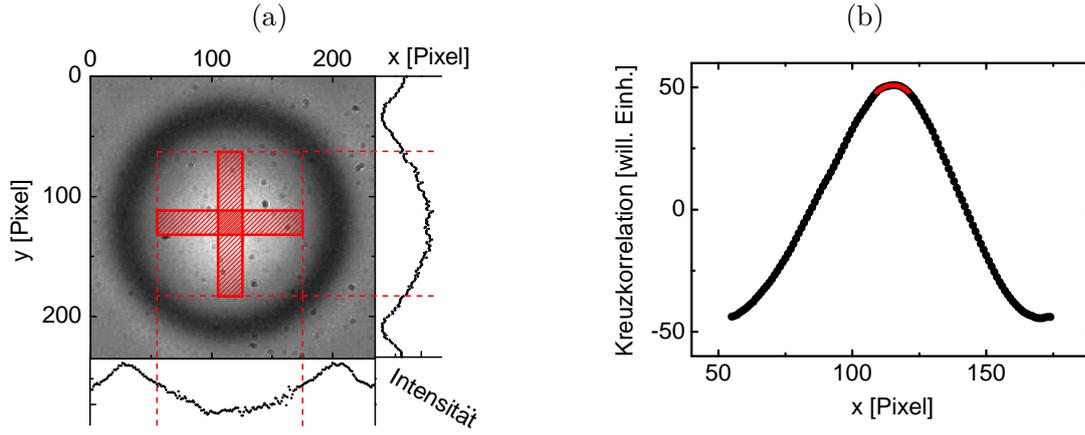
In Abb. 3.2 (a) ist das Beugungsbild eines Melaminharz-Partikels mit einem Durchmesser von  $2,23 \mu\text{m}$  in wässriger Lösung dargestellt. Sein Brechungsindex beträgt  $n = 1,68$ <sup>26</sup>, wodurch ein hoher Bildkontrast gewährleistet ist. Die Methode der Kreuzkorrelation basiert darauf, anhand des aufgenommenen Intensitätsprofils den Kolloidmittelpunkt zu bestimmen. Damit dies in Echtzeit geschehen kann, wird jedoch nicht, wie in anderen Algorithmen üblich, das komplette zweidimensionale Intensitätsprofil mit einer empirischen Funktion angepasst, sondern nur eindimensionale Segmente davon. Um die Kolloidposition zu bestimmen, wird ein quadratischer Bildausschnitt (englisch: *region of interest*, *ROI*) festgelegt, welcher das Intensitätsmaximum des Beugungsbildes enthält. Die obere linke Ecke dieses Bereiches wird anhand der Koordinaten  $x_0$  und  $y_0$  definiert. Die Kantenlänge ist durch den Parameter  $L$  gegeben und hängt stark vom Abbildungsmaßstab sowie der verwendeten Kolloidgröße ab. Die Koordinaten innerhalb der ROI werden mit  $\tilde{x}$  und  $\tilde{y}$  bezeichnet. Es gilt:  $\tilde{x} = x - x_0$  und  $\tilde{y} = y - y_0$  mit  $\tilde{x}, \tilde{y} \in \mathbb{N}_0 \cap [0, L - 1]$ . Zur Bestimmung der Kolloidmittelpunktskoordinaten  $\tilde{x}_K$  und  $\tilde{y}_K$  werden über die gesamte Länge der ROI zwei zueinander senkrecht stehende Streifen mit einer Breite von 20 Pixel um  $\tilde{x} = \tilde{y} = (L - 1)/2$  definiert. Dieser Vorgang ist anhand der rot schattierten Streifen in Abb. 3.2 (a) dargestellt. Aufgrund der identischen Vorgehensweise zur Bestimmung der Mittelpunktskoordinaten  $(x_K, y_K)$  wird im Weiteren das Vorgehen nur für den Streifen in  $x$ -Richtung beschrieben. Zunächst wird das Streifenprofil  $A(\tilde{x})$  bestimmt, in dem an jeder Stelle  $\tilde{x}$  über die Intensitäten der 20 Pixel in  $\tilde{y}$  gemittelt wird:

$$A(\tilde{x}) = \frac{1}{L} \sum_{\tilde{x}=0}^{L-1} A(\tilde{x}) \quad (3.1)$$

Zur Bestimmung der Partikelmitte wird die diskrete Kreuzkorrelationsfunktion  $K(d)$  aus dem Intensitätsprofil  $A(\tilde{x})$  mit seiner Richtungsinvertierten  $B(\tilde{x}) = A(L - \tilde{x})$  berechnet:

<sup>25</sup>Neben der Kreuzkorrelationsmethode gibt es auch noch andere Analysealgorithmen. Für eine Übersicht wird auf die Literatur verwiesen [132].

<sup>26</sup>Angabe des Herstellers microparticles, Berlin, Deutschland.

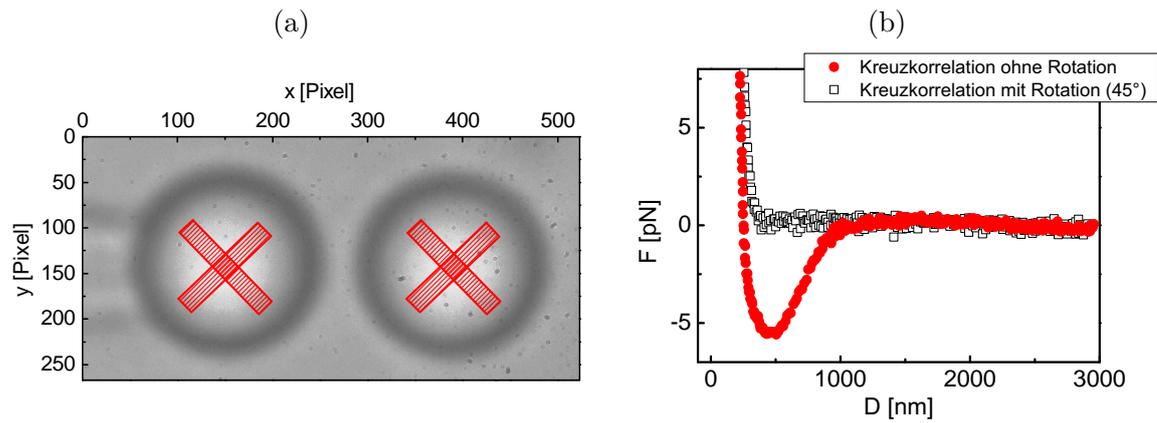


**Abbildung 3.2:** (a) Das Beugungsbild eines  $2,23\ \mu\text{m}$  großen Melaminharz-Partikels sowie das eindimensionale Intensitätsprofil für  $[x,y] = 120$  aus einem Graustufenbild. Die ROI (englisch: *region of interest*) ist durch das gestrichelte rote Quadrat dargestellt, das zwei Streifen (rot schattiert) der Breite von 20 Pixel enthält, die zur Positionsbestimmung verwendet werden. Die obere linke Ecke der ROI wird als Referenzpunkt  $x_0$  und  $y_0$  definiert. (b) Dargestellt ist die verschobene Kreuzkorrelationsfunktion  $K(d + \frac{L}{2} + x_0)$  (schwarze Symbole) des eindimensionalen Intensitätsprofils mit dem Indexinversen derselben für den horizontalen Streifen. Das lokale Maximum wird mit einer quadratischen Funktion angepasst (rote Linie), woraus sich die  $x$ -Koordinate des Kolloidmittelpunkts  $\tilde{x}_K$  bestimmen lässt. Analoges gilt für den vertikalen Streifen. (Abbildung nach C. Wagner [65]. Die Abbildungsunterschrift wurde modifiziert.)

$$\begin{aligned}
 K(d) &= \frac{1}{L} \sum_{\tilde{x}=0}^{L-1} (A(\tilde{x} - \bar{A})(B(\tilde{x} - d) - \bar{B})) \\
 &= \mathcal{F}^{-1}(\mathcal{F}(A(x))^* \mathcal{F}(B(x)))(d),
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

wobei  $d$  die Verschiebung und  $\bar{A}$  den Mittelwert des eindimensionalen Intensitätsprofils darstellt. Aus Gl. 3.2 geht hervor, dass die Kreuzkorrelationsfunktion identisch mit dem Produkt der Fouriertransformierten der komplex konjugierten Funktion  $A(\tilde{x})^*$  und  $B(\tilde{x})$  ist. Die verschobene Kreuzkorrelationsfunktion  $K(d + L/2 + x_0)$  für das Beugungsbild aus Abb. 3.2 (a) ist in Abb. 3.2 (b) dargestellt. Zur Bestimmung der Mittelpunktskoordinate  $x_K$  wird das lokale Maximum von  $K(d + L/2 + x_0)$  mit einem Polynom zweiter Ordnung angepasst. Die Position der Extremstelle  $\tilde{x}_{\max}$  entspricht in diesem Fall dem Mittelpunkt des Kolloids in  $x$ -Richtung (Angabe in Pixel). Zur Realisierung der Nachverfolgung des Partikels wird die ROI des folgenden Bildes  $(x_0, y_0)$  automatisch um die Beträge  $\tilde{x}_{\max}$  und  $\tilde{y}_{\max}$  verschoben, so dass sich das Beugungsbild des Kolloids immer im Zentrum der ROI befindet. Mit dem Verfahren der Kreuzkorrelation wird eine Positionsgenauigkeit von  $\pm 2\ \text{nm}$  erreicht.

Diese Methodik ist auch zur Detektion von Paarwechselwirkungen verwendbar. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es im Bereich, in dem sich die Beugungsbilder der Kolloide überlappen, zu Artefakten in der Positionsbestimmung kommt. Die Ausprägung dieser Artefakte hängt von Kolloidgröße und -material, dem Abbildungsmaßstab, den Eigenschaften der Beleuchtung sowie der Wahl der Kantenlänge  $L$  ab [65, 132]. Um solche Störungen zu vermeiden, wird auf die um  $45^\circ$  gedrehte Kreuzkorrelationsmethode zurückgegriffen (vgl. Abb. 3.3 (a)). Dabei werden die beiden eindimensionalen Streifen, anhand derer die Mittelpunktsko-



**Abbildung 3.3:** Positionsbestimmung mittels der gedrehten Kreuzkorrelationsmethode in Paarwechselwirkungsexperimenten. (a) Um detektionsseitige Artefakte in der Positionsbestimmung von zwei Mikropartikeln bei geringen Oberflächenabständen zu vermeiden, werden die Streifen um  $45^\circ$  gedreht. Damit wird die Region, in der sich die Beugungsbilder überlappen, aus der Positionsanalyse ausgespart. (b) Kraft-Abstandsbeziehung für die Paarwechselwirkung aus (a) mit (offene schwarze Vierecke) und ohne (rote Kreise) um  $45^\circ$  gedrehte Kreuzkorrelationsmethode. Bei der Bildanalyse ohne eine Rotation um  $45^\circ$  treten bei kleinen Oberflächenabständen Artefakte auf, die sich in einem attraktiven Charakter widerspiegeln. Dies wird von den sich überlappenden Beugungsbildern verursacht und kann durch die Rotation der verwendeten Streifen vermieden werden. (Abbildung nach C. Wagner [65]. Die Abbildungsunterschrift wurde modifiziert.)

ordinaten der Mikropartikel bestimmt werden, um  $45^\circ$  gedreht, so dass der Überlappbereich ausgespart wird. Die weitere Analyse erfolgt nach dem bereits beschriebenen Schema. In Abb. 3.3 (b) sind die resultierenden Kraft-Abstandskurven für die gedrehte (offene schwarze Symbole) und die nicht-gedrehte (rote Kreise) Kreuzkorrelationsmethode dargestellt. Für Letztere treten für kleine Oberflächenabstände  $D$  Artefakte auf, die sich durch scheinbar attraktive Wechselwirkungen darstellen. Dies ist nicht der Fall für die um  $45^\circ$  gedrehte Kreuzkorrelationsmethode, wodurch die exakte Positionsdetektion von mehreren Partikeln in engem Kontakt gewährleistet ist. Ein alternatives Verfahren zur Analyse von Paarwechselwirkungen stellt die sogenannte Kantendetektion dar. Dabei werden die Kolloidränder mit Hilfe von Kreisen angepasst, deren Zentren den Mittelpunkten der Partikel entsprechen. Diese Methode liefert Ergebnisse mit vergleichbarer Genauigkeit, eine Echtzeitüberwachung ist jedoch nicht möglich [132].

### 3.1.2.2 Positionsdetektion in $z$ -Richtung: Die Höhendetektion

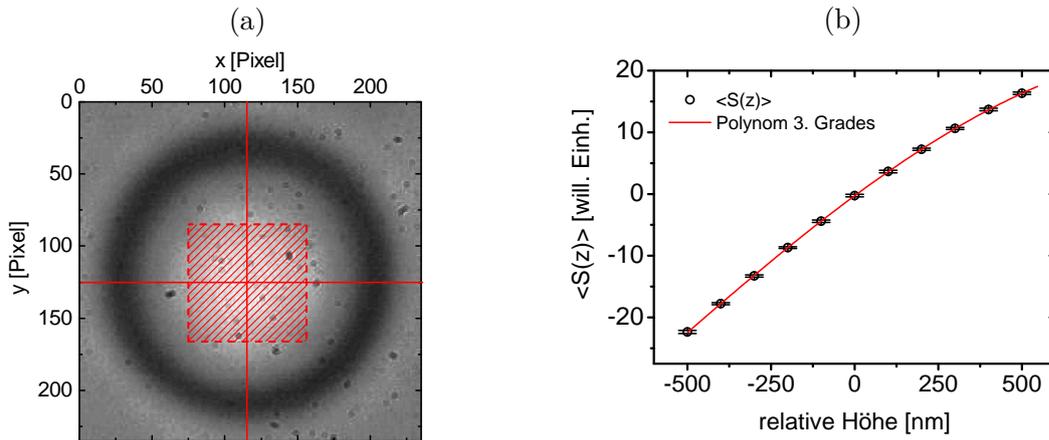
In Paarwechselwirkungsexperimenten, in denen ein Kolloid in der optischen Falle gehalten und das Zweite an einer Mikropipette immobilisiert wird, muss gewährleistet sein, dass sich beide Partikel während der gesamten Dauer des Experimentes in derselben  $xy$ -Ebene befinden. Somit müssen für die Langzeitstabilität solcher Messungen beispielsweise driftbedingte Höhenänderungen der Pipette kompensiert werden. Eine mögliche Herangehensweise zur Vermeidung dieses Effekts ist die Implementierung einer Höhendetektion.

Das Prinzip, die relative Höhe eines Mikropartikels zu bestimmen, basiert auf der Detektion der höhenabhängigen Änderungen des Beugungsbildes, da sowohl die Form als auch die

Intensität des Hauptmaximums einer solchen Abbildung von der  $z$ -Position des Partikels bezüglich der Fokalebene abhängt [134]. Zur Bestimmung dieser Abhängigkeit wird ähnlich vorgegangen wie bei der Positionsbestimmung in der  $xy$ -Ebene. Zunächst wird ein entsprechender Bildausschnitt gewählt, so dass sich das Intensitätsmaximum des Beugungsbildes in diesem befindet. Für die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene experimentelle Konfiguration wurde empirisch ein  $81 \times 81$  Pixel großes Quadrat um den Kolloidmittelpunkt als ROI definiert (vgl. Abb. 3.4 (a)). Die Matrixelemente der beobachteten Pixel-Intensitäten innerhalb der ROI werden mit  $I_{i,j}$ ;  $i, j \in \cap[-40,40]$  bezeichnet.  $i = j = 0$  entspricht dabei dem Kolloidmittelpunkt. Die Bestimmung der relativen Höhe eines Mikropartikels erfolgt mit Hilfe des sogenannten Referenzpolynoms  $S(z)$ . Dieses ergibt sich aus der Beugungsbildanalyse des Kolloids an der Mikropipette bei verschiedenen  $z$ -Positionen. Dazu wird in der Ausgangshöhe ( $z = 0$ ) ein Referenzbild aufgenommen und dessen Intensitätsverteilung in der Matrix  $I_{i,j}^{\text{initial}}$  gespeichert. Die Startposition ist dabei willkürlich gewählt. Anschließend wird die Kolloidposition mit Hilfe eines Piezotisches in festgelegten 100 nm-Schritten um die Ausgangsposition im Bereich von  $z \in [-500, 500]$  nm bewegt. An jedem Punkt werden die Matrixelemente  $I_{i,j}^{\text{aktuell}}(z)$  gespeichert und punktweise vom Referenzbild  $I_{i,j}^{\text{initial}}$  abgezogen. Somit ergibt sich das Referenzpolynom durch Summation über alle Differenzen:

$$S(z) = \sum_{i,j} \left( I_{i,j}^{\text{aktuell}}(z) - I_{i,j}^{\text{initial}} \right). \quad (3.3)$$

Um den Einfluss von Fluktuationen im Intensitätsprofil bei der Bestimmung des Referenzpolynoms zu minimieren, werden in jeder Höhe 20 Bilder aufgenommen, aus denen jeweils die  $S(z)$ -Werte bestimmt werden. Anschließend wird daraus der Mittelwert gebildet. In Abb. 3.4 (b) ist die Höhenabhängigkeit des gemittelten Referenzpolynoms dargestellt (offene schwarze



**Abbildung 3.4:** (a) Beugungsbild eines  $2,23 \mu\text{m}$  großen Melaminharz-Partikels zur Festlegung der ROI (rot schraffierter Bereich). Innerhalb dieses quadratischen Bildausschnittes befindet sich das Intensitätsmaximum, das eine ausgeprägte Höhenabhängigkeit ( $z$ -Richtung) aufweist. (b) Die  $z$ -Abhängigkeit des Referenzpolynoms  $\langle S(z) \rangle$ . In jeder  $z$ -Position werden 20 Bilder aufgenommen, aus denen der jeweilige  $S(z)$ -Wert berechnet und anschließend der Mittelwert gebildet wird. Die Daten werden mit einem Polynom dritten Grades angepasst, das auch als Masterkurve bezeichnet wird (rote Linie). Durch Lösen dieser Gleichung für einen bestimmten  $S(z)$ -Wert kann die entsprechende Höhe des Partikels bestimmt werden. (Abbildung nach C. Wagner [65]. Die Abbildungsunterschrift wurde modifiziert.)

Kreise). Es ist zu erkennen, dass  $\langle S(z) \rangle$  über den gesamten  $z$ -Bereich monoton steigend ist. Die Daten können mit einem Polynom dritten Grades, der sogenannten Masterkurve, angepasst werden. Somit kann die relative Höhe eines Mikropartikels bestimmt werden, in dem der  $S(z)$ -Wert berechnet und für diese Größe die Masterkurve gelöst wird. Da sich die berechneten Höhen jedoch immer auf das Referenzbild ( $z = 0$ ) beziehen, muss zu Beginn einer jeden Messung eine neue Masterkurve erstellt werden.

Mit Hilfe dieser Höhendetektion ist es möglich, die axiale Position eines Kolloids unter Weißlichtbeleuchtung mit einer Genauigkeit von  $\pm 2$  nm zu bestimmen [134].

### 3.1.3 Kalibrierung

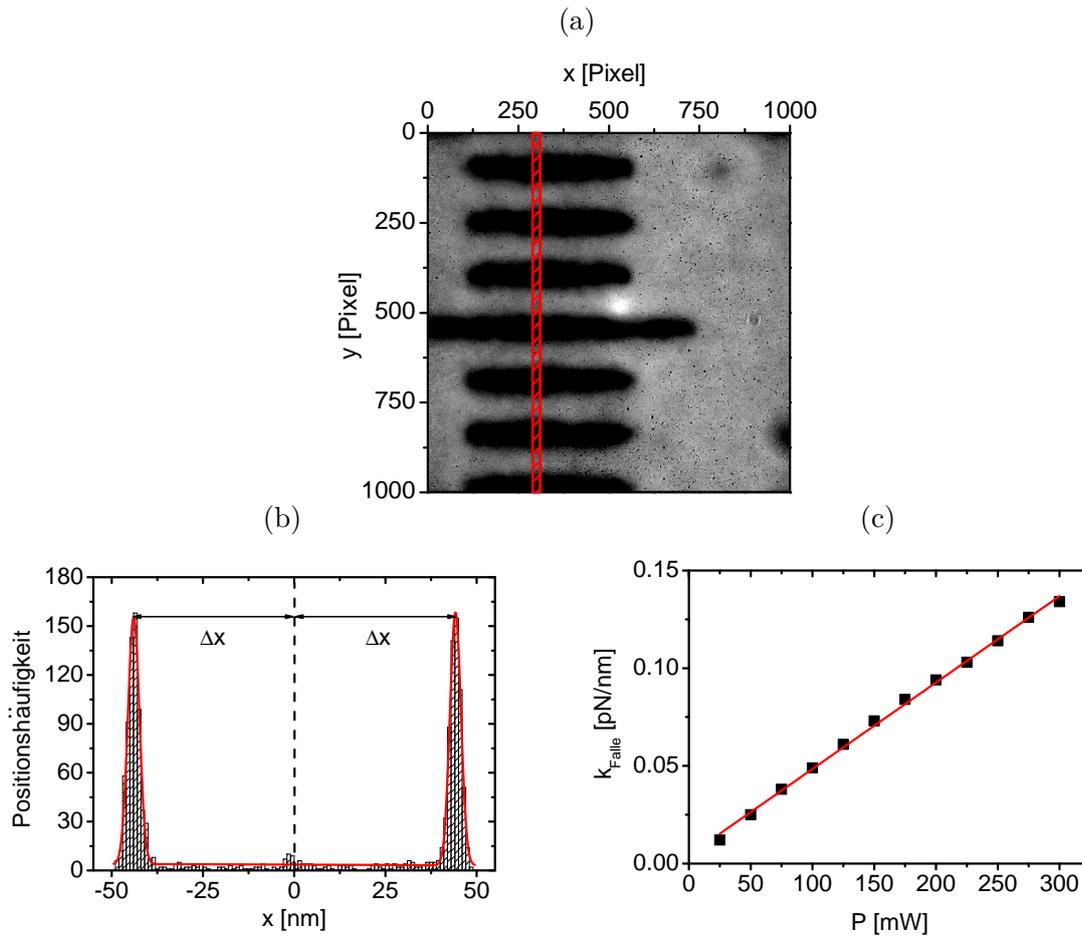
#### 3.1.3.1 Ortskalibrierung

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, basiert die Positionsdetektion der Mikropartikel auf der Beugungsbildanalyse der von einer CCD-Kamera (vgl. Abschnitt 3.1.1) erzeugten Bilder. Der damit bestimmte Abstand zwischen den Zentren zweier Kolloide kann jedoch zunächst nur in Pixel ausgegeben werden. Um Rückschlüsse auf physikalisch relevante Parameter zu ziehen, wird somit eine Umrechnung zwischen Pixel und Nanometer benötigt. Dies geschieht in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten anhand eines geeichten Mikrometermaßstabes. Auf diesem sind in einem festen Abstand von  $2 \mu\text{m}$  Markierungsstriche aufgetragen. Zur Bestimmung des Umrechnungsfaktors zwischen den beiden Längenskalen werden zirka 100 Bilder des Maßstabs (vgl. Abb. 3.5 (a)) aufgenommen, die anschließend mit Hilfe eines *LabView*-Programmes ausgewertet werden. Dazu wird manuell ein Bereich von 20 Pixel in  $x$ -Richtung ausgewählt, auf dem die Skala gut zu erkennen ist (rot schraffierter Bereich). Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird die Intensitätsverteilung über die Breite des zuvor definierten Ausschnittes gemittelt und danach die Koordinaten der Maxima sowie deren Abstand  $d_{i,\text{Pixel}}$  zueinander bestimmt. Diese Prozedur wird für alle aufgenommenen Bilder wiederholt. Der Abbildungsmaßstab ergibt sich aus dem Mittelwert des Verhältnisses aus Abstand der Skalenstriche und der Maximapositionen:

$$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{2000 \text{ nm}}{d_{i,\text{Pixel}}} = 13,25(5) \text{ nm/Pixel.} \quad (3.4)$$

#### 3.1.3.2 Kraftkalibrierung

Kraftspektroskopische Messungen an der Optischen Pinzette sind nur möglich, wenn neben einer akkuraten Positions- auch eine genaue Kraftbestimmung gewährleistet wird. Durch die in dieser Arbeit verwendeten Kolloide, deren Durchmesser  $D_0$  im Bereich der benutzten Laserwellenlänge  $\lambda$  liegt, sind die in Abschnitt 2.1.1 hergeleiteten Gleichungen nicht anwendbar, um die auf den Partikel wirkenden Kräfte zu bestimmen. Somit muss auf alternative Kalibrierungsmethoden zurückgegriffen werden. Die Wahl der optimalen Kraftkalibrierungsrou-



**Abbildung 3.5:** (a) Beugungsbild eines geeichten Mikrometermaßstabes zur Bestimmung des Abbildungsmaßstabes. Mit Hilfe eines *LabView*-Programmes wird die Intensitätsverteilung innerhalb eines 20 Pixel breiten Streifens (rot schraffierter Bereich) analysiert. Durch Kenntnis des Abstandes der Intensitätsmaxima kann der Umrechnungsfaktor zwischen Pixel und Nanometer bestimmt werden. (b) Positionshistogramm der  $x$ -Koordinate des Kolloidmittelpunkts bei kontinuierlicher Auslenkung eines in der optischen Falle gefangenen Kolloids, hervorgerufen durch die stokesche Reibungskraft  $F_{\text{Stokes}}$  ( $v = 200 \mu\text{m/s}$ ).  $\Delta x$  ist dabei als der halbe Abstand zwischen beiden Extrempunkten definiert, über den die Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$  anhand von Gl. 3.5 berechnet werden kann. (c) Linearer Zusammenhang zwischen Laserleistung  $P_{\text{Laser}}$  und Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$ . Die Symbolgröße entspricht dem Messfehler.

tine zur Bestimmung der Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$  hängt von den Eigenschaften der Optischen Pinzette ab. Für Aufbauten, in denen eine Hochgeschwindigkeitskamera (Bildrate  $\geq 1000$  Hz) implementiert ist, empfiehlt sich ein Ansatz, der die Fluktuationen des Kolloids in der optischen Falle analysiert. Beispiele dafür sind die Auswertung der spektralen Leistungsdichte der thermischen Fluktuationen oder ihre Analyse anhand des Äquipartitionstheorems [26, 63]. Da die Bildrate in der hier verwendeten Messapparatur auf 60 Hz begrenzt ist, können diese Verfahren nicht angewendet werden, um die Kraftkonstante  $k_{\text{Falle}}$  der Optischen Pinzette zu bestimmen. Ein von der Bildrate unabhängiges Kalibrierungsverfahren stellt die Stokes-Methode dar. Unter der Annahme laminarer Ströme, d.h. kleiner Reynolds-Zahl [61], einer newtonschen Flüssigkeit und einer homogener Viskosität innerhalb des Mediums, kann die Fallensteifigkeit durch ein Gleichgewicht zwischen der stokeschen Reibungskraft  $F_{\text{Stokes}}$  und der von der optischen Falle ausgeübten rücktreibenden Kraft  $F_{\text{Hook}}$  beschrieben werden. Auf-

grund der Harmonizität des Potentials des Laserstrahls (vgl. Gl. 2.5) wird die rücktreibende Kraft über das hooksche Gesetz beschrieben [61, 63, 135]:

$$\begin{aligned}
 F_{\text{Stokes}} &= F_{\text{Hook}} \\
 3\pi\eta(T)D_0v_{\text{Piezo}} &= k_{\text{Falle}}\Delta x \\
 k_{\text{Falle}} &= \frac{3\pi\eta(T)D_0v_{\text{Piezo}}}{\Delta x}.
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

Somit setzt diese Kalibrierungsmethode die Kenntnis des Kolloiddurchmessers  $D_0$ , der temperaturabhängigen Viskosität des Umgebungsmediums  $\eta(T)$ , der Geschwindigkeit  $v_{\text{Piezo}}$ , mit der das Kolloid relativ zum Medium bewegt wird, und der Kolloidverschiebung aus der Ruhelage  $\Delta x$  voraus. Weiterhin muss beachtet werden, dass Korrekturen hinsichtlich der Stokes-Kraft nötig sind, wenn sich der Partikel zu nah am Messzellenboden befindet, da sich der Reibungswiderstand in der Nähe einer festen Oberfläche erhöht. Diese Abweichungen von der erhaltenen Fallensteifigkeit können mit Hilfe des Gesetzes von Faxén [61, 136] berechnet werden und belaufen sich für eine Messhöhe  $z \approx 30 \mu\text{m}$  auf  $\approx 2\%$ . Diese Korrekturen liegen jedoch im Toleranzbereich der Messgenauigkeit und werden im Folgenden vernachlässigt.

Zur Bestimmung der Fallensteifigkeit wird für die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, ein Melaminharz-Partikel ( $D_0 = 2,23(4) \mu\text{m}$ ) in der optischen Falle gefangen und zirka  $30 \mu\text{m}$  oberhalb des Zellenbodens mittig in der Messzelle positioniert. Daraufhin wird der Piezotisch periodisch um einen festen Betrag in  $x$ -Richtung ( $x \in [-50, 50] \mu\text{m}$ ) mit einer festgelegten Geschwindigkeit  $v_{\text{Piezo}} = 200 \mu\text{m/s}$  bewegt. Aufgrund der Viskosität des Umgebungsmediums wird das Kolloid um den Betrag  $\Delta x$  aus seiner Ruhelage ausgelenkt, weshalb eine rücktreibende Kraft von der optischen Falle hervorgerufen wird. Die Messung wird für verschiedene Laserleistungen  $P_{\text{Laser}} \in [25, 300] \text{mW}$  sowie Piezotischgeschwindigkeiten  $v_{\text{Piezo}} \in [50, 750] \mu\text{m/s}$  durchgeführt. In Abb. 3.5 (b) ist die  $x$ -Position des Kolloidmittelpunktes für eine Laserleistung von  $P_{\text{Laser}} = 200 \text{mW}$  in einem Histogramm dargestellt. Die beiden zu erkennenden Maxima stellen dabei die maximale Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle dar.  $\Delta x$  ist als der halbe Abstand zwischen beiden Extrempunkten definiert. Die Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$  wird anschließend anhand von Gl. 3.5 berechnet. In Abb. 3.5 (c) ist der lineare Zusammenhang zwischen eingestellter Laserleistung  $P_{\text{Laser}}$  und der Federkonstante der optischen Falle  $k_{\text{Falle}}$  dargestellt. Aus den geschwindigkeitsabhängigen Messungen folgt, dass die Kraftkonstante für eine festgelegte Laserleistung unabhängig von der benutzten Piezotischgeschwindigkeit  $v_{\text{Piezo}}$  ist. Für die in Abschnitt 4.1 und 4.2 durchgeführten Experimente ergibt sich für eine Laserleistung von  $P_{\text{Laser}} = 200 \text{mW}$  und eine Viskosität von  $\eta = 891 \mu\text{Pa}\cdot\text{s}$  ( $T = 298 \text{K}$ ) die Fallensteifigkeit zu  $k_{\text{Falle}} = 0,095(5) \text{pN/nm}$ .

### 3.1.4 Das Messprogramm: Automatische Höhen- und Positionsregulierung

Zur Durchführung der Messungen (vgl. Abschnitt 4.1 und 4.2) kommt ein in *LabView* geschriebenes Messprogramm zum Einsatz, das eine Teilautomatisierung des Messablaufes ermöglicht. Anhand dieser Benutzeroberfläche erfolgt die Steuerung des Experimentes über einen Com-

puter, mit dem neben der Ansteuerung des Piezotisches auch die automatische Höhen- und Positionskorrektur realisiert wird. Letztere ist für die Durchführung von Langzeitmessungen essentiell, da die reproduzierbare Detektion von Kraft-Abstandskurven nur dann gewährleistet ist, wenn beide Kolloide nach einem Messzyklus in ihre Ausgangsposition zurückgeführt werden. Weiterhin müssen beide Partikel für die Dauer des Experimentes in der gleichen  $xy$ -Ebene zueinander bleiben. Die Höhenkorrektur ist somit besonders in Experimenten wichtig, bei denen eine Mikropipette zur Immobilisierung eines Partikels verwendet wird, da diese eine  $z$ -Drift von bis zu 65 nm/min aufweisen kann<sup>27</sup>. Die aufgezeichneten Kraft-Abstandskurven werden durch die daraus resultierenden Höhenunterschiede verfälscht, weswegen diese korrigiert werden müssen [65, 134].

Mit Start des Programms werden kontinuierlich Kamerabilder mit einer Frequenz von 60 Hz aufgezeichnet, wodurch sie der weiteren Analyse zur Verfügung stehen. Durch die Vorgabe der Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$  und des Abbildungsmaßstabes können die Kraft-Abstandskurven in Echtzeit berechnet und überwacht werden. Im Weiteren werden noch die Protokolldauer  $T$ , die Fahrstrecke  $\Delta s$ , die Piezotischgeschwindigkeit  $v_{\text{Piezo}}$  sowie die Anzahl der Wiederholungen  $R$  eingestellt<sup>28</sup>. Anschließend wird die ROI für die Positionsdetektion beider Kolloide festgelegt (vgl. Abschnitt 3.1.2.1) und das Referenzpolynom zur Höhenregulierung bestimmt. Dazu werden die Koordinaten des an der Pipette gehaltenen Mikropartikels  $(x_0^{\text{MP}}, y_0^{\text{MP}}, z_0^{\text{MP}})$  innerhalb eines Referenzbildes definiert und das Referenzpolynom nach dem in Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen Verfahren erstellt.

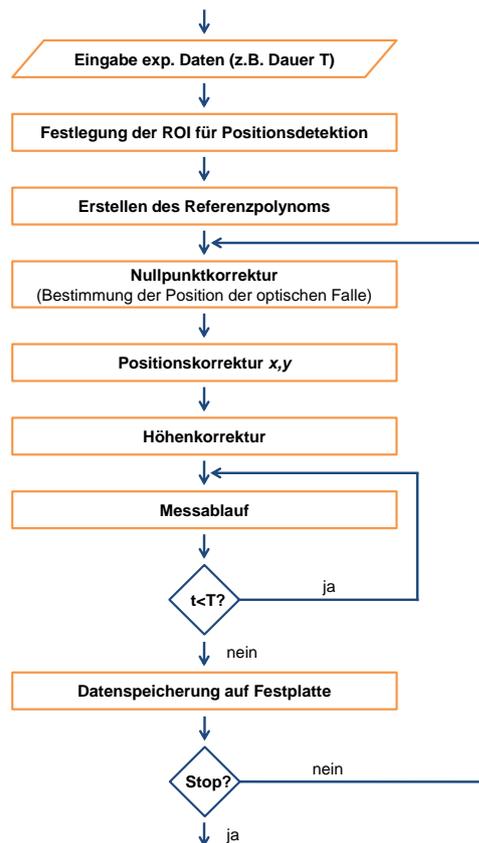
Nach der Festlegung der initialen Parameter und der Kalibrierung der Höhendetektion beginnt der automatisierte Messprozess. Dazu werden die Positionskoordinaten des Partikels in der optischen Falle  $(x_0^{\text{OT}}, y_0^{\text{OT}})$  durch Mittelung der Zentrumskoordinaten ohne Krafteinwirkung über 75 Bilder bestimmt und als  $(x^{\text{OT}}, y^{\text{OT}})$  abgespeichert (vgl. Abb. 3.6, Nullpunkt-korrektur). Somit kann die resultierende Kraft in  $x$ -Richtung bestimmt werden (Analoges gilt für die  $y$ -Komponente.):

$$F^{\text{OT}}(x)[\text{pN}] = \left(x^{\text{OT}} - x_0^{\text{OT}}\right) [\text{Pixel}] \cdot 13,25 \text{ nm/Pixel} \cdot k_{\text{Falle}}[\text{pN/nm}]. \quad (3.6)$$

Die sich anschließende Positionskorrektur in der  $xy$ -Ebene korrigiert Abweichungen der aktuellen Position von der Ausgangsposition:  $\Delta x^{\text{MP}}[\text{Pixel}] = x^{\text{MP}} - x_0^{\text{MP}}$ , indem der Piezotisch um den Betrag von  $-\left(\Delta x^{\text{MP}} \cdot 13,25 \text{ nm/Pixel}\right)$  verschoben wird. Danach erfolgt die Höhenkorrektur des Kolloids in der Mikropipette anhand des in Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen Verfahrens (Abgleich der aktuellen Höhe mit dem Referenzpolynom). Nach Beendigung der notwendigen Korrekturen wird die Messung gestartet. Dabei werden fortlaufend die Positionen beider Kolloide in  $x$ - und  $y$ -Richtung, die berechnete Kraft sowie ein Zeitstempel in eine Tabelle geschrieben und anschließend nach Ablauf der Protokolldauer  $T$  abgespeichert

<sup>27</sup>Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine systematische Drift. Die Driftgeschwindigkeit der Mikropipette variiert bei verschiedenen Messzellen und kann somit nicht anhand einer gemittelten Drift herausgerechnet werden.

<sup>28</sup>Für eine Fahrgeschwindigkeit von  $v = 0,75 \mu\text{m/s}$ , einer Fahrstrecke von  $\Delta s = 1 \mu\text{m}$  und einer Sekunde Inkubationszeit (vgl. Abschnitt 3.1.5) ergibt sich die Dauer für eine Wiederholung zu  $t \approx 3,7 \text{ s}$ . Die Protokolldauer  $T$  für 10 Wiederholungen pro Messschleife ist somit  $T = 37 \text{ s}$ .



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der automatischen Höhen- und Positionsregulierung innerhalb des Messprogrammes.

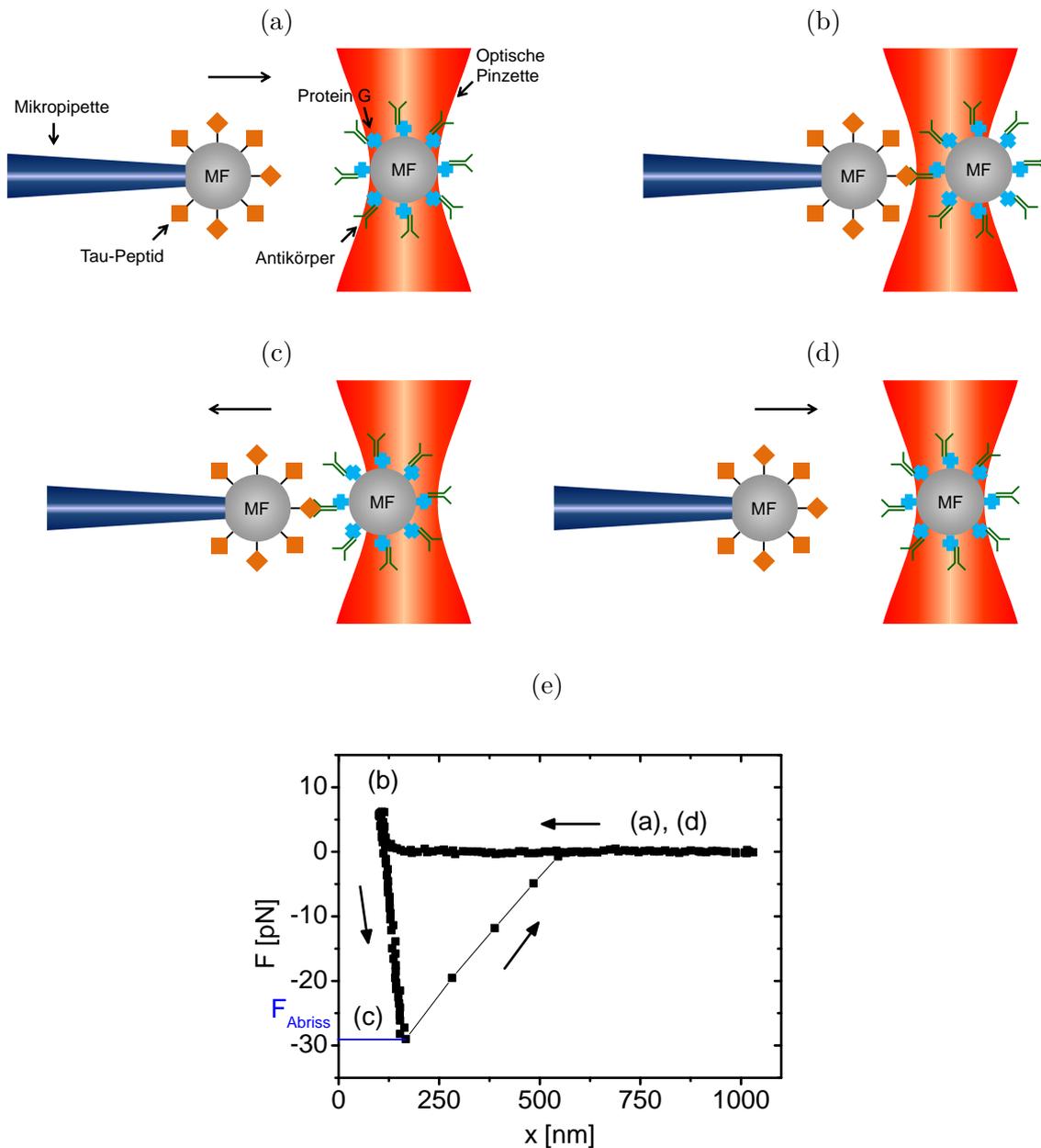
(ACSII-Kodierung). Darauf folgend beginnt das Messprogramm die Routine automatisch beim Schritt „Nullpunktkorrektur“. Alternativ besteht die Option, die Messung zu beenden.

### 3.1.5 Experimentelle Durchführung

Zu Beginn jeder Messung muss die Messzelle präpariert (vgl. Abb. 3.1) und auf dem Piezotisch des Mikroskops befestigt werden. Alle Experimente werden in PBS-Puffer und bei Raumtemperatur durchgeführt, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten<sup>29</sup>. Bevor die Elektrolytlösung in die Messzelle eingespült wird, wird sie filtriert (Rotilabo-Spritzenfilter, Porengröße  $d_{\text{Pore}} = 0,22 \mu\text{m}$ , Roth, Deutschland), um Verunreinigungen zu minimieren. Die verschiedenen Kolloidlösungen werden verdünnt mittels einer Injektionsnadel in einen Silikon Schlauch gespritzt, durch den sie in die Messzelle transportiert werden. Um die Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Rezeptoren und Liganden zu untersuchen, wird zunächst die Tau-Peptid-Kolloidlösung in die Zelle gespült, ein einzelner Partikel in der optischen Falle gefangen und der Mikropipette angenähert. Durch Erzeugen eines Unterdruckes wird dieses Kolloid an der Pipettenspitze fixiert. Anschließend wird die Messzelle mit PBS-Lösung gespült, um die restlichen Tau-Partikel zu entfernen. Daraufhin werden die

<sup>29</sup>Vgl. Abschnitt 2.1.3.

Antikörper-beschichteten Kolloide eingespült, ein einziges in der Laserfalle gefangen und in die Nähe des ersten Kolloids gebracht (vgl. Abb. 3.7 (a)). Im Weiteren wird die Zelle erneut gespült.



**Abbildung 3.7:** (a) Ausgangsposition, bei der die automatische Messroutine (vgl. Abschnitt 3.1.4) gestartet wird. Das Tau-Peptid-beschichtete Kolloid ist an einer Mikropipette durch Kapillarkräfte immobilisiert. Der zweite Partikel (beschichtet mit Protein G und Antikörper) wird in der optischen Falle gehalten. (b) Beide Kolloide werden aufeinander gedrückt, bis eine Kraft von  $8(2)$  pN erreicht ist. In dieser Position verbleiben die Partikel für eine Sekunde. (c) Der in der Mikropipette gehaltene Partikel wird in seine Ausgangsposition zurückgeführt. Durch die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand wird auch das Kolloid in der optischen Falle ausgelenkt, bis die Bindung reißt und es in seine Ruhelage zurückspringt (d). (e) Typische Kraft-Abstandskurve für eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die Beschriftungen beziehen sich auf die entsprechenden Positionen aus (a)-(d). Die Abrisskraft ist mit  $F_{\text{Abriss}}$  markiert.

Um die Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu messen, wird das in Abschnitt 3.1.4 beschriebene Messprogramm mit implementierter Höhen- und Positionskorrektur verwendet. Dazu werden beide Partikel schrittweise angenähert, bis eine Kraft von 8(2) pN erreicht ist (vgl. Abb. 3.7 (b)). In dieser Position verweilen die Kolloide für eine Sekunde, bis sie mit einer festgelegten Geschwindigkeit  $v_{\text{Piezo}}$  separiert werden. Hat sich eine Rezeptor-Ligand-Bindung ausgebildet, wird der Mikropartikel in der optischen Falle aus seiner Ruheposition ausgelenkt, bis die wirkende Kraft die Abrisskraft überschreitet und die Bindung bricht (vgl. Abb. 3.7 (c)). Anschließend befinden sich beide Kolloide in ihrer Ausgangsposition (vgl. Abb. 3.7 (d)), und der Messzyklus beginnt von vorn. Abb. 3.7 (e) zeigt eine typische Kraft-Abstandskurve. Die Beschriftungen beziehen sich auf die entsprechenden Positionen aus (a)-(d).

Um aus den experimentellen Daten die Bindungsparameter zu bestimmen, müssen die Abrisskraftshistogramme (vgl. Abschnitt 2.1.2.3) bei verschiedenen Belastungsraten  $\dot{F}$  aufgenommen werden. Aus diesem Grund wird diese im Bereich von  $\dot{F} \in [18, 99]$  pN/s variiert, was einer Piezotischgeschwindigkeit von  $v_{\text{Piezo}} \in [200, 1000]$  nm/s entspricht.

### 3.1.6 Automatische Messdatenauswertung

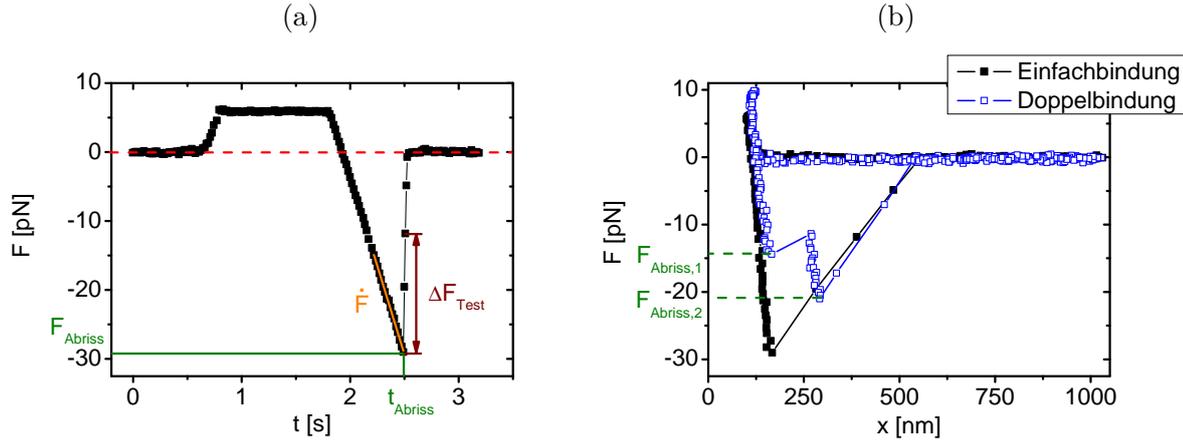
Zur verlässlichen Bestimmung der Bindungsparameter einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung anhand von dynamischer Kraftspektroskopie wird eine große Datenmenge (z.B. Abrisskräfte) benötigt. Zur schnellen und objektiven Auswertung der experimentell gewonnenen Kraft-Abstandskurven wird ein in C programmiertes Auswerteprogramm verwendet. Damit ist es möglich, die Abrisskräfte  $F$  sowie die Belastungsraten  $\dot{F}$  (vgl. Abschnitt 2.1.2.3) zu bestimmen. Das Programm analysiert dazu die Mittelpunktskoordinaten der beiden detektierten Partikel sowie die zugehörigen Zeitangaben, die mit Hilfe des im vorherigen Abschnitt 3.1.4 vorgestellten Messprogramms aufgenommen wurden.

Um direkt die von der  $45^\circ$  gedrehten Kreuzkorrelation detektierten Mittelpunktsdaten verwenden zu können, werden die berechneten Kräfte und Abstände auf die Kolloidmittlepunktverbindungsline bezogen. Dadurch werden auch Artefakte ausgeschlossen, die darauf beruhen, dass die  $x$ -Achse der Kamera und die  $x$ -Fahrriichtung des Piezotisches nicht vollständig übereinstimmen<sup>30</sup>.

Zunächst werden die gespeicherten Dateien in das Auswerteprogramm eingelesen. Die Koordinaten der Kolloide sind mit  $(x^{\text{OT}}, y^{\text{OT}})$  bzw. mit  $(x^{\text{MP}}, y^{\text{MP}})$  gegeben. Die Position der optischen Falle  $(x_0^{\text{OT}}, y_0^{\text{OT}})$  wird anhand der ersten 100 Bilder des gefangenen Kolloids bestimmt. Durch die Kenntnis der Fallensteifigkeit  $k_{\text{Falle}}$ , des Abbildungsmaßstabes sowie des Kolloiddurchmessers  $D_0$  kann mit Hilfe von Gl. 3.6 die Kraft-Abstandsbeziehung berechnet werden:

$$F(x)[\text{pN}] = \left[ |x^{\text{OT}} - x_0^{\text{OT}} - x^{\text{MP}}| [\text{Pixel}] \cdot 13,25 \text{ nm/Pixel} - D_0 [\text{nm}] \right] \cdot k_{\text{Falle}} [\text{pN/nm}]. \quad (3.7)$$

<sup>30</sup>Im Fall des hier verwendeten Aufbaus beträgt der Winkel zwischen Kameraachse und Piezotischachse  $\alpha \approx 6,5^\circ$ .



**Abbildung 3.8:** (a) Die Abbildung zeigt eine gemessene Kraft-Zeitkurve  $F(t)$  (schwarze Symbole). Das lokale Minimum dieser Kurve entspricht der Abrisskraft  $F_{\text{Abriss}}$  zum Zeitpunkt  $t_{\text{Abriss}}$ . Um sicherzustellen, dass ein Abriss stattgefunden hat, muss gelten:  $|\Delta F_{\text{Test}}| > |F_{\text{Abriss}}|/4$ . Die Belastungsrate  $\dot{F}$  ergibt sich aus einer linearen Datenanpassung des Kurvenverlaufs vor dem Abriss. (b) Kraft-Abstandskurve  $F(x)$  mit einem einzelnen Abrissereignis (schwarze Quadrate) sowie einer Mehrfachbindung (offene blaue Quadrate), berechnet nach Gl. 3.7.

Hierbei wird vorausgesetzt, dass der Durchmesser aller verwendeten Mikropartikel identisch und konstant ist (vgl. Abschnitt 3.2.2). Alternativ kann die berechnete Kraft auch in Abhängigkeit des Zeitstempels bestimmt werden. Die Berechnung erfolgt erneut über Gl. 3.6, nur dass in diesem Fall die den einzelnen Positionskoordinaten zugeordneten Zeiten  $t$  als  $x$ -Achse dienen. Abb. 3.8 (a) zeigt den zeitlichen Verlauf einer Abrisskurve  $F(t)$ . Zur Bestimmung des Abrisszeitpunktes  $t_{\text{Abriss}}$  bzw. der Abrisskraft  $F_{\text{Abriss}}$  wird  $F(t)$  mit dem Verfahren des gleitenden Durchschnittes über  $N$  Punkte geglättet<sup>31</sup>, wodurch fluktuationsbedingte Ausschläge abgeschwächt werden. Anhand dieser geglätteten Daten wird zunächst eine Grobbestimmung des Minimums durchgeführt. Dazu muss die Kraft-Zeitkurve im Bereich von drei Messpunkten um die Extremstelle monoton fallend bzw. monoton steigend sein. Zusätzlich wird ein Kraftschwellwert von  $F_{\text{Schwell}} = -1,5 \text{ pN}$  definiert, welcher am Minimum unterschritten werden muss. Anschließend erfolgt die exakte Lokalisation der Abrissstelle anhand der Originaldaten im Bereich von  $N/2$  Datenpunkten um das Minimum der geglätteten Kurve. Dazu werden dieselben Kriterien - wie oben beschrieben - mit dem Unterschied verwendet, dass der Kraftschwellwert auf  $-2 \text{ pN}$  geändert wurde. Zusätzlich wird die Differenz zwischen der Kraft an der Stelle des Abrisses und dem Wert zwei Datenpunkte danach ( $\Delta F_{\text{Test}}$ ) bestimmt. Um sicherzustellen, dass ein Abriss gefunden wurde, muss folgendes Kriterium erfüllt sein:  $|\Delta F_{\text{Test}}| > |F_{\text{Abriss}}|/4$  [65]. Ist dies der Fall, wird die Abrisskraft  $F_{\text{Abriss}}$  abgespeichert. Weiterhin wird auch die Belastungsrate  $\dot{F}$  ermittelt. Dazu wird der Anstieg von  $F(t)$  mittels der 35 Datenpunkte vor dem Minimum mit einer linearen Regression bestimmt und ebenfalls gesichert.

Mehrfachbindungen, wie sie in Abb. 3.8 (b) dargestellt sind, weisen mehr als eine Abrisskraft ( $F_{\text{Abriss},1}$ ,  $F_{\text{Abriss},2}$ ) auf. Um diese automatisch auszusortieren, wird ein bestimmtes Zeitintervall zwischen zwei Extremstellen festgelegt. Wird dieses unterschritten, werden die Abrisskräfte verworfen.

<sup>31</sup>In dieser Arbeit wurde  $N = 10$  gesetzt.

### 3.1.7 Eliminierung von Mehrfachbindungen

Die in Abschnitt 2.1.2.4 hergeleiteten Gleichungen zur Bestimmung der Bindungsparameter von Rezeptor-Ligand-Bindungen nehmen an, dass pro Wechselwirkung nur ein Rezeptor und ein Ligand beteiligt ist. Aufgrund des begrenzten Krümmungsradius der verwendeten Mikropartikel ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehr Rezeptor-Ligand-Paare gleichzeitig miteinander interagieren, jedoch nicht zu vernachlässigen. Eine Möglichkeit, Einzelabbrisse zu gewährleisten, ist die Reduktion der auf den Kolloidoberflächen verankerten Moleküle. Das experimentelle Vorgehen dafür wird in Abschnitt 3.2.3.1 genauer beschrieben.

Ein anderer Weg zur Detektion von Mehrfachbindungen besteht anhand der aufgezeichneten Kraft-Abstandskurven (vgl. Abb. 3.8 (b)). Darin stellen sich multiple Bindungen durch mehrere Abrissereignisse dar, so dass sie mit Hilfe der automatischen Auswertungsroutine aussortiert werden können. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass mehrere Bindungen gleichzeitig<sup>32</sup> dissoziieren, so dass sie anhand der Kraft-Abstandsbeziehung als Einzelbindungen identifiziert werden. Dies hat zur Folge, dass die Abrisskraft zu deutlich größeren Werten verschoben ist, als das für nur ein wechselwirkendes Rezeptor-Ligand-Paar der Fall ist. Aufgrund dieser Tatsache ist es gängige Praxis, in kraftspektroskopischen Messungen die größten Abrisskräfte aus dem Abrisskraft-Histogramm zu löschen und nicht mit in die weitere Analyse einzubeziehen [137]. Die Anzahl der ausgegrenzten Daten ist hierbei nicht willkürlich gewählt, sondern kann in Abhängigkeit der experimentellen Ausbeute berechnet werden. Unter der Annahme einer Poisson-Verteilung kann die Wahrscheinlichkeit solcher nicht detektierten Mehrfachbindungen mit folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$P_{\text{Mehrfach}} = 1 - \left( \frac{1}{\rho_{\text{tot}}} - 1 \right) \ln \left( \frac{1}{1 - \rho_{\text{tot}}} \right), \quad (3.8)$$

wobei  $P_{\text{Mehrfach}}$  die Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachbindung und  $\rho_{\text{tot}}$  die experimentelle Ausbeute darstellt [138, 139]. Das Vorgehen soll an nachfolgendem Beispiel kurz erläutert werden: In einem Kraftspektroskopieexperiment werden 1000 Kraft-Abstandskurven aufgenommen, aus denen zirka 180 vermeintliche Einzelbindungen hervorgehen<sup>33</sup>. Damit ergibt sich die experimentelle Ausbeute zu  $\rho_{\text{tot}} = 0,18$ , die Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachbindung zu  $P_{\text{Mehrfach}} = 0,096$  und die Anzahl von Dissoziationsereignissen, die wahrscheinlich Mehrfachbindungen sind, zu  $0,096 \cdot 180 \approx 17$ . Dadurch werden die 17 größten Abrisskräfte aus der Datenanalyse ausgeschlossen.

<sup>32</sup>Aufgrund der begrenzten Zeitauflösung des verwendeten Aufbaus von  $\Delta t \approx 17$  ms werden Mehrfachbindungen, die innerhalb einer Zeitspanne  $t < \Delta t$  dissoziieren, als Einzelbindungen detektiert.

<sup>33</sup>Dies entspricht einer in den hier durchgeführten Experimenten typischen Bindungshäufigkeit von  $h_B \approx 18\%$  (vgl. Abschnitt 4.1.1).

### 3.1.8 Fehlerrechnung für die Bindungsparameter $\tau_0$ , $x_{ts}$ und $\Delta G$ im Rahmen des DHS-Modelles<sup>34</sup>

Das Resultat aus den kraftspektroskopischen Messungen aus Abschnitt 4.1 und 4.2 sind u.a. Abrisskrafthistogramme, aus denen mit Hilfe des DHS-Modells die Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  bestimmt werden. Da die Berechnung dieser Werte durch viele Parameter im Experiment sowie der Datenauswertung beeinflusst wird, ist die Fehlerberechnung über die Fehlerfortpflanzung nicht trivial und wird deshalb mit Hilfe einer Computersimulationsanalyse auf Basis der jeweiligen Messergebnisse durchgeführt. Im Folgenden soll das Prinzip dieser Fehlerbestimmung skizziert werden.

Ausgangspunkt zur Bestimmung der Bindungsparameter sind die Abrisskräfte, die aus den Kraft-Abstandskurven extrahiert werden. Deren exakte Bestimmung unterliegt jedoch der begrenzten Genauigkeit des verwendeten Positionsdetektionsalgorithmus. Dieser ermöglicht eine laterale Auflösung von  $\pm 2$  nm (vgl. Abschnitt 3.1.2.1). Zusammen mit einer typischen Kraftkonstante von  $k_{\text{Falle}} \approx 0,09$  pN/nm ergibt sich daraus eine Messunsicherheit von  $\pm 0,18$  pN. Weiterhin kann der genaue Zeitpunkt, an dem die Bindung bricht, nur mit einer Genauigkeit von  $\dot{F}\Delta t/2$  bestimmt werden. Für eine Belastungsrate  $\dot{F} = 56$  pN/s und einer zeitlichen Auflösung  $\Delta t = 17$  ms ergibt sich eine zusätzliche Unsicherheit von  $\pm 0,48$  pN. Damit summiert sich der Messfehler, mit dem die Abrisskräfte bestimmt werden können, auf zu:  $\pm 0,7$  pN. Dieser Fehler pflanzt sich in der sich anschließenden Datenanalyse jedoch noch weiter fort, da diese die Einteilung der Abrisskräfte in Klassen (Abrisskrafthistogramme), eine Summierung über diese (Berechnung der diskreten Funktion  $\tau(F)$ ) (vgl. Abschnitt 2.1.2.4) sowie die Datenanpassung über einen Levenberg-Marquardt-Algorithmus (Anpassung der kraftabhängigen Lebensdauer mit  $\tau_{\text{DHS}}(F)$ ) (vgl. Gl. 2.30) beinhaltet. Um die Messunsicherheit abzuschätzen, wird aus den bestimmten Bindungsparametern für die verschiedenen Energielandschaften  $\nu$  jeweils eine theoretische Abrisskraftverteilung unter Verwendung von Gl. 2.31 berechnet. Diese wird anschließend in ein Abrisskrafthistogramm umgewandelt. Die Anzahl und Breite der Klassen richtet sich dabei nach den Werten aus den experimentell gewonnenen Histogrammen. Im nächsten Schritt wird zur Häufigkeitsdichte einer jeden Klasse ein gaußsches Rauschen mit verschwindendem Mittelwert addiert. Die Varianz wird zu  $0,7$  pN gewählt, entsprechend der oben hergeleiteten Messunsicherheit der bestimmten Abrisskräfte. Das daraus entstehende verrauschte Histogramm wird in die diskrete Funktion  $\tau(F)$  umgewandelt, mit dem DHS-Modell (vgl. Gl. 2.30) angepasst und die Bindungsparameter bestimmt (analog zur Auswertung der experimentellen Daten). Dieser Vorgang wird 10000-fach wiederholt. Daraus ergibt sich eine Gaußverteilung der Parameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  mit entsprechender Varianz. Diese charakterisiert die Fortpflanzung der statistischen Unsicherheit aus der Messung sowie der Datenanalyse und wird im Folgenden als Fehler der Bindungsparameter im Rahmen des DHS-Modells dargestellt.

<sup>34</sup>Das hier beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Messunsicherheiten der Bindungsparameter orientiert sich an der Prozedur aus [53].

### 3.1.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, die es ermöglicht, intakte Zellen quantitativ zu vermessen, sie auf molekularer Ebene zu charakterisieren und sie nach bestimmten Parametern wie Größe und Form zu sortieren [140, 141]. Werden die Zellen im Vorfeld einer solchen Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wird das Sortier- und Analysierverfahren als FACS (englisch: *fluorescence-activated cell sorting*) bezeichnet. Neben Zellen lassen sich auch andere Objekte, wie fluoreszierende, Mikrometer-große Partikel, anhand ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden und in verschiedene Fraktionen aufteilen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert dabei auf der Analyse von Streu- und Fluoreszenzlicht, wenn die zu untersuchenden Proben einen Laserfokus durchlaufen. Zu Beginn des Experimentes wird eine Mischung aus Zellen oder Kolloiden in eine mit PBS gefüllte Küvette gegeben (vgl. Abb. 3.9). Ein Hüllstrom (englisch: *sheath fluid*) leitet diese Objekte, die eine Größe von  $0,2 - 20 \mu\text{m}$  haben dürfen, zum Messpunkt, an dem ein Laser den Probenstrom durchleuchtet. Abhängig von der Fließgeschwindigkeit können dabei 200 bis 2000 Zellen oder Kolloide pro Sekunde einzeln untersucht werden. Die benutzte Laserwellenlänge wird entsprechend der Anregungswellenlänge des verwendeten Farbstoffs gewählt. Beim Durchlauf der Proben durch den Laserfokus wird die Lichtstreuung parallel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (englisch: *forward scatter, FSC*) und die Lichtstreuung im Winkel von  $90^\circ$  als Seitwärtsstreulicht (englisch: *side scatter, SSC*) aufgenommen [141]. Das FSC-Signal enthält Informationen über die Zell- bzw. Partikelgröße und das seitwärts gestreute Licht über die Granularität der untersuchten Objekte. Die Emissionsspektren der Farbstoffanregung (FITC, FL2) werden ebenfalls in einem Winkel von  $90^\circ$  durch Bandpassfilter und Farbteilspiegel auf Photomultiplier (englisch: *photomultiplier tube, PMT*) geleitet und anschließend aufgezeichnet. Die Kanäle FITC und FL2 detektieren dabei bestimmte Wellenlängen aus dem Emissionsspektrum. Nachdem der Messpunkt durchlaufen wurde, werden die Zellen oder Partikel durch eine oszillierende Spitze geführt, die den Hüllstrom in einzelne Tropfen zerteilt. Diese enthalten jeweils nur eine Zelle oder einen Partikel. Entsprechend eines manuell festgelegten Schwellwertes, der sich nach einer bestimmten Objektgröße und/oder Fluoreszenzintensität richtet, werden Tropfen, deren Messwert oberhalb des Schwellwertes liegt, negativ geladen und anschließend durch einen Kondensator geführt. Dieser bewirkt entsprechend der Tropfenladung eine Aufspaltung in zwei oder mehrere Fraktionen. Für eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus sowie der Funktionsweise eines Durchflusszytometers wird auf die Literatur verwiesen [141].

Die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Messungen wurden am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung Leipzig (IZKF, Core Unit: Fluoreszenz Technologien) durchgeführt. Dabei wurde ein FACSVantage SE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) Durchflusszytometer verwendet. Der benutzte Detektionslaser besaß eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488 \text{ nm}$ . Die Fluoreszenzkanäle FITC und FL2-H detektierten in diesem Fall Emissionswellenlängen von  $\lambda = 520 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda = 580 \text{ nm}$ . Die Küvetten spitze hatte einen Durchmesser von  $D = 50 \mu\text{m}$  und oszillierte mit einer Frequenz von  $f = 47,8 \text{ kHz}$ . Kriterien zur Festlegung des Sortierschwellwertes waren die Partikelgröße sowie die gemessene Fluoreszenzintensität an Kanal FITC.

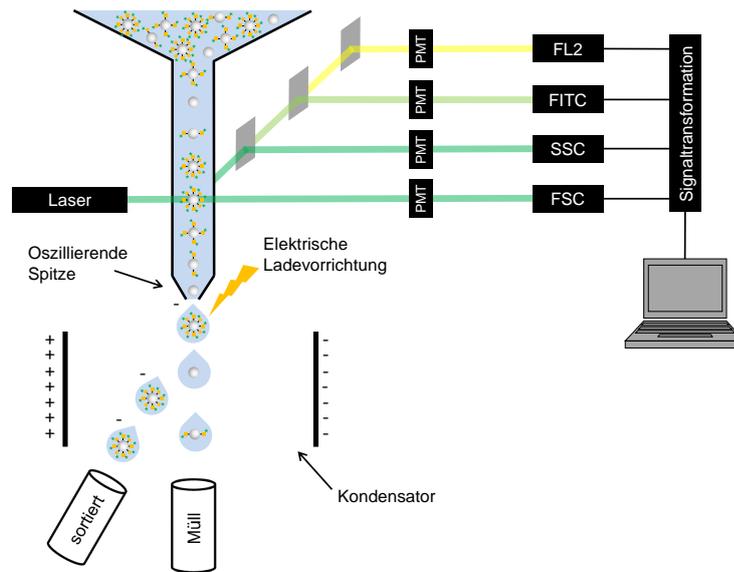


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines Durchflusszytometers.

## 3.2 Probenpräparation und Kontrollexperimente

### 3.2.1 Herstellung der Tau-Peptide und ihrer phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Tau-Peptide wurden von Dr. D. Singer und Dr. D. Knappe (Arbeitsgruppe Bioanalytik, Prof. Dr. R. Hoffmann, BBZ Leipzig) mittels Festphasen-Peptidsynthese (englisch: *solid-phase peptide synthesis, SPPS*) hergestellt. Das entsprechende Protokoll wurde in Singer *et al.* [127] publiziert. Die Peptide beinhalten die Aminosäuren 226 – 240, bezogen auf die längste humane Isoform des Tau-Proteins. Alle verwendeten Tau-Peptide wurden N-terminal mit einem Cysteinrest<sup>35</sup> verlängert und mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: *reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC*) aufgereinigt. Der Reinheitsgrad wurde anschließend durch Massenspektrometrie (englisch: *matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometer, MALDI-TOF-MS*) überprüft. Zur Durchführung des Alanin-Scans (vgl. Abschnitt 4.1) wurde als Ausgangspunkt das doppelt-phosphorylierte Peptid Tau[pThr231/pSer235]<sup>36</sup> verwendet. Aus diesem wurden durch sukzessives Austauschen der Aminosäuren 231 – 237 gegen ein Alanin insgesamt 7 Peptid-Isoformen hergestellt. Das monophosphorylierte, fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[F1-pThr231]<sup>37</sup> (vgl. Abschnitt 4.2) wurde ebenfalls mittels SPPS hergestellt, das verwendete Syntheseprotokoll jedoch im Vergleich zu

<sup>35</sup>Der Cysteinrest wird für kovalente Kopplung zwischen Kolloidoberfläche und Peptid benötigt. In der Koppelungsreaktion reagiert die Thiolgruppe des Cysteinrests mit der Maleimid-Gruppe der funktionalisierten Mikropartikel (vgl. Abschnitt 3.2.2.1).

<sup>36</sup>Aminosäuresequenz: Val-Ala-Val-Val-Arg-**pThr**-Pro-Pro-Lys-**pSer**-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys

<sup>37</sup>Aminosäuresequenz: Val-Ala-Val-Val-Arg-**pThr**-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys

dem oben genannten modifiziert und in Stangner *et al.* [142] veröffentlicht.

Die monoklonalen Antikörper HPT-101 und HPT-104 wurden von Dr. D. Singer zur Verfügung gestellt. Die Affinität beider Antikörper gegenüber ihrem Zielepitop wurde anhand von ELISA und Western Blot überprüft (vgl. Abschnitt 2.2.1.4, Tab. 2.2 und Abb. 2.10).

### 3.2.2 Kolloidchemie

Zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit Optischen Pinzetten war es notwendig, die Biomoleküle auf Mikrometer-großen Partikeln zu fixieren. Insbesondere musste bei der Wahl des Immobilisierungsverfahrens darauf geachtet werden, dass die Bindung zwischen Substrat und Biomolekül deutlich stärker war als die zu untersuchende zwischen Peptid und Antikörper. Ist die Befestigung unzureichend, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Moleküle von den Kolloidoberflächen lösen. Diese unspezifischen Bindungsdissoziationen können nicht von den spezifischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen unterschieden werden, wodurch sie möglichst vermieden werden müssen. Deswegen wird zu einer kovalenten Bindung zwischen Kolloid und Rezeptor/Ligand geraten [72]. Zur Probenpräparation wurden Mikropartikel (microparticles GmbH, Berlin, Deutschland) mit verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen verwendet, die in Lösung (10% Masse/Volumen (m/v) in wässriger Suspension) vorlagen. Tab. 3.1 zeigt eine Übersicht über die Eigenschaften und Einsatzgebiete der entsprechenden Kolloide, die zur Beschichtung mit den Biomolekülen verwendet wurden. Die Mengen an Tau-Peptid und Antikörper HPT-X für die einzelnen Präparationen sind ebenfalls in Tab. 3.1 aufgelistet. Die Präparationsprotokolle orientieren sich an der Vorlage aus Referenz [143]. Eine Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Chemikalien ist in Anhang A.2 gegeben. Bei gekühlter Lagerung können die beschichteten Partikel bis zu einer Woche nach ihrer Präparation für Messungen verwendet werden.

**Tabelle 3.1:** Überblick über die in der Präparation zum Einsatz kommenden Materialien, sowie deren Eigenschaften, Mengenangaben und Konzentrationen. Alle verwendeten Kolloide wurden von microparticles GmbH (Berlin, Deutschland) gekauft und in einer 10 % Masse/Volumen (m/v) wässrigen Suspension geliefert. Die ProtG-MF-Partikel haben nach der entsprechenden Präparation eine Konzentration von  $\approx 5\%$  m/v.

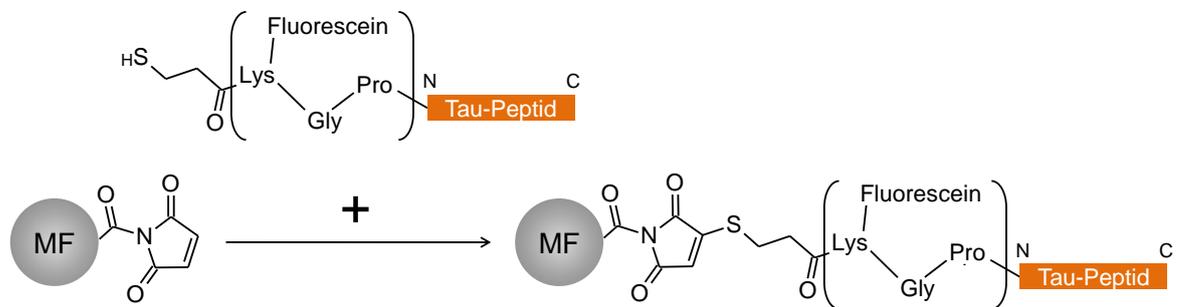
		Alanin-Scan		Fluoreszenz-Messungen			
		Tau-Peptid	Prot G	HPPT-101	Tau-Peptid	Prot G	HPPT-104
<b>Material</b>		Melaminharz (MF) $[C_5H_8N_6]_n[C_4H_2NO_2]_m$		Melaminharz (MF) $[C_5H_8N_6]_n[C_4H_2NO_2]_m$			
<b>Partikel</b>	<b>Durchmesser <math>D_0</math></b>	2,23(4) $\mu\text{m}$		2,31(5) $\mu\text{m}$			
<b>Oberflächen-</b>	Maleimid-	Carboxyl-	COOH-	Maleimid-	Carboxyl-	COOH-	
<b>funktionali-</b>	gruppen	gruppen	ProtG	gruppen	gruppen	ProtG	
<b>sierung</b>	$(C_4H_3NO_2)$	$(COOH)$		$(C_4H_3NO_2)$	$(COOH)$		
<b>Lösungsmittel</b>	$H_2O^a$ oder NaPh-Puffer <sup>b</sup>	PBS	PBS	$H_2O^a$ oder NaPh-Puffer <sup>b</sup>	PBS	PBS	
<b>Proben</b>	<b>Konzentration</b> [mg/mL]	1	1	1,3	1	1	2,1
	<b>Menge</b> [ $\mu\text{L}$ ]	1,8	6,5	2	2,9	7,5	4

<sup>a</sup>Hierbei wurde Reinstwasser (elektrischer Leitungswiderstand  $\sigma = 18,2\text{M}\Omega$  bei  $25^\circ$ ) zur Verdünnung des Peptides verwendet.

<sup>b</sup>NaPh steht in diesem Fall für den Phosphat-Puffer. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist in Anhang A.2 beschrieben.

### 3.2.2.1 Beschichtung von Melaminharz-Partikeln mit Tau-Peptiden

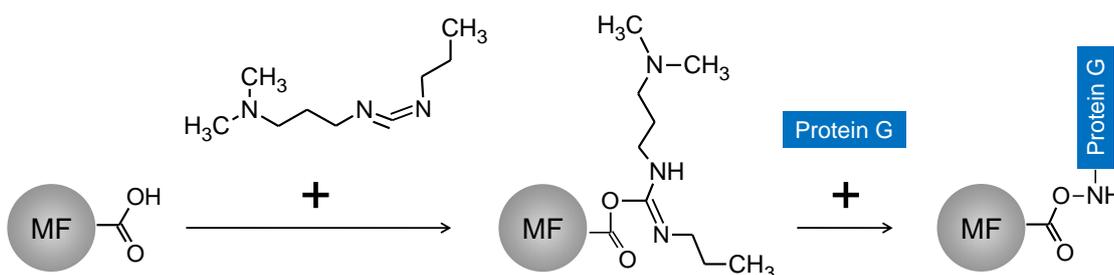
1. Peptid-Menge  $V_{\text{Peptid}}$  (vgl. Tab. 3.1) mit einem Äquivalent TCEP für 10 min inkubieren
2. 25  $\mu\text{L}$  Kolloidlösung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
3. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer (pH 7) aufnehmen
4. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
5. Pellet in 50  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer (pH 7) aufnehmen und mit entsprechender Peptid-TCEP-Menge vermischen
5. 45 min bei Raumtemperatur (RT) und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
6. Kolloid-Peptid-Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
7. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Cystein-Phosphat-Puffer (pH 7) aufnehmen
8. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
9. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  L-Cystein-Phosphat-Puffer (pH 7) aufnehmen
10. 45 min bei Raumtemperatur (RT) und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
11. Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$



**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung des Beschichtungsverfahrens von Melaminharz-(MF)-Partikeln mit Tau-Peptiden. Die Kolloide wurden mit einer Maleimidgruppe oberflächenfunktionalisiert. Die Tau-Peptide wurden N-terminal um ein Cystein verlängert und über eine Thiolgruppe auf den Kolloiden immobilisiert. Im Fall der fluoreszenzmarkierten Peptide wurden diese N-terminal um folgende Sequenz verlängert: Cys–Lys[5(6)–Carboxyfluorescein]–Gly–Pro. Die Kopplungschemie bleibt jedoch unverändert.

3.2.2.2 Beschichtung von Melaminharz-Partikeln mit Protein G<sup>38</sup>

1. 25  $\mu\text{L}$  Kolloidlösung (vgl. Tab. 3.1) bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
2. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Carbonat-Puffer (pH 9,6) aufnehmen
3. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
4. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer (pH 4,5) aufnehmen
5. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
6. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer (pH 4,5) aufnehmen und mit 100  $\mu\text{L}$  EDC-HCl-Phosphat-Puffer (pH 4,5) aktivieren
7. 4 h bei RT und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
8. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
9. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer (pH 4,5) aufnehmen
10. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
11. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Borat-Puffer (pH 8,5) aufnehmen
12. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
13. Pellet in 50  $\mu\text{L}$  Borat-Puffer (pH 8,5) aufnehmen und mit entsprechender Menge Protein G  $V_{\text{Prot G}}$  (vgl. Tab. 3.1) vermischen
14. über Nacht bei RT und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
15. Kolloid-Protein-Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
16. Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Glycin-Puffer (pH 8) aufnehmen
17. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
18. Pellet in 50  $\mu\text{L}$  Glycin-Puffer (pH 8) aufnehmen
19. Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$

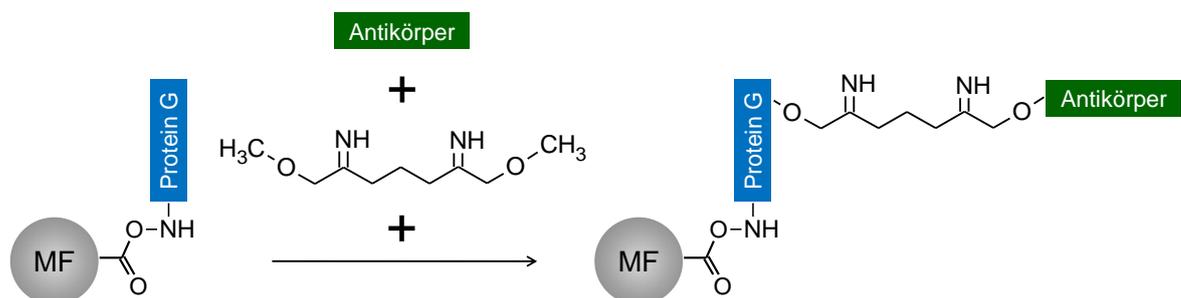


**Abbildung 3.11:** Schematische Darstellung des Beschichtungsverfahrens von carboxylierten MF-Partikeln mit Protein G. Die  $\text{COOH}$ -funktionalisierten Kolloide werden im Laufe der Präparation mittels EDC-HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid) aktiviert und anschließend mit Protein G inkubiert.

<sup>38</sup>Aus *Streptococcus sp.* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

### 3.2.2.3 Beschichtung von Melaminharz-ProtG-Partikeln mit monoklonalen Antikörpern

1. 25  $\mu\text{L}$  ProtG-Kolloidlösung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
2. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Kopplungspuffer (pH 5) aufnehmen
3. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
4. Pellet in 25  $\mu\text{L}$  Kopplungspuffer (pH 5) aufnehmen und mit entsprechender Menge HPT-X ( $V_{\text{HPT-X}}$ ) (vgl. Tab. 3.1) vermischen
5. 45 min bei Raumtemperatur (RT) und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
6. Kolloid-Antikörper-Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
7. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Kopplungspuffer (pH 5) aufnehmen
8. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
9. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Vernetzungspuffer (pH 8,2) aufnehmen
10. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
11. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  DMP-Vernetzungspuffer (pH 8,2) aktivieren
12. 30 min bei RT und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
13. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
14. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  TRIS-HCl-Puffer (pH 7,5) aufnehmen
15. 15 min bei RT und 600 Upm im Thermomixer inkubieren
16. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
17. Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Lagerungspuffer (pH 7,4) aufnehmen
18. Mischung bei  $7000 \times g$  abzentrifugieren und Überstand verwerfen
19. Pellet in 25  $\mu\text{L}$  Lagerungspuffer (pH 7,4) aufnehmen
20. Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$



**Abbildung 3.12:** Kovalente Vernetzung von MF-ProtG-Partikeln und monoklonalen Antikörpern. Als Verbindungsstück zwischen beiden Proteinen kommt das bifunktionale DMP (Dimethylpimelimidat Dihydrochlorid) zum Einsatz, welches jeweils mit den freien Aminogruppen der Moleküle reagiert. Der Antikörper wird dabei so ausgerichtet, dass seine Bindungsdomäne vom Kolloid weg zeigt.

### 3.2.3 Kontrollexperimente

#### 3.2.3.1 Hintergrundmessungen

Da es sich bei biologischen Bindungen um schwache nicht-kovalente Interaktionen handelt (vgl. Abschnitt 2.1.2), muss überprüft werden, ob diese spezifischen Wechselwirkungen nicht beispielsweise durch die elektrostatischen Potentiale der Kolloide überlagert werden. Weiterhin können auch Interaktionen zwischen dem Tau-Peptid und Protein G auftreten, die die gemessenen Abrisskraft-histogramme verfälschen. Solche unspezifischen Bindungen werden im Folgenden als Hintergrundinteraktionen bezeichnet. Zur ihrer Abschätzung werden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen diese Wechselwirkungen gemessen und quantifiziert werden.

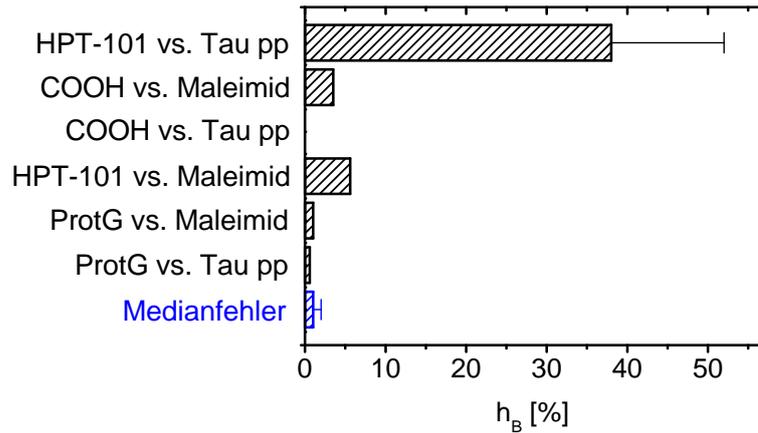
Abb. 3.13 zeigt die Bestimmung des Hintergrundes am Beispiel der Wechselwirkung zwischen dem monoklonalen Antikörper HPT-101 und dem doppelt-phosphorylierten Peptid Tau<sup>Iso</sup>[Ser237]<sup>39</sup>. Dazu werden die Interaktionen zwischen den blanken (COOH vs. Maleimid), den carboxylierten und Tau-Peptid-beschichteten (COOH vs. Tau pp), den Antikörper beschichteten und blanken (HPT-101 vs. Maleimid), den Protein G beschichteten und blanken (ProtG vs. Maleimid) sowie den Prot G beschichteten und Tau-Peptid beschichteten Kolloiden (ProtG vs. Tau pp) untersucht. Pro Kombination werden fünf verschiedene Kolloidpaare untersucht, aus denen mindestens 150 Kraft-Abstandskurven hervorgingen. Nach der Bestimmung der jeweiligen Bindungshäufigkeiten, ergibt sich eine Medianbindungshäufigkeit für die Hintergrundwechselwirkungen von  $h_{B,Median} = 2\%$ . Im Vergleich zur Bindungshäufigkeit der spezifischen Wechselwirkung zwischen HPT-101 und Tau<sup>Iso</sup>[Ser237] ( $h_{B,Tau} = 38(14)\%$ ) (vgl. Abschnitt 4.1) kann diese jedoch vernachlässigt werden. Somit ist sichergestellt, dass der Großteil der detektierten Bindungen einen spezifischen Ursprung hat.

#### 3.2.3.2 Bestimmung der optimalen Oberflächenbeladung

Neben der Bestimmung der Hintergrundwechselwirkungen muss auch sichergestellt werden, dass die gemessenen Bindungsdissoziationen Einzelbindungen sind. Mehrfachbindungen müssen vermieden werden, da die Datenauswertung andernfalls nicht mit den in Abschnitt 2.1.2.4 hergeleiteten Gleichungen durchgeführt werden kann. In Abschnitt 3.1.7 wurde bereits eine theoretische Herangehensweise beschrieben, um Mehrfachbindungen nachträglich aus den Abrisskraft-histogrammen zu eliminieren. Zusätzlich kann auch experimentell die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachbindungen reduziert werden. Dies geschieht über die Reduktion der auf den Kolloidoberflächen verankerten Moleküle bzw. der Oberflächenbeladung  $\Sigma$ <sup>40</sup>. Zur Bestimmung der optimalen Beladungsdichte werden mehrere Präparationsansätze verwendet, in

<sup>39</sup>Bei diesem Peptid wird innerhalb des doppelt-phosphorylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235] die Aminosäure Ser237 durch ein Alanin ausgetauscht. Für genauere Informationen siehe Abschnitt 4.1.

<sup>40</sup>Die Oberflächenbeladung ist definiert als der Quotient aus Anzahl von Biomolekülen  $N$  pro Flächeneinheit  $A$ :  $\Sigma[\text{nm}^{-2}] = N/A$ .



**Abbildung 3.13:** Kontrollexperimente zur Bestimmung der Hintergrundwechselwirkungen, verursacht durch unspezifische Interaktionen zwischen den geladenen Kolloidoberflächen und den Biomolekülen. Das Ergebnis dieser Messungen ist beispielhaft für den mAk HPT-101 und das doppelt-phosphorylierte Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$  dargestellt. Zur Bestimmung der Bindungshäufigkeit  $h_B$  werden pro Kombination mindestens 150 Kraft-Abstandskurven aufgenommen, die detektierten Bindungsereignisse gezählt und durch die Versuchsanzahl geteilt. Die Beschriftung ist wie folgt zu verstehen: COOH  $\hat{=}$  blanke carboxylierte Kolloide; Maleimid  $\hat{=}$  blanke Maleimid-funktionalisierte Kolloide; Tau pp  $\hat{=}$   $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$ -Maleimid-Kolloide; HPT-101  $\hat{=}$  HPT-101-ProtG-COOH-Kolloide; ProtG  $\hat{=}$  ProtG-COOH-Kolloide. Insgesamt ergibt sich ein Medianwert für die Hintergrundwechselwirkungen (blau) zu  $h_{B,\text{Median}} = 2\%$  und ist damit im Vergleich zur spezifischen Bindungshäufigkeit zwischen HPT-101 und  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$   $h_{B,\text{Tau}} = 38(14)\%$  vernachlässigbar.

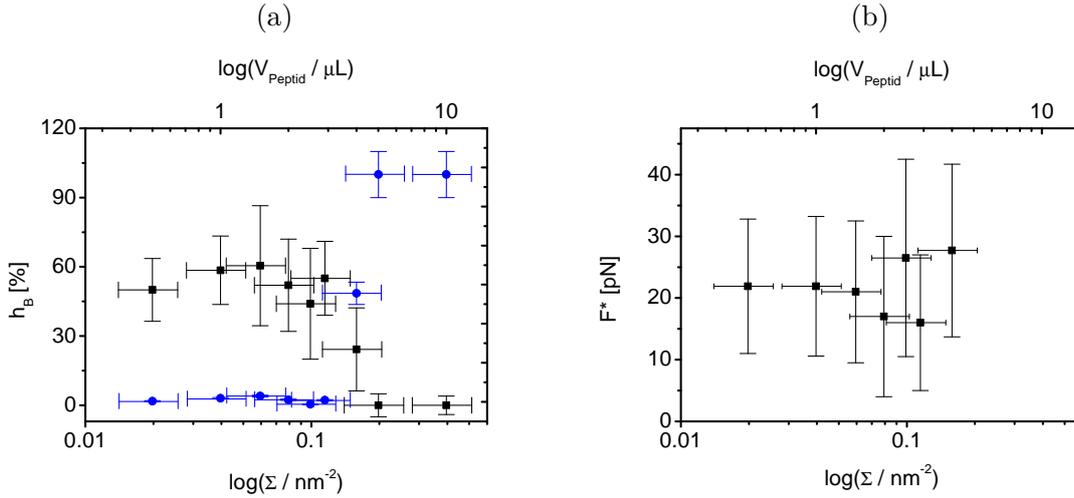
denen die Menge an zugegebener Peptidlösung  $V_{\text{Peptid}}$  sukzessiv erhöht wird. Es wird angenommen, dass die Oberflächenbeladung proportional mit der Tau-Peptid-Menge steigt. Diese Annahme ist jedoch nur gerechtfertigt solange keine Sättigung erreicht ist<sup>41</sup>. Bei Kenntnis der Peptidlösungskonzentration  $c_{\text{Peptid}}$ , der Peptidmasse  $m_{\text{Peptid}}$  und der Konzentration der Kolloidlösung  $c_{\text{Kolloid}}$  kann ein direkter Zusammenhang zwischen verwendeter Peptidmenge  $V_{\text{Peptid}}$  und resultierender Oberflächenbeladung  $\Sigma$  hergestellt werden:

$$\Sigma = \frac{c_{\text{Peptid}} V_{\text{Peptid}}}{\pi D_0^2 m_{\text{Peptid}} N_{\text{Kolloid}}}. \quad (3.9)$$

Dabei ist  $D_0$  der Kolloiddurchmesser. Es wird angenommen, dass bei den Waschschritten der Präparation keine Partikel verloren gehen, wodurch sich die Anzahl der in der Lösung verfügbaren Kolloide  $N_{\text{Kolloid}}$  verändern würde<sup>42</sup>. Abb. 3.14 zeigt die Bestimmung der optimalen Oberflächenbeladung am Beispiel der Wechselwirkung zwischen mAk HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid  $\text{Tau}[\text{FL-pThr231}]$ . Die Antikörpermenge wird während den verschiedenen Präparationen konstant bei  $V_{\text{mAk}} = 4 \mu\text{L}$  (vgl. Tab. 3.1) gehalten und die Peptid-Menge zwischen  $V_{\text{Peptid}} \in [0,5; 10] \mu\text{L}$  variiert. Dies entspricht einer Oberflächenbeladung von  $\Sigma \in [0,02; 0,4] \text{nm}^{-2}$ . Um Aussagen über das Auftreten von Einzel- und Mehrfachbindungen getrennt voneinander zu treffen, wurde für beide Fälle die jeweilige Bindungshäufigkeit  $h_B$  bestimmt. Die Vorgehensweise ist dabei analog zur Bestimmung der Hintergrundwech-

<sup>41</sup>Diese Problematik ist in Abschnitt 4.2.1 diskutiert.

<sup>42</sup>Diese Annahme ist eine Idealisierung, da mit jedem Waschschriff Kolloide, beispielsweise durch Entfernen des Überstandes, verloren gehen. Weiterhin bleiben Partikel bei Durchmischen der Reagenzlösung an der Pipettenspitze sowie an den Gefäßwänden kleben. Um letzteres zu minimieren, wurden für alle Präparationen speziell beschichtete *Protein LoBind Tubes* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 3.14:** Bestimmung der optimalen Oberflächenbeladung  $\Sigma$  am Beispiel der Wechselwirkung zwischen HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten, monophosphorylierten Peptid Tau[Fl-pThr231]. (a) Nach dem die Tau-Kolloide mit einer bestimmten Oberflächenbeladung hergestellt wurden, werden die Bindungshäufigkeiten  $h_B$  mit mAk HPT-104 bestimmt. Dazu werden pro Datenpunkt vier verschiedene Kolloidpaare untersucht, indem pro Paar 50 Kraft-Abstandskurven aufgenommen wurden. Es ist zu erkennen, dass die Einzelbindungshäufigkeit (schwarze Quadrate) bis zu einer Peptidmenge  $V_{\text{Peptid}} = 3 \mu\text{L}$  konstant bleibt und anschließend bis auf Null abfällt. Für die Bindungshäufigkeit der Mehrfachbindungen (blaue Kreise) ist ein gegenläufiger Trend zu beobachten. Diese treten für niedrige Oberflächenbeladungen nur vereinzelt, aber ab einer Peptidmenge  $V_{\text{Peptid}} = 4 \mu\text{L}$  verstärkt auf. Die optimale Menge an Peptid, die bei der Präparation hinzugegeben wird, liegt somit im Bereich  $V_{\text{Peptid}} \in [1, 3] \mu\text{L}$ . Die Antikörpermenge  $V_{\text{HPT-104}} = 4 \mu\text{L}$  wurde konstant gehalten. (b) Für die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  der Einzelbindungen ist ein ähnlicher Trend zu erkennen wie für deren Bindungshäufigkeit. Bis zu einer Peptidmenge  $V_{\text{Peptid}} = 3 \mu\text{L}$  bleibt diese nahezu konstant und beginnt dann zu steigen. Für große Oberflächenbeladungen ( $\Sigma > 0,2 \text{nm}^{-2}$ ) konnten keine Abrisskräfte mehr ermittelt werden. In diesen Fällen bildeten sich mehrere Bindungen aus, so dass die von der Optischen Pinzette ausgeübten Kräfte keine Bindungsdissoziationen herbeiführen konnten. Es soll erwähnt werden, dass sich der  $x$ -Fehler in (a) und (b) ausschließlich auf die Oberflächenbeladung  $\Sigma$  bezieht. Das verwendete Peptidvolumen  $V_{\text{Peptid}}$  kann viel genauer bestimmt werden.

selwirkungen, mit dem Unterschied, dass pro Datenpunkt nur vier Kolloidpaare untersucht werden. Daraus gehen pro Paar 50 Kraft-Abstandskurven hervor. Für die Einzelbindungshäufigkeit (vgl. Abb. 3.14 (a), schwarze Quadrate) ist zu erkennen, dass diese bis zu einer Oberflächenbeladung  $\Sigma \approx 0,12 \text{nm}^{-2}$  im Rahmen der Messgenauigkeit konstant bleibt. Innerhalb dieses Bereichs kommt es nur vereinzelt zu Mehrfachbindungen (Abb. 3.14 (a), blaue Kreise). Dieser Trend kehrt sich jedoch mit zunehmender Peptidmenge um, bis ab einem Wert von  $V_{\text{Peptid}} = 5 \mu\text{L}$  fast ausschließlich Mehrfachbindungen auftreten. Abb. 3.14 (b) zeigt die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  (vgl. Abschnitt 2.1.2.3) für die entsprechenden Oberflächenbeladungen. Erneut wird beobachtet, dass die Abrisskraft für niedrige Peptidmengen konstant ist und ab einem bestimmten  $\Sigma = 0,12 \text{nm}^{-2}$  steigt. Für große Oberflächenbeladungen lassen sich mittels der Optischen Pinzette keine Bindungsdissoziationen erzwingen. Somit können auch keine wahrscheinlichsten Abrisskräfte angegeben werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich oberhalb einer bestimmten Oberflächenbeladung so viele Wechselwirkungspartner zur Verfügung stehen, dass sich mehrere Bindungen gleichzeitig ausbilden und die von der optischen Falle ausgeübten Kräfte nicht ausreichen, um kraftinduzierte Bindungsbrüche hervorzurufen. In diesem Zusammenhang soll hervorgehoben werden, dass sich der  $x$ -Fehler in Abb. 3.14 (a) und (b) ausschließlich auf die Oberflächenbeladung  $\Sigma$  bezieht,

da in deren Berechnung mehrere Annahmen gemacht werden mussten. Das Peptidvolumen  $V_{\text{Peptid}}$ , das während der Präparation zur Kolloidlösung hinzugefügt wird, kann deutlich genauer bestimmt werden. Es unterliegt nur der Ungenauigkeit der benutzten Mikropipetten, die mit  $\Delta V_{\text{Peptid}} = 1\%$  angegeben werden kann.

Aus diesen Betrachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die optimale Menge an Tau-Peptid-Lösung für die Kolloidpräparation zwischen  $V_{\text{Peptid}} \in [1, 3] \mu\text{L}$  liegt. Darunter treten zu große Schwankung in der Abnahme des entsprechenden Peptidvolumens<sup>43</sup> auf, wodurch eine reproduzierbare Präparation erschwert wird. Oberhalb dieses Bereiches treten vermehrt Mehrfachbindungen auf. Eine weiterführende Charakterisierung der Beladungsdichte kann in Abschnitt 4.2.1 gefunden werden.

---

<sup>43</sup>Dies liegt daran, dass die Pipetten, mit denen während der Präparation gearbeitet wird, nur eine begrenzte Genauigkeit besitzen (vgl. Text). Weiterhin kommt hinzu, dass sich bei der Abnahme der Peptidlösung an der Außenseite der Pipettenspitze ebenfalls Peptidmaterial anlagern kann und somit die der Präparation zugeführten Peptidmenge verfälscht. Diese Effekte können für Volumina  $V_{\text{Peptid}} \geq 1 \mu\text{L}$  vernachlässigt werden.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen mAk HPT-101 und Tau-Peptiden: Der Alanin-Scan

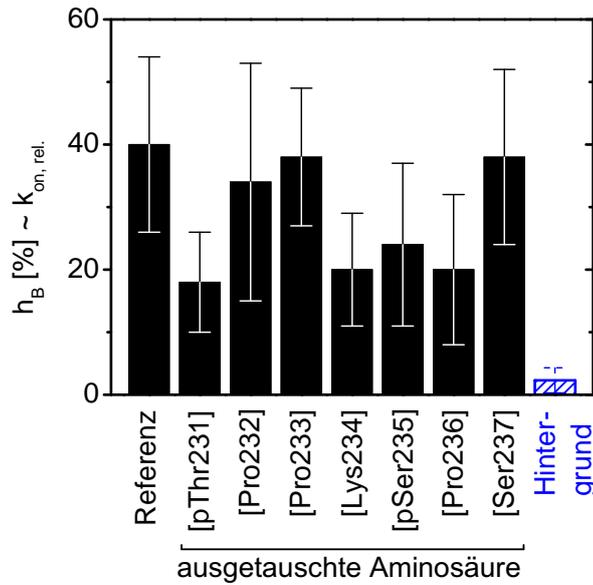
In diesem Abschnitt werden die Interaktionen zwischen dem monoklonalen, phosphorylierungsspezifischen Antikörper HPT-101 und dem doppelt-phosphorylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235] untersucht. Im Speziellen wird das Epitop von mAk HPT-101 auf Basis einzelner Peptidaminosäuren bestimmt. Dazu dient der sogenannte Alanin-Scan [144–147]. Dabei werden aus dem ursprünglichen Peptid Tau[pThr231/pSer235] mittels Substitution der Aminosäuren 231 – 237 durch ein Alanin insgesamt sieben Tau-Isoformen hergestellt (vgl. Abschnitt 2.2.1.4 und 3.2.1). Durch die kraftspektroskopische Untersuchung der Bindung zwischen mAk HPT-101 und diesen Isoformen kann der Einfluss einzelner Aminosäuren auf das Bindungsverhalten der Biomoleküle präzise untersucht werden. Ziel ist es, essentielle, sekundäre sowie nicht-essentielle Epitop-Aminosäuren zu definieren und objektive Kriterien zur Bestimmung dieser zu finden. Unter essentiellen Aminosäuren werden solche verstanden, die an der Bindung zwischen Peptid und Antikörper bedeutend beteiligt sind. Fehlen diese, wird keine oder nur eine schwache Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand beobachtet. Beim Austausch sekundärer Aminosäuren wird eine Bindung ausgebildet, diese ist jedoch deutlich schwächer im Vergleich zur Wechselwirkung zwischen Antikörper und dem ursprünglichen Peptid. Nicht-essentielle Aminosäuren haben keinen Einfluss auf die spezifische Erkennung des Peptids durch den mAk [127]. Zur Beschreibung der Messergebnisse soll folgende Nomenklatur verwendet werden: Das originale, nicht modifizierte biphosphorylierte Peptid wird mit Tau[pThr231/pSer235] bzw. als „Referenz“ bezeichnet. Dabei wird in den eckigen Klammern die Position der phosphorylierten Aminosäure angegeben. Die Tau-Isoformen sind mit dem Index „Iso“ markiert. Die eckigen Klammern beinhalten in diesem Fall Informationen über die durch ein Alanin ausgetauschte Aminosäure sowie über ihre Position innerhalb der Peptidsequenz. So wird in dem Peptid Tau<sup>Iso</sup>[Ser237] die Aminosäure Serin an der Peptidposition 237 durch ein Alanin substituiert. Die Charakterisierung der Bindung erfolgt anhand von Bindungshäufigkeiten  $h_B$ , die ein Maß für die on-Rate sind, Bindungsparametern ( $\tau_0$ ,  $x_{ts}$ ,  $\Delta G$ ), die die Energielandschaft der Bindung und die Dynamik eines Abrisses beschreiben, sowie Affinitätskonstanten  $K_a$ , die ein Maß für die Stärke der Bindung darstellen. Die Messunsicherheiten der bestimmten Parameter wird in Klammern angegeben und bezieht sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen des Messwertes, z.B.  $h_B = 40(14) \%$ .

### 4.1.1 Bestimmung der Bindungshäufigkeiten

Um die relativen Bindungshäufigkeiten  $h_B$  für den Alanin-Scan zu bestimmen, werden die Interaktionen zwischen dem mAk HPT-101, dem originalen Peptid Tau[pThr231/pSer235] (Referenz-Peptid) und den sieben Tau-Isoformen untersucht. Dazu werden pro Antikörper-Peptid-Kombination mindestens 40 Kraft-Abstandskurven für jeweils vier verschiedene Kolloidpaare aufgenommen und die detektierten Bindungsereignisse ausgewertet. Abb. 4.1 zeigt den Median der relativen Bindungshäufigkeit  $h_B$ . Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Medians, die sich für eine Zufallsvariable  $\tilde{x}$  zu  $\Delta\tilde{x} = 0,2887(\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2)$  berechnet.  $x_{1/2} = 1/2(n \pm \sqrt{3n})$  geben dabei die Position der Messwerte in der nach Größe geordneten Messreihe an.  $n$  ist die Gesamtanzahl aller Messdaten. Die Hintergrundwechselwirkungen (vgl. Abschnitt 3.2.3.1) sind durch den blau schraffierten Balken gegeben. Die größte Bindungshäufigkeit ( $h_B = 40(14)\%$ ) ergibt sich für die Interaktion zwischen dem Referenz-Peptid Tau[pThr231/pSer235] und mAk HPT-101. Im Vergleich dazu ist  $h_B$  für vier Peptid-Isoformen (Tau<sup>Iso</sup>[pThr231], Tau<sup>Iso</sup>[Lys234], Tau<sup>Iso</sup>[pSer235], Tau<sup>Iso</sup>[Pro236]) um zirka 50 % reduziert. Dies deutet auf die Existenz von essentiellen Aminosäuren hin. Im Speziellen heißt das, dass der Austausch dieser Aminosäuren die Wechselwirkung zwischen Peptid und Antikörper maßgeblich abschwächt, woraus folgt, dass diese Aminosäuren zum Epitop gehören. Für die restlichen Peptide Tau<sup>Iso</sup>[Pro232]/[Pro233]/[Ser237] wurden keine Abweichungen von der Bindungshäufigkeit des Referenz-Peptids beobachtet. Trotz dieser Tendenzen können aufgrund der großen Fehlerbalken keine signifikanten Unterschiede in  $h_B$  festgestellt werden (Median-Test,  $\alpha = 10\%$  [148], vgl. Anhang A.3). Somit sind fundierte Aussagen über das Vorhandensein von essentiellen, sekundären und nicht-essentiellen Aminosäuren anhand dieses Parameters nicht möglich.

Der eben beschriebene Trend für die Bindungshäufigkeiten stimmt auch nur teilweise mit den ELISA-Resultaten (vgl. Abschnitt 2.2.1.4, Tab. 2.2 und Abschnitt 4.1.5) überein. Aus der Epitopkartierung ergibt sich, dass das Epitop aus vier essentiellen Aminosäuren besteht. Werden diese gegen ein Alanin ausgetauscht, bindet der Antikörper nicht mehr an seine Zielsequenz. Aus Abb. 4.1 geht jedoch hervor, dass mAk HPT-101 auch beim Austausch essentieller Aminosäuren mit einer nicht vernachlässigbaren Häufigkeit an die Tau-Peptide bindet. Um das ELISA-Ergebnis zu reproduzieren, müsste die Bindungshäufigkeit dieser vier Peptide im Bereich der Hintergrundwechselwirkungen liegen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

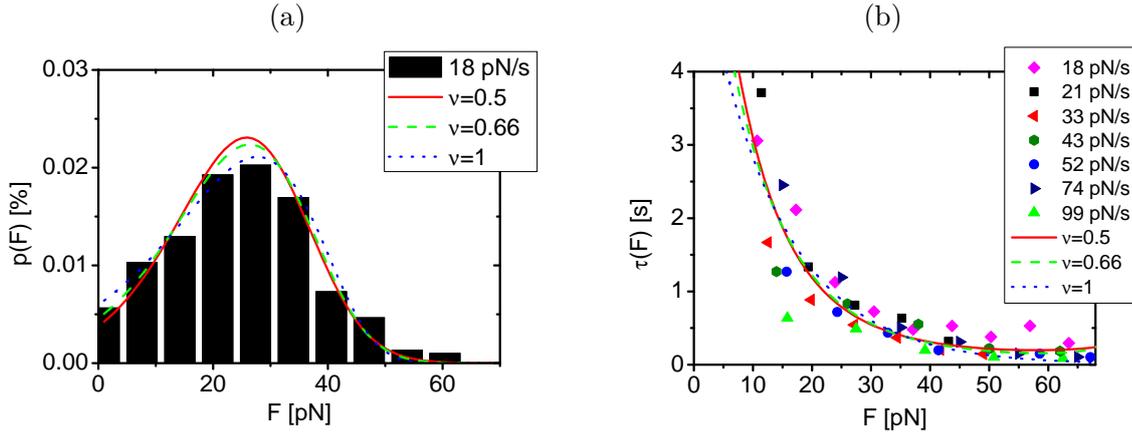
An dieser Stelle soll aber erwähnt werden, dass die Bindungshäufigkeit  $h_B$  nur ein Maß für die relative on-Rate  $k_{on}$  darstellt [77, 142], wohingegen sich das ELISA-Resultat auf die Assoziationskonstante  $K_a$  bezieht, die als Verhältnis zwischen on- und off-Rate definiert ist (vgl. Abschnitt 2.1.2.1, Gl. 2.10). Somit wird für einen angemessenen Vergleich beider Methoden auch die off-Rate benötigt.



**Abbildung 4.1:** Bindungshäufigkeiten  $h_B$  für die Wechselwirkungen zwischen dem originalen Peptid (Referenz), den sieben Tau-Isoformen und dem mAk HPT-101. Die auf der  $x$ -Achse angegebenen Peptidaminosäuren wurden in dem Referenz-Peptid durch ein Alanin ersetzt und stehen repräsentativ für die verschiedenen Tau-Isoformen. Es ist zu erkennen, dass  $h_B$  für vier Isoformen (Tau<sup>Iso</sup>[pThr231], Tau<sup>Iso</sup>[Lys234], Tau<sup>Iso</sup>[pSer235], Tau<sup>Iso</sup>[Pro236]) im Vergleich zum originalen Peptid Tau[pThr231/pSer235] reduziert ist. Dies deutet auf die Existenz von vier essentiellen Aminosäuren hin, aufgrund der großen Fehlerbalken werden jedoch keine signifikanten Unterschiede (Median-Test,  $\alpha = 10\%$  [148]) zu den Bindungshäufigkeiten der anderen Tau-Isoformen beobachtet. Die restlichen Bindungshäufigkeiten liegen im Bereich des Referenz-Peptids. Der Austausch dieser Aminosäuren scheint somit keinen Einfluss auf die spezifische Wechselwirkung zwischen Peptid und Antikörper zu haben. Der blau schraffierte Balken beschreibt die Hintergrundinteraktionen, die mit einem Wert von 2% vernachlässigt werden können.

#### 4.1.2 Bestimmung der Bindungsparameter mittels dynamischer Kraftspektroskopie

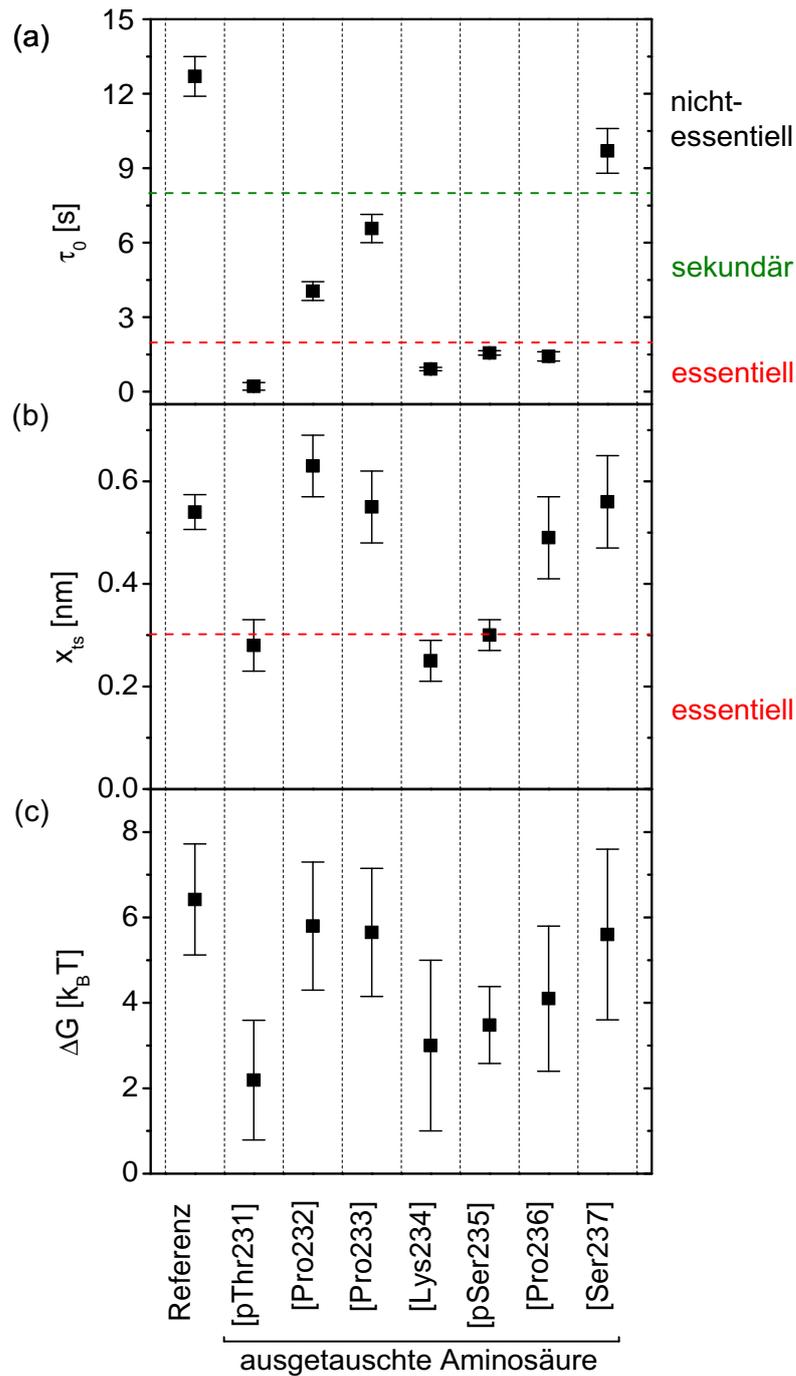
Zur Bestimmung der Bindungsparameter für die Wechselwirkungen zwischen dem mAk HPT-101 und den aus dem Alanin-Scan hervorgegangenen Peptiden werden kraftspektroskopische Messungen durchgeführt. Dazu werden Kraft-Abstandskurven aufgenommen und die detektierten Abrisskräfte entsprechend ihrer Häufigkeiten in einem Abrisskraft histogramm dargestellt. Um statistisch belastbare Ergebnisse zu erhalten, werden pro Antikörper-Peptid-Kombination zwischen fünf und zehn verschiedene Kolloidpaare untersucht, aus denen mindestens 150 Abrissereignisse hervorgehen. Diese Prozedur wird für mehrere Belastungsraten, die im Bereich von  $\dot{F} \in [18, 99]$  pN/s liegen, wiederholt. Abb. 4.2 (a) zeigt eine typische Abrisskraftverteilung für die Interaktion zwischen mAk HPT-101 und dem Peptid Tau<sup>Iso</sup>[Ser237] ( $\dot{F} = 18(2)$  pN/s). Die Klassengröße wird nach der Regel von Scott [149] berechnet:  $\Delta F = 3,5\sigma / \sqrt[3]{N_{tot}}$ . Dabei ist  $\sigma$  die Standardabweichung und  $N_{tot}$  der Stichprobenumfang. Aus diesen Abrisskraft histogrammen wird für jede Belastungsrate die diskrete Funktion  $\tau(F)$  mittels Gl. 2.33 berechnet. Im Fall der Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und Tau<sup>Iso</sup>[pThr231] muss jedoch aufgrund der Form des Histogramms auf eine andere Methode zurückgegriffen werden. Für Datensätze, die zu sehr kleinen Abrisskräften verschoben sind, erfolgt die Umwandlung in  $\tau(F)$  durch Gl. 2.34. In Abb. 4.2 (b) sind die diskreten,



**Abbildung 4.2:** (a) Abrisskraft-Histogramm bei einer Belastungsrate von  $\dot{F} = 18(2)$  pN/s für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und dem Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$  (schwarze Balken). Die Datenanpassung erfolgt mittels Gl. 2.31 für die verschiedenen Energielandschaftstypen  $\nu = 1/2$  (rote Linie),  $\nu = 2/3$  (grün gestrichelte Linie),  $\nu = 1$  (blau gepunktete Linie). Daraus ergeben sich die vorläufigen Bindungsparameter  $\tau_0, x_{\text{ts}}, \Delta G$ . (b) Kraftabhängige Lebensdauer  $\tau(F)$  der Rezeptor-Ligand-Bindung bei verschiedenen Belastungsraten  $\dot{F}$  zur Bestimmung der belastungsratenunabhängigen Bindungsparameter. Dazu wird aus den Abrisskraft-Histogrammen die diskrete Funktion  $\tau(F)$  anhand von Gl. 2.33 für jede Belastungsrate berechnet. Es ist zu erkennen, dass alle  $\tau(F)$  auf einer einzelnen Masterkurve kollabieren. Diese wird mit der Funktion  $\tau_{\text{DHS}}(F)$  (vgl. Gl. 2.30) global angepasst, woraus sich die charakteristischen Bindungsparameter ergeben.

kraftabhängigen Lebensdauern  $\tau(F)$  für die Wechselwirkung aus Abb. 4.2 (a) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die verschiedenen  $\tau(F)$  für alle Belastungsraten  $\dot{F}$  auf einer Masterkurve kollabieren. Zur Bestimmung der charakteristischen, belastungsratenunabhängigen Bindungsparameter  $\tau_0, x_{\text{ts}}$  und  $\Delta G$  wird die kraftabhängige Lebensdauer mit Hilfe von Gl. 2.30 für  $\nu = 1/2$  (rote Linie),  $\nu = 2/3$  (grün gestrichelte Linie) und  $\nu = 1$  (blau gepunktete Linie) global angepasst. Wie aus Abb. 4.2 (b) hervorgeht, stimmt die Vorhersage des DHS-Modells für  $\nu = 1/2$  und  $\nu = 2/3$  im Rahmen der Messgenauigkeit mit den experimentellen Daten überein. Für  $\nu = 1$  (Bell-Evans-Modell) kommt es im Bereich kleiner und großer Abrisskräfte zu Abweichungen. Für die Gegenprobe, ob die erhaltenen Bindungsparameter die experimentellen Daten hinreichend beschreiben, werden diese in Gl. 2.31 eingesetzt und die theoretische Abrisskraftverteilung  $p_{\text{DHS}}(F)$  für die entsprechende Belastungsrate und Energielandschaft berechnet. Aus Abb. 4.2 (a) ist zu erkennen, dass Übereinstimmung vorliegt. Diese Prozedur wird für alle Antikörper-Peptid-Kombinationen wiederholt. Es soll erwähnt werden, dass alle gemessenen Abrisskräfte unterhalb der kritischen Kraft  $F_{\text{krit}}$  liegen, oberhalb derer die Anwendbarkeit des DHS-Modells nicht gewährleistet ist (vgl. Abschnitt 2.1.2.4).

Die erhaltenen Bindungsparameter für den Alanin-Scan sind in Abb. 4.3 für  $\nu = 1/2$  dargestellt. Die längste Bindungslebensdauer mit einem Wert von  $\tau_0 = 12,7(8)$  s wird für die Interaktion zwischen dem originalen Referenz-Peptid  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  und mAk HPT-101 beobachtet, gefolgt von  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$  mit einer Lebensdauer von  $\tau_0 = 9,7(9)$  s (vgl. Abb. 4.3 (a)). Bezogen auf die  $\tau_0$ -Werte des unmodifizierten Referenz-Peptids ist die Lebenszeit der Bindung für  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Pro233}]$  bzw.  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Pro232}]$  um Faktor 2–3 verringert. Die Peptide, bei denen die Aminosäuren [pThr231], [Lys234], [pSer235] und [Pro236] substituiert wurden, bilden, in Übereinstimmung mit den Bindungshäufigkeitsmessungen, die kurzlebigsten Bindungen mit mAk HPT-101 aus. Aufgrund der großen Aufspaltung des Bindungsparameters



**Abbildung 4.3:** Übersicht über die Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  aus dem Alanin-Scan für  $\nu = 1/2$ . Die auf der  $x$ -Achse angegebenen Peptidaminosäuren wurden im Referenz-Peptid durch ein Alanin ersetzt und stehen repräsentativ für die verschiedenen Tau-Isoformen. Die Daten für das Referenz-Peptid Tau[pThr231/pSer235] entstammen aus Ref. [65]. (a) Lebensdauer einer Bindung im kraftfreien Zustand  $\tau_0$ , anhand derer die Aminosäuren vorläufig in drei Klassen eingeteilt werden können:  $\tau_0 \geq 8$  s nicht-essentielle Aminosäure (Tau<sup>Iso</sup>[Ser237]);  $2$  s  $\leq \tau_0 < 8$  s sekundäre Aminosäure (Tau<sup>Iso</sup>[Pro232]/[Pro233]);  $\tau < 2$  s essentielle Aminosäure (Tau<sup>Iso</sup>[pThr231]/[Lys234]/[pSer235]/[Pro236]). (b) Bindungslänge  $x_{ts}$ . Für drei Peptide (Tau<sup>Iso</sup>[pThr231]/[Lys234]/[pSer235]) wird eine deutliche Reduktion der Bindungslänge im Vergleich zu den restlichen beobachtet. Es kann ein weiteres Kriterium für das Finden essentieller Aminosäuren aufgestellt werden:  $x_{ts} \leq 0,3$  nm. (c) Für die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  wird ein ähnlicher Trend wie in (b) beobachtet. Für essentielle Aminosäuren ist die Barrierehöhe verkleinert. Aufgrund der großen Fehlerbalken wird auf das Aufstellen eines weiteren Kriteriums für essentielle, sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren verzichtet. Die Zahlenwerte für alle drei Bindungsparameter sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

$\tau_0$  für die einzelnen Peptid-Antikörper-Paare können Kriterien für essentielle, sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren anhand der Bindungslebensdauer aufgestellt werden. Charakteristisch für essentielle Aminosäuren ist, dass für die Lebensdauer der Bindung gilt:  $\tau_0 < 2\text{ s}$ . Dies ist der Fall für  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]/[\text{Lys234}]/[\text{pSer235}]/[\text{Pro236}]$ . Bindungen, die eine Lebenszeit von  $2\text{ s} \leq \tau_0 < 8\text{ s}$  besitzen, werden durch den Austausch sekundärer Aminosäuren hervorgerufen ([Pro232], [Pro233]). Für Rezeptor-Ligand-Komplexe, für die  $\tau_0 \geq 8\text{ s}$  gilt, wird innerhalb der Tau-Peptidsequenz eine nicht-essentielle Aminosäure durch ein Alanin ausgetauscht.

Anhand des zweiten Bindungsparameters  $x_{\text{ts}}$  (vgl. Abb. 4.3 (b)) kann diese Klassifizierung noch weiter verfeinert werden, indem ein weiteres Kriterium eingeführt wird. Essentielle Aminosäuren zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Bindungslänge von  $x_{\text{ts}} \leq 0,3\text{ nm}$  besitzen. Dies entspricht einer Reduktion von  $\approx 40\%$  im Vergleich zur Bindungslänge des Referenz-Peptids und wird für die Peptide  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]/[\text{Lys234}]/[\text{pSer235}]$  beobachtet. Für sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren ergibt sich keine Änderung der Bindungslänge ( $x_{\text{ts}} \approx 0,5\text{ nm}$ ).

Die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  folgt dem beobachteten Trend der Bindungslänge, d.h. das bei Rezeptor-Ligand-Komplexen, bei denen eine essentielle Peptidaminosäure ausgetauscht wurde, die kleinsten Potentialtiefen auftreten (vgl. Abb. 4.3 (c)). Erneut werden für die Peptide  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  ( $\Delta G = 2,2(14)\text{ k}_B T$ ),  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Lys234}]$  ( $\Delta G = 3,0(20)\text{ k}_B T$ ) und  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  ( $\Delta G = 3,5(9)\text{ k}_B T$ ) die niedrigsten  $\Delta G$ -Werte gemessen, gefolgt von  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Pro236}]$ . Die restlichen Isoformen liegen im Bereich der freien Aktivierungsenergie des Referenz-Peptids  $\text{Tau}[\text{pThr231}]/[\text{pSer235}]$ . Aufgrund dessen, dass die  $\Delta G$ -Werte mit vergleichsweise großen Fehlerbalken behaftet sind, wird darauf verzichtet, ein weiteres Kriterium zur Identifizierung der verschiedenen Aminosäuren einzuführen. Dennoch kann in Kombination mit den beiden anderen Bindungsparametern geschlussfolgert werden, dass sich die schwächsten Bindungen zwischen den Tau-Peptiden und mAk HPT-101 ausbilden, bei denen eine essentielle Aminosäure substituiert wurde.

Tab. 4.1 gibt eine Übersicht über die vollständigen Bindungsparameter in Abhängigkeit des Energielandschaftsparameters  $\nu$  sowie über die kritische Kraft für alle Peptid-Antikörper-Interaktionen, die im Rahmen des Alanin-Scans gemessen wurden. Die Bindungsparameter stimmen für  $\nu = 1/2$  und  $\nu = 2/3$  im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Nur für  $\nu = 1$  treten größere Abweichungen auf, was darauf hindeutet, dass die Bindungsstärke durch das Bell-Evans-Modell unterschätzt wird. Insgesamt liegen die aufgetretenen Schwankungen der Bindungsparameter jedoch im von Dukdo *et al.* vorgegeben Bereich, um sie als unabhängig von der Wahl der Form der Energielandschaft zu bezeichnen [97]. In den Reviews von Bizzarri [100] und Merkel [72] werden Übersichten über die Bindungsparameter verschiedenster Rezeptor-Ligand-Bindungen gegeben, die mit dynamischer Kraftspektroskopie bestimmt wurden. Typische Größenordnungen für die Lebensdauer im unbelasteten Zustand belaufen sich auf  $0,01 - 500\text{ s}$  sowie für die Bindungslänge  $x_{\text{ts}}$  auf  $0,02 - 2\text{ nm}$ . Wie aus Tab. 4.1 hervorgeht, liegen die hier bestimmten charakteristischen Bindungsparameter innerhalb dieser Bereiche. Eine Einordnung der freien Aktivierungsenergie  $\Delta G$  kann nicht durchgeführt werden, da die Datenanalyse in den Fallbeispielen dieser Reviewartikel mit dem Bell-Evans-Modell erfolgte

**Tabelle 4.1:** Übersicht über die Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$ ,  $\Delta G$  und  $F_{\text{krit}}$  aus dem Alanin-Scan für  $\nu = [1/2, 2/3, 1]$ . Die erste Spalte der Tabelle gibt die Aminosäure an, die durch ein Alanin in der jeweiligen Peptid-Isoform ausgetauscht wurde. Eine Berechnung der kritischen Kraft  $F_{\text{krit}}$  (vgl. Gl. 2.32) ist für den Fall  $\nu = 1$  (Bell-Evans-Modell) nicht möglich, da in dieser Betrachtung  $\Delta G$  nicht mit einfließt. Die Abweichung der Bindungsparameter für  $\nu = 1/2$  und  $\nu = 2/3$  liegen im Rahmen der in Dudko *et al.* [97] angegebenen Schwankungen. Die Abweichungen für  $\nu = 1$  sind größer. Die  $\Delta G$ -Werte wurden gerundet. Der Messfehler ist in Klammern angeben und bezieht sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen. Die Messunsicherheiten der Bindungsparameter werden nach der Anleitung in Abschnitt 3.1.8 berechnet, die von  $F_{\text{krit}}$  über Fehlerfortpflanzung [150].

interagierendes Peptid	$\nu$	$\tau_0$ [s]	$x_{ts}$ [nm]	$\Delta G$ [ $k_B T$ ]	$F_{\text{krit}}$ [pN]
Referenz	1/2	12,7(8)	0,54(3)	6(1)	98(14)
	2/3	12,4(7)	0,49(5)	6(2)	78(11)
	1	11,7(6)	0,41(4)	k.A.	k.A.
[pThr231]	1/2	0,22(15)	0,28(5)	2(1)	64(29)
	2/3	0,21(12)	0,26(5)	2(1)	42(25)
	1	0,20(10)	0,16(8)	k.A.	k.A.
[Pro232]	1/2	4,05(38)	0,63(6)	6(2)	76(12)
	2/3	4,09(35)	0,63(6)	5(1)	48(3)
	1	3,85(34)	0,50(6)	k.A.	k.A.
[Pro233]	1/2	6,57(57)	0,55(7)	6(2)	84(12)
	2/3	7,18(50)	0,58(7)	5(2)	50(14)
	1	5,39(35)	0,38(5)	k.A.	k.A.
[Lys234]	1/2	0,91(7)	0,25(4)	3(2)	99(50)
	2/3	0,88(6)	0,21(2)	3(2)	80(43)
	1	0,81(5)	0,14(1)	k.A.	k.A.
[pSer235]	1/2	1,56(9)	0,30(3)	4(1)	92(15)
	2/3	1,52(7)	0,28(3)	3(1)	67(11)
	1	1,30(6)	0,16(1)	k.A.	k.A.
[Pro236]	1/2	1,42(19)	0,49(8)	4(2)	69(17)
	2/3	1,26(16)	0,40(8)	4(2)	56(12)
	1	0,98(10)	0,24(4)	k.A.	k.A.
[Ser237]	1/2	9,72(90)	0,56(9)	6(2)	82(16)
	2/3	8,00(85)	0,46(8)	5(2)	70(13)
	1	6,12(42)	0,32(6)	k.A.	k.A.

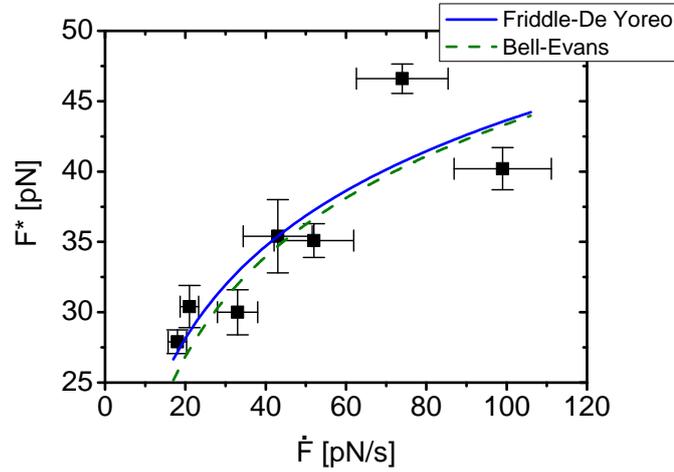
und die Potentialtiefe in diese Beschreibung nicht mit eingeht. In anderen Quellen werden aber typische Bindungsenergien von wenigen  $k_B T$  angegeben [68].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie Kriterien für essentielle, sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren festgelegt werden konnten. Diese beziehen sich direkt auf die Lebensdauer im kraftfreien Zustand  $\tau_0$  und auf die Bindungslänge  $x_{ts}$ . Aufgrund der Messunsicherheit in der Bestimmung der freien Aktivierungsenergie  $\Delta G$ , die ein Maß für die Potentialtiefe darstellt, wird für diesen Parameter kein Kriterium aufgestellt. Der beobachtete Trend wird jedoch in die Gesamtbewertung der einzelnen Aminosäuren mit einbezogen. Weiterhin soll erwähnt werden, dass die aufgestellten Klassifizierungen vergleichender Natur sind, d.h., sie beziehen sich immer auf die Interaktion zwischen dem originalen Referenz-Peptid und mAk HPT-101, da die Absolutwerte für andere Rezeptor-Ligand-Systeme deutlich abweichen können. Für die hier untersuchte Wechselwirkung zwischen den sieben Tau-Isoformen und dem monoklonalen Antikörper HPT-101 ergeben sich folgende Definitionen: Essentielle Aminosäuren weisen eine um Faktor 10 reduzierte Bindungslebensdauer auf. Die Bindungslänge  $x_{ts}$  und die freie Aktivierungsenergie folgen diesem Trend und zeigen die niedrigsten beobachteten Werte. Damit konnten die Aminosäuren [pThr231], [Lys234] und [pSer235] als Teil des Antikörperepitops identifiziert werden. Sekundäre Aminosäuren, die zur Erkennung des Peptids durch den mAk beitragen, besitzen verringerte Bindungslebensdauern  $\tau_0$  (Faktor 2 – 3), die Bindungslänge und  $\Delta G$  erfahren jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit keine Änderungen ([Pro232], [Pro233]). Für nicht-essentielle Aminosäuren ([Ser237]) ändern sich die Bindungsparameter gar nicht oder nur im Rahmen der Fehlergrenzen. Sie haben somit keinen Einfluss auf die spezifische Wechselwirkung zwischen Tau-Peptid und monoklonalem Antikörper HPT-101. Einen Sonderfall stellt die Aminosäure [Pro236] dar. Entsprechend der Klassifizierung nach der Bindungslebensdauer gehört sie zu den essentiellen Aminosäuren, die Bindungslänge ist jedoch nicht reduziert (vgl. Abb. 4.3 (b)). Auch die Potentialtiefe liegt unterhalb des Bereiches für sekundäre Aminosäuren, wodurch die Zuordnung nicht eindeutig ist. Diese Diskrepanz wird in Abschnitt 4.1.5 diskutiert.

Unabhängig von den hier gefundenen Schranken, die die einzelnen Aminosäureklassen einteilen, könnte eine allgemeingültige Definition wie folgt lauten: Essentielle Aminosäuren weisen sowohl für die Lebensdauer als auch für die Bindungslänge die niedrigsten Werte auf. Die freie Aktivierungsenergie folgt diesem Trend. Sekundäre Aminosäuren zeigen eine verkürzte Lebensdauer  $\tau_0$  (im Bereich zwischen der des Referenz-Peptids und denen der essentiellen Aminosäuren),  $x_{ts}$  sowie  $\Delta G$  ändert sich nicht bzw. nur wenig in Bezug auf die Bindungsparameter des Referenz-Peptids. Der Austausch nicht-essentieller Aminosäuren beeinflusst die spezifische Erkennung des Peptids durch den monoklonalen Antikörper nur geringfügig.

### 4.1.3 Bestimmung der Bindungsparameter mit dem Modell nach Bell-Evans und Friddle-De Yoreo

Um sicherzustellen, dass die extrahierten Bindungsparameter nicht von der Wahl des zugrundeliegenden Potentials abhängen, sollen die mit dem DHS-Modell bestimmten Werte für  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  mit denen aus der Theorie von Bell-Evans (vgl. Abschnitt 2.1.2.3) sowie von Friddle-De Yoreo (vgl. Abschnitt 2.1.2.5) verglichen werden. Exemplarisch wird dies für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und Tau<sup>Iso</sup>[Ser237] durchgeführt. Zur Bestimmung der Bindungsparameter wird die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  gegenüber der Belastungsrate  $\dot{F}$  aufgetragen (vgl. Abb. 4.4). Diese Daten werden anschließend mit Gl. 2.27 (Bell-Evans-Modell, grün gestrichelte Linie) bzw. mit Gl. 2.39 (Friddle-De Yoreo-Modell, blaue Linie) angepasst. Beide Modelle beschreiben die Messdaten übereinstimmend, nur für niedrige Ziehgeschwindigkeiten treten Abweichungen auf. Die Belastungsraten  $\dot{F}$  wurden zwischen 18 – 99 pN/s variiert und stimmen mit denen aus Abb. 4.2 (b) überein.



**Abbildung 4.4:** Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft  $F^*$  von der Belastungsrate  $\dot{F}$  zur Bestimmung der Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  nach dem Bell-Evans- (grün gestrichelte Linie) und dem Friddle-De Yoreo-Modell (blaue Linie). Für kleine Belastungsraten treten Abweichungen zwischen beiden Theorien auf, wohingegen für steigende Belastungsraten Übereinstimmung beobachtet wird. Aufgrund der mit diesen Modellen beobachteten Schwankungen in der Abrisskraft bei hohen  $\dot{F}$  ist die Bestimmung der Bindungsparameter ungenauer als bei Verwendung des DHS-Modells.

Aus dem Friddle-De Yoreo-Modell gehen direkt alle drei Bindungsparameter hervor, wobei die Bell-Evans-Theorie nur die Lebensdauer der Bindung  $\tau_0$  und die Bindungslänge  $x_{ts}$  beinhaltet. Der Wert für die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  kann jedoch in Abhängigkeit von  $\tau_0$  berechnet werden. Nach Evans *et al.* kann die off-Rate wie folgt dargestellt werden [137]:

$$k_{\text{off}} = \left( \frac{k_B T}{h} \right) \exp \left[ - \left( \frac{\Delta G - x_{ts} F}{k_B T} \right) \right], \quad (4.1)$$

wobei  $h$  das plancksche Wirkungsquantum ist. Durch Gleichsetzen von Gl. 2.21 mit 4.1 folgt der Ausdruck für die Potentialtiefe zu:

$$\Delta G = -k_B T \ln \left( \frac{h}{\tau_0 k_B T} \right). \quad (4.2)$$

**Tabelle 4.2:** Vergleich der Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und der Peptid-Isoform Tau<sup>Iso</sup>[Ser237]. Die Auswertung wurde mit dem DHS- ( $\nu = 0,5$ ), dem Friddle-De Yoreo- sowie dem Bell-Evans-Modell durchgeführt. Der Messfehler ist in Klammern angegeben und bezieht sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen.

	DHS-Modell ( $\nu = 0,5$ )	Friddle-De Yoreo	Bell-Evans
$\tau_0$ [s]	9,72(90)	13(3)	7(4)
$x_{ts}$ [nm]	0,56(9)	0,41(13)	0,40(10)
$\Delta G$ [ $k_B T$ ]	6(2)	7(3)	31(2)

Tab. 4.2 zeigt die Bindungsparameter für das DHS- ( $\nu = 0,5$ ), das Friddle-De Yoreo- und das Bell-Evans-Modell. Die Fehlerrechnung für das DHS-Modell wurde in Abschnitt 3.1.8 beschrieben. Zur Bestimmung der Messunsicherheit von  $\tau_0$  (Bell-Evans),  $x_{ts}$  (Bell-Evans, Friddle-De Yoreo) und  $\Delta G$  (Friddle-De Yoreo) werden die Fehler aus dem verwendeten Levenberg-Marquardt-Algorithmus (Datenanpassung mit den entsprechenden Funktionen) übernommen. Für die restlichen Größen wird der Fehler per Fehlerfortpflanzung berechnet [150]. Es ist zu erkennen, dass die Lebensdauer  $\tau_0$  sowie die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  aus der Theorie von Friddle-De Yoreo größer sind als die aus dem DHS-Modell. Dieser Trend kehrt sich jedoch für die Bindungslänge  $x_{ts}$  um. Aufgrund der angegebenen Fehler stimmen aber alle Werte im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Aus dem Bell-Evans-Modell ergeben sich die kleinsten Werte für die Lebensdauer einer Bindung im kraftfreien Zustand sowie für die Bindungslänge. Innerhalb der Fehlergrenzen stimmen diese Parameter allerdings auch mit der DHS-Theorie überein. Allein die freie Aktivierungsenergie mit einem Wert von  $\Delta G = 31(2) k_B T$  überschätzt die Stärke der Bindung um das Fünffache.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bestimmte Lebensdauer  $\tau_0$  sowie die Bindungslänge  $x_{ts}$  unabhängig von der Wahl des Modells sind. Die Potentialtiefen  $\Delta G$  stimmen für die DHS- und das Friddle-De Yoreo-Theorie überein. Abweichungen treten nur für die Methode nach Bell-Evans auf. Somit können alle drei Modelle zur Bestimmung der Bindungsparameter verwendet werden, aufgrund der kleinsten Fehler und der mit Optischen Pinzetten realisierbaren Statistik<sup>44</sup> wird jedoch die DHS-Theorie zur Auswertung der Messdaten bevorzugt.

#### 4.1.4 Das Superpositionsmodell

Die bisher beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass zur spezifischen Erkennung des doppelphosphorylierten Referenz-Peptids Tau[pThr231/pSer235] durch den phosphorylierungsspezifischen mAk HPT-101 nicht nur einzelne isolierte Aminosäuren und Phosphatgruppen benötigt werden, sondern deren Zusammenspiel als essentielle und sekundäre Aminosäuren.

<sup>44</sup>Dies bezieht sich darauf, dass mit Optischen Pinzetten nur ein verhältnismäßig kleiner Bereich an Belastungsraten abgedeckt werden kann [26], wodurch die Bestimmung der Bindungsparameter anhand der  $F^* \cdot \dot{F}$  Abhängigkeit im Vergleich zum DHS-Modell fehlerbehafteter ist.

Da es sich bei mAk HPT-101 um einen Antikörper handelt, der ein spezifisches Phosphorylierungsmuster erkennt (vgl. Abschnitt 2.2.1.4, Abb. 2.10 (b)), kann die Frage gestellt werden, ob sich die oben genannte Wechselwirkung aus der Summe der Interaktionen der beiden monophosphorylierten Peptide  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  und  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  darstellen lässt. Ausgangspunkt dieser Behauptung ist, dass diese beiden Peptide das jeweilige komplementäre Epitop des ursprünglichen Peptids besitzen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass sich die Bindungshäufigkeiten (vgl. Abschnitt 4.1.1), die Bindungslängen sowie die freien Aktivierungsenergien (vgl. Abschnitt 4.1.2) der beiden einfach phosphorylierten Peptide annähernd zu den Werten von  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  aufsummieren. Ausgehend von dieser Hypothese wird die Wechselwirkung zwischen dem originalen Peptid und mAk HPT-101 als Superposition von zwei voneinander unabhängigen Einzelbindungen betrachtet. Diese entstehen durch die Interaktion des Antikörpers mit der im Peptid vorhandenen Phosphorylierung. Eine solche Annahme trifft zu, wenn beide Bindungsstellen weit voneinander entfernt sind. Um Verwechslungen im folgenden Abschnitt vorzubeugen, soll an dieser Stelle noch einmal erwähnt werden, dass im Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  die Aminosäure Thr231 inklusive der Phosphatgruppe durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Die verbliebene Phosphorylierung befindet sich an [pSer235]. Für das Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  ist es genau umgekehrt. Die Aminosäure [pSer235] wurde ausgetauscht und die Phosphorylierung an [pThr231] bleibt erhalten. Das Superpositionsmodell wird im Rahmen der DHS-Theorie (vgl. Abschnitt 2.1.2.4) betrachtet. Darin ist eine Bindung durch eine einzelne Reaktionskoordinate  $x$  beschrieben, die sich stochastisch durch eine eindimensionale Energielandschaft bewegt:

$$\beta V(x) = \begin{cases} \frac{1}{2}k_m(x^m)^2, & x < x_{\text{ts}} \\ -\infty, & x > x_{\text{ts}}. \end{cases} \quad (4.3)$$

Gl. 4.3 entspricht dem Potential einer Feder, die bis zur Auslenkung  $x < x_{\text{ts}}$  harmonisch ist und für Werte  $x \geq x_{\text{ts}}$  bricht.  $k_m$  ist die Federkonstante der entsprechenden Bindung.  $m$  steht für das Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  bzw.  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  und  $\beta = (k_B T)^{-1}$  ist die inverse thermische Energie. Mit Hilfe der freien Aktivierungsenergie lässt sich Gl. 4.3 wie folgt formulieren:

$$\beta \Delta G = \frac{1}{2}k_m(x_{\text{ts}}^m)^2, \quad (4.4)$$

woraus sich bei bekannter Bindungslänge und Potentialtiefe (vgl. Tab. 4.1) die Federkonstante für die Interaktion zwischen mAk HPT-101 und  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  bzw.  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  berechnen lässt. Unter Verwendung der kramerschen Gleichung für die Lebensdauer einer Bindung im unbelasteten Zustand, ergibt diese sich zu [86]:

$$\tau_0 = \frac{\sqrt{2\pi}}{Dk_m\sqrt{k_mx_{\text{ts}}}} \exp[\beta\Delta G], \quad (4.5)$$

wobei  $D$  die Diffusionskonstante für die Bindungsdissoziation ist. Somit sind die Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{\text{ts}}$  und  $\Delta G$  die einzigen systemabhängigen Größen, die in Gl. 4.4 und 4.5 eingehen. Basierend auf der ursprünglichen Annahme zweier unabhängiger Bindungen, kön-

nen somit die charakteristischen Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und Tau[pThr231/pSer235] ausschließlich aus den Daten der Interaktion zwischen mAk HPT-101/Tau<sup>Iso</sup>[pThr231] und mAk HPT-101/Tau<sup>Iso</sup>[pSer235] berechnet werden.

Dazu wird zunächst die Federkonstante  $k_m$  für die Einzelbindungen anhand von Gl. 4.4 unter Verwendung der entsprechenden  $\Delta G$ -Werte berechnet. Die daraus hervorgehenden Ergebnisse für  $k_{[pThr231]}$  und  $k_{[pSer235]}$  müssen anschließend zu einer effektiven Federkonstante kombiniert werden. Wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, beinhalten die zur Auswertung verwendeten Kraft-Abstandskurven für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und dem biphosphorylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235] keine Doppelbindungsabrisse. Dies legt nahe, dass die beiden Einzelbindungen gleichzeitig gedehnt werden und somit auch simultan brechen. Es folgt die Annahme, dass die externe Kraft parallel auf beide Bindungen wirkt, woraus sich die Federkonstante für die Interaktion zwischen dem originalen Peptid und mAk HPT-101 wie folgt berechnen lässt:

$$k_{[pThr231/pSer235]} = k_{[pThr231]} + k_{[pSer235]}. \quad (4.6)$$

Innerhalb derselben Hypothese wird die Bindungslänge

$$x_{ts}^{[pThr231/pSer235]} = \min \left[ x_{ts}^{[pThr231]}, x_{ts}^{[pSer235]} \right] \quad (4.7)$$

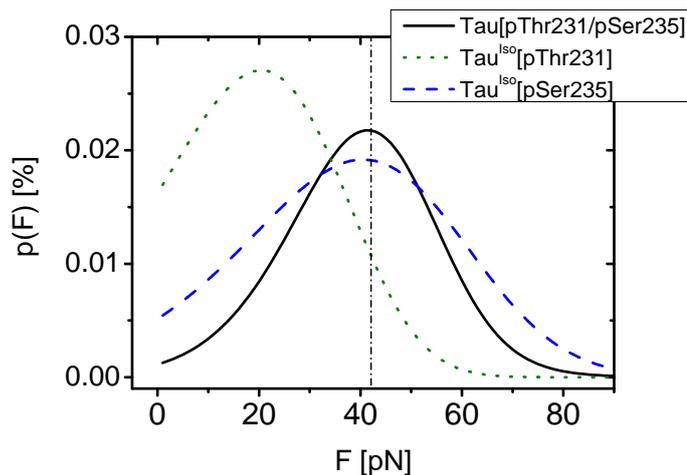
gesetzt, da die vermeintliche „Doppelbindung“ bricht, sobald die kleinere Bindungslänge der Einfachbindungen überschritten wird. Da beide Wechselwirkungen als unabhängig voneinander betrachtet werden, dissoziiert jede bei ihrer intrinsischen Länge  $x_{ts}^m$ . Sobald eine dieser Bindungen gerissen ist, muss die wirkende Kraft von der verbliebenen Bindung allein ausgehalten werden, wodurch diese sofort bricht. Geschieht dieser zweite Dissoziationsprozess sehr schnell<sup>45</sup>, wird die Dissoziation der „Doppelbindung“ als Einzelbindungsabriss detektiert.

Durch Kenntnis der Federkonstante  $k_{[pThr231/pSer235]}$  und der Bindungslänge  $x_{ts}^{[pThr231/pSer235]}$  kann durch Umstellen von Gl. 4.4 auch die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G^{[pThr231/pSer235]}$  für die Wechselwirkung mAk HPT-101/Tau[pThr231/pSer235] berechnet werden. Im letzten Schritt wird  $\tau_0$  bestimmt. Dazu wird angenommen, dass die Diffusionskonstante  $D$  in Gl. 4.5 unabhängig von einem bestimmten molekularen Konstrukt bzw. identisch für die drei verwendeten Peptide ist. Im Rahmen dieser Annahmen kann die Lebensdauer der Bindung zwischen dem biphosphorylierten Peptid und mAk HPT-101 wie folgt berechnet werden:

$$\tau_0 = \tau_0^m \left( \frac{(k_m)^{\frac{3}{2}} x_{ts}^m}{(k_{[pThr231/pSer235]})^{\frac{3}{2}} x_{ts}^{[pThr231/pSer235]}} \right) \exp[\Delta G_{[pThr231/pSer235]} - \Delta G_m]. \quad (4.8)$$

Durch Einsetzen der auf diesem Weg erhaltenen Bindungsparameter in Gl. 2.31 wird  $p(F)$  im Rahmen des Superpositionsmodells bestimmt. Abb. 4.5 zeigt den Vergleich zwischen den Abrisskraftverteilungen der eben beschriebenen Theorie ( $m = [pThr231]$ , grün gepunktete Linie,  $m = [pSer235]$ , blau gestrichelte Linie) und der Anpassung der experimentellen Daten der

<sup>45</sup>Da die Zeitauflösung in dem für diese Experimente verwendeten Aufbau auf  $\Delta t \approx 17$  ms begrenzt ist, gilt für den Zeitpunkt des zweiten Abrisses:  $t_{\text{Abriss2}} < \Delta t$ .



**Abbildung 4.5:** Vergleich zwischen den mit Hilfe des Superpositionsmodells berechneten Abrisskraftverteilungen  $p(F)$  (grün gepunktet:  $\text{Tau}^{\text{iso}}[\text{pThr231}]$ , blau gestrichelt:  $\text{Tau}^{\text{iso}}[\text{pSer235}]$ ) und der des originalen Peptids (schwarze Linie). Für die Berechnungen werden die Bindungsparameterwerte für  $\tau_0$ ,  $x_{\text{ts}}$  und  $\Delta G$  ( $\nu = 0,5$ ) aus Tab. 4.1 verwendet. Offensichtlich treten für die Annahme, dass die Phosphorylierung an [Ser235] (grün gepunktete Linie) ausschlaggebend für die spezifische Wechselwirkung zwischen mAk und  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  ist, große Abweichungen auf, wohingegen für die andere Betrachtung (blau gestrichelte Linie) die Position der häufigsten Abrisskraft (schwarze Punkt-Strich-Linie) sehr gut vorhergesagt wird. Abweichungen ergeben sich jedoch für die Höhe sowie Breite der Verteilung. Dies deutet darauf hin, dass mögliche Korrelationen zwischen den Bindungsseiten auftreten. Weiterhin bleibt der Einfluss der die Phosphorylierungsstellen umgebenden essentiellen sowie sekundären Aminosäuren im Superpositionsmodell unbeachtet.

Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  mittels DHS-Theorie (schwarze Linie). Als Energielandschaftsparameter wurde  $\nu = 0,5$  gewählt. Unter der Annahme, dass die Phosphorylierung an der Aminosäure Ser235 ( $m = [\text{pThr231}]$ , grün gepunktete Linie) die Bindung zwischen mAk HPT-101 und dem doppelt-phosphorylierten Peptid maßgeblich beeinflusst, treten große Abweichungen in Bezug auf die Abrisskraftverteilung auf. Weder die häufigste Abrisskraft (schwarze Punkt-Strich Linie), noch Höhe und Breite der Verteilung stimmen mit dem Ergebnis der direkten Datenanpassung überein. Dieses Resultat ist jedoch zu erwarten, da es sich bei der Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und  $\text{Tau}^{\text{iso}}[\text{pThr231}]$  um eine sehr schwache Bindung handelt. Im Vergleich zum originalen Peptid ist die Lebensdauer  $\tau_0$  um zirka das 50-fache, die Bindungslänge  $x_{\text{ts}}$  um ungefähr die Hälfte und  $\Delta G$  um den Faktor 3 reduziert. Für die deutlich stärkere Interaktion ( $m = [\text{pSer235}]$ , blau gestrichelte Linie) hingegen wird die Maximumsposition von  $p(F)$  genau vorhergesagt. Allerdings treten Abweichungen in Höhe und Breite der Verteilung auf. Auch ist die mit dem Superpositionsmodell berechnete freie Aktivierungsenergie kleiner im Vergleich zur gemessenen ( $5,1 k_{\text{B}}T$  gegen  $6,4 k_{\text{B}}T$ ). Da die Potentialtiefe ein Maß für die Festigkeit der Bindung ist, bedeutet das, dass die Annahme von zwei voneinander unabhängigen Bindungen die eigentliche Bindungsstärke des mAk HPT-101/ $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$ -Konstrukts unterschätzt. In Anbetracht der Tatsache, dass das Superpositionsmodell keine freien Parameter enthält, ist die Übereinstimmung zwischen experimentellen Daten und Vorhersage der Theorie akzeptabel. Somit kann trotz der beobachteten Abweichungen geschlussfolgert werden, dass zumindest die grundlegenden Bindungseigenschaften von mAk HPT-101 an  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  anhand der Daten der monophosphorylierten Peptide vorhergesagt werden können.

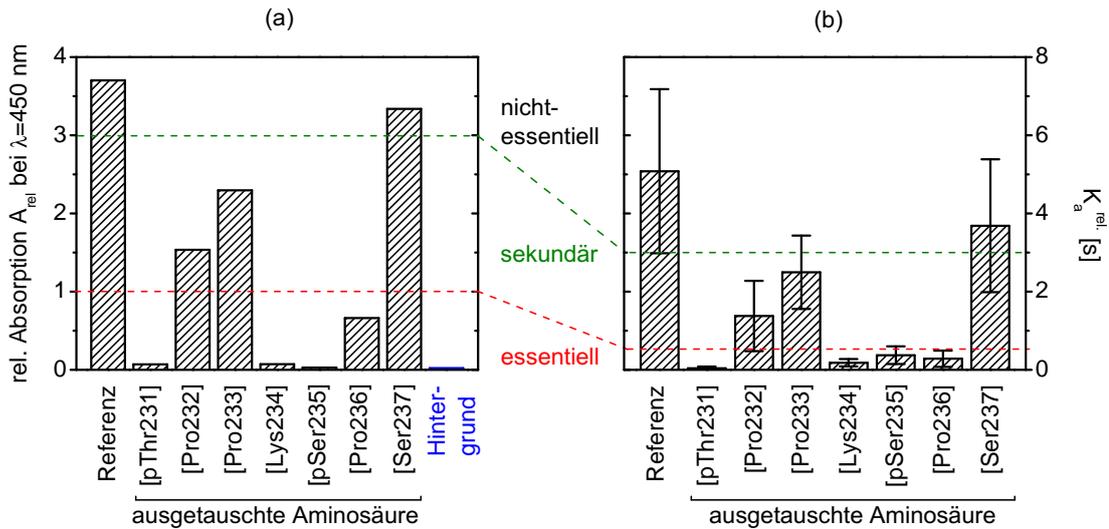
Um die Diskrepanzen in Breite und Höhe der Abrisskraftverteilungen  $p(F)$  sowie der berechneten  $\Delta G$ -Werte zu korrigieren, müssen kompliziertere Betrachtungen herangezogen werden, die beispielsweise Wechselwirkungen zwischen den beiden Bindungsstellen an den phosphorylierten Aminosäuren [pThr231] und [pSer235] berücksichtigen. So wird angenommen, dass jede Einzelbindung eine eigene intrinsische Steifigkeit, bestimmt durch  $k_{[\text{pThr231}]}$  bzw.  $k_{[\text{pSer235}]}$ , besitzt. Wird aber eine der beiden Bindungen mit einer bestimmten Kraft belastet, kann das zu einer veränderten Federkonstante der anderen führen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass der reale Pfad, der vom gebundenen Zustand in den ungebundenen führt, durch viele Koordinaten<sup>46</sup> beschrieben werden kann. Die Reduktion der Dimension des Problems liefert jedoch häufig brauchbare Ergebnisse, da die meisten der Koordinaten irrelevant zur Beschreibung des Dissoziationsprozesses einer Bindung sind, wohingegen andere eine größere Rolle spielen. Im Superpositionsmodell, genauso wie in der DHS-Theorie, wird angenommen, dass die Bindungslänge eine brauchbare Koordinate darstellt. Andere, wie der Winkel zwischen der Peptidhauptkette (englisch: *peptide backbone*) und der Ziehrichtung, aus der an einer Bindung gezogen wird, oder der Torsionswinkel zwischen den beiden Phosphatgruppen, könnten ebenfalls wichtig für die Betrachtungen sein. Auch der Einfluss der anderen essentiellen und sekundären Aminosäuren wird nicht im Superpositionsmodell berücksichtigt. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass trotz der gemachten Annahmen für  $m = [\text{pSer235}]$  eine Übereinstimmung mit den experimentellen Daten gefunden wurde. Dies deutet darauf hin, dass Teilaspekte des Dissoziationsprozesses in der beschriebenen Theorie wiedergespiegelt werden, während für die volle Übereinstimmung mit den Messergebnissen weitere Effekte beachtet werden müssen.

#### 4.1.5 Vergleich der Affinitätskonstante von mAk HPT-101 aus ELISA- und kraftspektroskopischen Messungen<sup>47</sup>

Zur Bestimmung der relativen Affinitätskonstanten  $K_a^{\text{rel}}$  des mAk HPT-101 in Bezug auf die sieben Tau-Isoformen werden zwei verschiedene Verfahren genutzt. Das erste basiert auf ELISA-Messungen (vgl. Abschnitt 2.2.1.4), deren Ergebnisse in Abb. 4.6 (a) dargestellt sind. Hierbei wird die relative Absorption  $A_{\text{rel}}$  bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  gemessen. Die bestimmten Absorptionswerte sind direkt proportional zur relativen Affinitätskonstante der einzelnen Rezeptor-Ligand-Komplexe, die nach der Einordnung von Singer *et al.* wie folgt interpretiert werden [127]: An Peptide, die eine Absorption von  $A_{\text{rel}} < 1$  aufweisen, bindet mAk HPT-101 nicht (bezogen auf das Niveau der Hintergrundwechselwirkung (blauer Balken)) bzw. nur sehr schwach. Die ausgetauschte Aminosäure ist dementsprechend ein Teil des Antikörper-Epitops und wird als essentielle Aminosäure bezeichnet (vgl. Tab. 4.3). Absorptionswerte  $A_{\text{rel}} > 3$  deuten darauf hin, dass die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Antikörper nicht beeinflusst sind. Die substituierte

<sup>46</sup>Es existieren insgesamt  $3N$  verschiedene Koordinaten, wobei  $N$  die Anzahl der Atome im betrachteten System darstellt.

<sup>47</sup>Die ELISA-Messungen aus diesem Kapitel wurden von Dr. D. Singer (Arbeitsgruppe Bioanalytik, Prof. Dr. R. Hoffmann, BBZ Leipzig) durchgeführt.



**Abbildung 4.6:** Bestimmung der relativen Affinität  $K_a^{\text{rel}}$  des mAk HPT-101 mittels des Alanin-Scans. Die auf der  $x$ -Achse angegebenen Peptidaminosäuren wurden im Referenz-Peptid durch ein Alanin ersetzt und stehen repräsentativ für die verschiedenen Tau-Isoformen. (a) Das Messergebnis aus den EILSA-Messungen. Die relative Absorption ist direkt proportional zur Affinität des mAk HPT-101 und ist wie folgt zu deuten: eine hohe Absorption entspricht einer hohen Affinität, niedrige Absorptionen einer geringen Affinität. Nach den Kriterien aus Singer *et al.* lassen sich anhand dieser Daten vier essentielle ([pThr231]/[Lys234]/[pSer235]/[Pro236]), zwei sekundäre ([Pro232]/[Pro233]) und eine nicht-essentielle Aminosäure ([Ser237]) bestimmen [127]. Diese Festlegung bezieht sich auf den Absorptionswert der Wechselwirkung zwischen dem Referenz-Peptid und mAk HPT-101. Der blaue Balken gibt den Hintergrund an. Die gezeigten Daten stehen repräsentativ für mehrere Messungen. (b) Die relative Affinitätskonstante  $K_a^{\text{rel}}$  ist definiert als Quotient aus on- und off-Rate und kann damit aus den kraftspektroskopischen Messungen bestimmt werden. Es wird der gleiche Trend beobachtet wie für das ELISA-Ergebnis. Somit lassen sich dieselben essentiellen, sekundären und nicht-essentiellen Aminosäuren definieren. Die Aminosäure [Pro236] nimmt jedoch eine Sonderrolle ein (siehe Text).

Aminosäure entspricht einer nicht-essentiellen. Die restlichen Aminosäuren (Absorptionswert  $1 \leq A_{\text{rel.}} \leq 3$ ) werden als sekundäre Aminosäuren bezeichnet, deren Austausch zur Folge hat, dass der mAk HPT-101 an sein Zielepitop bindet, die Stärke und Dauer der Interaktion jedoch stark beeinflusst ist. Die Festlegung dieser Einteilung bezieht sich auf den Absorptionswert der Wechselwirkung zwischen dem originalen Referenz-Peptid Tau[pThr231/pSer235] und mAk HPT-101. Somit lassen sich anhand dieser Klassifizierung insgesamt vier essentielle (Tau<sup>Iso</sup>[pThr231]/[Lys234]/[pSer235]/[Pro236]), zwei sekundäre (Tau<sup>Iso</sup>[Pro232]/[Pro233]) und eine nicht-essentielle Aminosäure (Tau<sup>Iso</sup>[Ser237]) identifizieren.

Das zweite Verfahren zur Bestimmung von  $K_a^{\text{rel}}$  stützt sich auf die Resultate der Einzelmolekülmessungen aus den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2. In diesem Fall muss die relative Affinitätskonstante berechnet werden. Nach Gl. 2.10 ist diese definiert als der Quotient aus on- und off-Rate. Die off-Rate  $k_{\text{off}}^0$  im Gleichgewicht folgt direkt aus der Beziehung:  $k_{\text{off}}^0 = \tau_0^{-1}$ . Die on-Rate  $k_{\text{on}}$  hingegen kann über die Bindungshäufigkeiten  $h_B$  anhand folgender Beziehung bestimmt werden. Ausgehend vom Massenwirkungsgesetz (vgl. Gl. 2.9) gilt unter Vernachlässigung des Dissoziationsprozesses:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}}[A][B], \quad (4.9)$$

wobei  $[AB]$  die in der Zeit  $dt$  geformten Rezeptor-Ligand-Paare sind.  $[A]$  und  $[B]$  stellen die Konzentrationen der Edukte (vgl. Abschnitt 2.1.2.1) dar, was gleichbedeutend mit der Anzahl der auf den Kolloiden immobilisierten Antikörper- und Peptidmoleküle ist. Unter der Voraussetzung, dass die Oberflächenbeladung konstant für alle Mikropartikel ist, werden  $[A]$  und  $[B]$  zu Konstanten, die für den Vergleich einzelner Messungen untereinander vernachlässigt werden können. Diese Annahme stellt jedoch nur eine Idealisierung dar, wie an den Fehlerbalken der Bindungshäufigkeiten (vgl. Abb. 4.1) gesehen werden kann<sup>48</sup>. Für die Abschätzung der on-Rate anhand von  $h_B$  soll diese Hypothese jedoch aufrechterhalten werden. Im Weiteren wird angenommen, dass die Anzahl der entstandenen Rezeptor-Ligand-Komplexe proportional zur Bindungshäufigkeit  $h_B$  und dem Zeitintervall, in dem diese sich bilden,  $dt = 1\text{ s}$  (vgl. Abschnitt 3.1.5) ist. Somit ist die on-Rate  $k_{\text{on}} \propto h_B$ . Daraus folgt die relative Affinitätskonstante zu [65]:

$$K_a^{\text{rel.}} = h_B \tau_0. \quad (4.10)$$

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Einheit der hier definierten Konstanten  $K_a^{\text{rel.}}$  in Sekunden angegeben wird, weswegen ein Unterschied zur eigentlichen Affinitätskonstante  $K_a$  besteht, deren Einheit  $1/\text{M}$  ist. Im Zusammenhang damit ist weiterhin hervorzuheben, dass sich die Assoziationsrate freier Moleküle aus Translations- und Rotationsdiffusion zusammensetzt, so dass eine korrekte Orientierung für die Bindung erreicht wird. In den hier durchgeführten kraftspektroskopischen Experimenten sind die Rezeptoren und Liganden jedoch auf Mikropartikeln immobilisiert und werden durch Annähern aufeinander gedrückt (vgl. Abschnitt 3.1.5). Somit sind Rückschlüsse auf die on-Rate anhand der Bindungshäufigkeit  $h_B$  nur bedingt möglich. Es kann jedoch angenommen werden, dass sich die Assoziationsraten für kleine Moleküle nur geringfügig unterscheiden. Somit ist der Einfluss der on-Rate auf  $K_a^{\text{rel.}}$  für den direkten Vergleich mehrerer, ähnlicher Antikörper-Peptid-Interaktionen gering. Die Affinitätskonstante korreliert nunmehr mit der off-Rate  $k_{\text{off}}$  bzw. der Lebensdauer einer Bindung  $\tau_0$  [51].

In Abb. 4.6 (b) ist das kraftspektroskopische Ergebnis der relativen Affinitätsbestimmung des mAk HPT-101 für den Alanin-Scan dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Affinitätskonstante für die Wechselwirkungen zwischen vier Peptiden ( $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]/[\text{Lys234}]/[\text{pSer235}]/[\text{Pro236}]$ ) und dem mAk HPT-101 nur sehr kleine Werte annimmt ( $K_a^{\text{rel.}} < 0,5\text{ s}$ ), wohingegen die Affinität ( $K_a^{\text{rel.}} = 4(2)\text{ s}$ ) für die Interaktion mit dem Peptid  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Ser237}]$  im Bereich von  $\text{Tau}[\text{pThr231}/\text{pSer235}]$  (in Abb. 4.6 als „Referenz“ bezeichnet) liegt. Mittlere Affinitätswerte von  $K_a^{\text{rel.}} = 1,4(9)\text{ s}$  bzw.  $K_a^{\text{rel.}} = 2,5(9)\text{ s}$  werden für die Peptide  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{Pro232}]/[\text{Pro233}]$  beobachtet (vgl. Tab. 4.3). Die ausgeprägte Aufspaltung zwischen den relativen Affinitätskonstanten resultiert hauptsächlich aus den großen Unterschieden in der Bindungslebensdauer  $\tau_0$  der einzelnen Komplexe (vgl. Abb. 4.3 (a)), die sich teilweise um einen Faktor von 10 unterscheiden. Die Bindungshäufigkeiten  $h_B$  hingegen variieren deutlich weniger (maximal um Faktor 2, vgl. Abb. 4.1).

<sup>48</sup>Eine ausführliche Diskussion über die Verteilung der auf den verschiedenen Kolloiden verankerten Moleküle kann in den Abschnitten 3.2.3.1 und 4.2.1 gefunden werden.

**Tabelle 4.3:** Übersicht über die Affinitätswerte aus den ELISA- sowie aus den Kraftspektroskopiemessungen in Abhängigkeit der ausgetauschten Aminosäuren (AS). Die gemessene Absorption  $A_{\text{rel}}$  ist direkt proportional zur relativen Affinitätskonstante  $K_{\text{a}}^{\text{rel}}$ , wohingegen diese für die DFS-Messungen nach Gl. 4.10 berechnet wird. Anhand dieser Werte erfolgt die Einteilung in essentielle, sekundäre sowie nicht-essentielle Aminosäuren. Die angegebenen Absorptionswerte (ELISA-Messung) stehen repräsentativ für mehrere Messungen. Die Messunsicherheiten für die relative Affinitätskonstante (DFS-Messung) werden über Fehlerfortpflanzung bestimmt [150]. Der Messfehler ist in Klammern angegeben und bezieht sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen.

substituierte AS	ELISA $A_{\text{rel}}$	DFS $K_{\text{a}}^{\text{rel}}$ [s]	Klassifizierung
Referenz	3,70	5(2)	k.A.
[pThr231]	0,07	0,04(3)	essentiell
[Pro232]	1,54	1,38(90)	sekundär
[Pro233]	2,23	2,50(94)	sekundär
[Lys234]	0,07	0,18(10)	essentiell
[pSer235]	0,03	0,37(22)	essentiell
[Pro236]	0,66	0,28(21)	essentiell
[Ser237]	3,33	4(2)	nicht-essentiell
Hintergrund	0,05	k.A.	k.A.

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass die ELISA- und kraftspektroskopischen Ergebnisse den gleichen Trend<sup>49</sup> zeigen, wobei es eine Ausnahme gibt. Interessanterweise zeigt sich für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und dem Peptid Tau<sup>Iso</sup>[Pro236] in den ELISA-Messungen eine zehnfach erhöhte Absorption im Vergleich zu den anderen essentiellen Aminosäuren (vgl. Abb. 4.6 (a)). In der Affinitätsbestimmung mittels kraftspektroskopischer Daten wird dieser Anstieg nicht beobachtet. Allerdings ergeben sich für diese Interaktion Abweichungen in den experimentell bestimmten Bindungsparametern. So ist zu beobachten, dass, entsprechend dem Trend für essentielle Aminosäuren, die Lebensdauer der Bindung abnimmt, im Gegensatz dazu aber die Bindungslänge  $x_{\text{ts}}$  im Bereich von sekundären bzw. nicht-essentiellen Aminosäuren liegt (vgl. Abb. 4.3). Anhand dieser Erkenntnisse kann vermutet werden, dass die getroffene Klassifizierung in essentielle, sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren zu grob und gegebenenfalls eine feinere Einteilung nötig ist. Da sich die Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern jedoch hauptsächlich auf die Bestimmung der Affinitätskonstante stützt und für deren Berechnung die Lebensdauer  $\tau_0$  der entscheidende Parameter ist [51], soll die Aminosäure [Pro236] den essentiellen zugeordnet werden. Somit werden die Aminosäuren [pThr231]/[Lys234]/[pSer235]/[Pro236] als essentielle, [Pro232]/[Pro233] als sekundäre sowie [Ser237] als nicht-essentielle Aminosäuren identifiziert. Dies ist in Überein-

<sup>49</sup>Es muss beachtet werden, dass die absoluten Zahlen für die Affinitätskonstante aus den ELISA- und den DFS-Messungen nicht direkt miteinander verglichen werden können, da im immunochemischen Ansatz die Antikörpermoleküle frei in Lösung diffundieren und nur die Peptide auf einem Substrat verankert sind. In den DFS-Messungen hingegen sind beide Interaktionspartner auf Kolloiden immobilisiert. Somit unterscheidet sich die Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$  in beiden Ansätzen (siehe Text), was sich auf deren Absolutzahlen auswirkt. Die erhaltenen Trends sind jedoch vergleichbar [54].

stimmung mit den Resultaten aus Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2.

#### 4.1.6 Struktursimulationen der Tau-Peptide<sup>50</sup>

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zeigen eine signifikante Verringerung der Affinität zwischen mAk HPT-101 und Peptid Tau[pThr231/pSer235], wenn eine essentielle oder sekundäre Aminosäure durch ein Alanin ausgetauscht wird. Gründe für die Affinitätsunterschiede können beispielsweise durch chemische Modifikationen hervorgerufene Änderungen der Peptidkonformation sein. Wie bereits in Abschnitt 2.1.2.1 erwähnt wurde, spielt die Topologie der Rezeptoren und Liganden eine essentielle Rolle für deren spezifische Interaktion, welche durch die Änderung der Aminosäuresequenz beeinflusst werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass das biphosphorylierte Peptid in hydrophober Umgebung eine „ $\beta$ -Windungsstruktur“ um die Aminosäure [Thr231] ausbilden kann [151]. Weiterhin ist mittels einer Studie an längeren Tau-Peptiden gezeigt worden, dass Phosphatgruppen an den Aminosäuren [Thr231] und [Ser235] eine kurze  $\alpha$ -Helix nach den Phosphorylierungsstellen stabilisieren können [152]. Eine weitere Untersuchung stellte fest, dass der Austausch von geladenen Gruppen durch ein Alanin ebenfalls eine Abschwächung der Antikörper-Peptid-Interaktion zur Folge hat [153].

Um zu überprüfen, ob der Affinitätsverlust auf strukturelle Änderungen im Tau-Peptid durch den Austausch einzelner Epitopaminosäuren durch ein Alanin zurückgeführt werden kann, wurden Molekulardynamik-(MD)-Simulationen durchgeführt [154–156]. Diese Methodik basiert darauf, die Dynamik eines isolierten Systems, das aus  $N$  Atomen besteht, durch Lösen eines Systems gekoppelter partieller Differentialgleichungen zu beschreiben. Für das  $i$ -te Atom lautet die newtonsche Bewegungsgleichung:

$$\vec{F}_i = -\nabla_{\vec{r}_i} E(\vec{r}^N) = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2}, \quad (4.11)$$

wobei  $\vec{r}^N = (\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$  der Positionsvektor und  $E(\vec{r}^N)$  die potentielle Energiefunktion ist. Um die Struktur der Tau-Peptide in Abhängigkeit der ersetzten Aminosäuren zu bestimmen, wird zur Lösung der  $3N$ -Gleichungen vom Typ 4.11 auf klassische MD zurückgegriffen<sup>51</sup>. „Klassisch“ bezieht sich in diesem Fall darauf, dass die verwendeten Energiefunktionen nicht für Elektronen gültig sind, wodurch der Rechenaufwand reduziert wird, da eine explizite Lösung der Schrödinger-Gleichung nicht notwendig ist. Ein Nachteil dieser Methodik ist jedoch, dass die effektiven Potentiale für jede Atombindung innerhalb des Peptids bestimmt werden müssen. So besitzt beispielsweise die Bindung zwischen einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom eine andere Energiefunktion als die zwischen einem Kohlenstoff- und einem Sauerstoffatom. Eine weitere Annahme, die in die für diese Arbeit durchgeführten klassischen

<sup>50</sup>Die Struktursimulationen der einzelnen Tau-Peptide wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. S. Angioletti-Uberti (Arbeitsgruppe Theorie und Simulation von Vielteilchensystemen, Prof. Dr. J. Dzubiella, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt.

<sup>51</sup>In nicht-klassischen MD-Simulationen wird die Energiefunktion durch das Lösen der Schrödinger-Gleichung für feste Atompositionen (Born-Oppenheimer-Näherung [157]) bestimmt. Diese Herangehensweise ist jedoch sehr rechenintensiv und ermöglicht nur Simulationsdauern von wenigen Pikosekunden.

MD-Simulationen einfließt, sind nicht-polarisierbare Kraftfelder. Weiterhin wird das Peptid als frei diffundierend angenommen.

Zur Lösung der gekoppelten newtonschen Bewegungsgleichungen wird der MD-Code GRO-MACS<sup>52</sup> verwendet [158]. Zur Realisierung der experimentellen Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.1.1), wird die Temperatur  $T$  mit Hilfe eines Berendsen-Thermostates, sowie die Anzahl  $N$  und das Volumen  $V$  der simulierten Peptide konstant gehalten ( $NVT$ - bzw. kanonisches Ensemble). Periodische Randbedingungen gewährleisten, dass sich das System in alle Richtungen mit der Periodizität  $L = 10$  nm wiederholt. Dies ist notwendig, damit die Peptidstruktur in einem hinreichend großen Wasserbad simuliert wird<sup>53</sup>. Zu Beginn der Simulation werden die Peptidatome entsprechend der primären Struktur des Tau-Peptids angeordnet. Darauf folgend werden 4000 Wassermoleküle hinzugefügt, sodass diese sich nicht mit den Peptidatomen überlagern. Um die Dynamik des Systems zu berechnen, wird anschließend für jede Atomposition die newtonsche Bewegungsgleichung 4.11 für einen Zeitschritt von  $dt = 3$  fs numerisch gelöst und das System in den nächsten Zustand mit neuen Positionskoordinaten überführt. Darauf folgend wird die Energiefunktion  $E(\vec{r}^N)$  für die neue Position berechnet. Diese Prozedur wird für  $10^8$  Zeitschritte wiederholt. Nach einer Übergangszeit, in der sich das System äquilibriert, werden die Atompositionen alle 10 ps detektiert und abgespeichert, woraus sich deren Trajektorien ergeben. Dieses Vorgehen wird für das Ausgangspeptid Tau[pThr231/pSer235] sowie für die sieben Isoformen gewählt. Durch die Analyse der Simulationsdaten für die einzelnen Peptide kann auf strukturelle Änderungen im Vergleich zum ursprünglichen Peptid geschlossen werden. In der Auswertung werden dabei folgende Größen berücksichtigt: die Wahrscheinlichkeitsverteilung des End-zu-End Abstandes<sup>54</sup> und des Gyrationradius<sup>55</sup> der Peptide, die Winkelverteilung um die ersetzte Aminosäure, die Abstandsverteilung zwischen der mutierten und der phosphorylierten Aminosäure sowie das Auftreten sekundärer Strukturen, wie einer  $\alpha$ -Helix oder eines  $\beta$ -Faltblattes. Weiterhin wird auf das Prinzip der *Sketch-Maps* zurückgegriffen, welches durch die Analyse der freien Energielandschaft ermöglicht, nicht triviale, stabile Strukturen zu detektieren und deren Korrelation zu den beobachteten  $\Delta G$ -Werten (vgl. Tab. 4.1) zu überprüfen [160].

Die Analyse der Simulationsdaten anhand der eben aufgezählten Kriterien ergab nur geringfügige strukturelle Änderungen der modifizierten Peptide im Vergleich zum Ausgangspeptid Tau[pThr231/pSer235]. Diese können jedoch vernachlässigt werden, da sie zum einen innerhalb des statistischen Rauschens liegen und zum anderen nicht mit dem beobachteten Trend für die Affinitätskonstante  $K_a$  korrelieren. Somit ist zu schlussfolgern, dass unabhängig davon, welche Epitopaminosäure durch ein Alanin ausgetauscht wird, die Struktur als auch die geometrische Anordnung des Tau-Peptids im Rahmen der Simulationsgenauigkeit erhalten bleiben. Strukturelle Modifikationen im Peptid können demnach als Erklärung für die

<sup>52</sup>GROningen MAchine for Chemical Simulation

<sup>53</sup>Für nicht-periodische Randbedingungen würde das Peptid in einer kleinen Box der Kantenlänge  $L = 10$  nm simuliert werden, was zur Folge haben kann, dass sich die Struktur des Wassers ändert. Dies kann Auswirkungen auf die Peptidstruktur haben.

<sup>54</sup>Der End-zu-End Abstand eines Polymers ist definiert als der Betrag des End-zu-End Vektors und gibt die Distanz zwischen beiden Polymerenden an [159].

<sup>55</sup>Der Gyrationradius eines Polymers gibt dessen räumliche Ausdehnung an [159].

unterschiedlichen Affinitäten zwischen mAk HPT-101 und den sieben Tau-Isoformen ausgeschlossen werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Struktursimulationen darauf hin, dass die Affinitätsunterschiede durch lokale Effekte hervorgerufen werden. Diese können einerseits elektronischer Natur, wie die Änderung der Ladungsverteilung um die Antikörperbindungsstelle, sein, die die attraktive Wechselwirkung zwischen Epitop und mAk HPT-101 beeinflussen. Andererseits können auch lokale Änderungen der Wasserstruktur um die ersetzte Aminosäure auftreten, welche sich auf die Affinitätskonstante auswirken.

Abschließend soll erwähnt werden, dass die Simulationsresultate nur im Rahmen der oben beschriebenen Hypothesen zu interpretieren sind. Verfeinerte Ergebnisse können gegebenenfalls durch die Annahme polarisierbarer Kraftfelder erreicht werden. Diese berücksichtigen unter anderem, dass sich die effektiven Ladungen der Peptidatome dynamisch in Abhängigkeit des Umgebungsmediums ändern können. Damit werden beispielweise Polarisierungseffekte der Elektronenwolke um das Peptid berücksichtigt, die zu einer effektiven Änderung der Struktur führen könnten. In den hier durchgeführten Simulationen wird ebenfalls nicht beachtet, dass die Tau-Peptide kovalent auf Melaminharz-Kolloiden verankert sind, wodurch sich chemische Modifikationen in der Aminosäuresequenz möglicherweise anders auf die Peptidstruktur auswirken, als das der Fall für „freie“ Peptide ist. Ferner muss berücksichtigt werden, dass die Affinitätskonstante ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Peptid darstellt. Um somit Rückschlüsse auf die Affinitätsänderungen zu ziehen, muss in den Simulationen zumindest die Bindungstasche des Antikörpers mitberücksichtigt werden. Dadurch können strukturelle Anpassungen während der Interaktion stattfinden (vgl. Abschnitt 2.1.2.1, induzierte Passung).

#### 4.1.7 Schlussbemerkung zu Abschnitt 4.1

In Kapitel 4.1 wurden die Wechselwirkungen zwischen dem phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper HPT-101 und dem biphosphorylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235] untersucht. Ziel der Messungen war es, das Antikörperepitop anhand einzelner Aminosäuren zu bestimmen und Kriterien zur Festlegung von essentiellen, sekundären und nicht-essentiellen Aminosäuren zu finden. Zur experimentellen Realisierung kam der sogenannte Alanin-Scan zum Einsatz. Dabei wurden aus dem Ausgangspeptid durch sukzessives Ersetzen einzelner Aminosäuren durch ein Alanin insgesamt sieben Tau-Isoformen hergestellt. Die Interaktionen zwischen Tau[pThr231/pSer235], den sieben Isoformen und mAk HPT-101 wurden anschließend mittels ELISA und dynamischer Kraftspektroskopie untersucht.

Anhand der ELISA-Messungen konnten durch Kriterien nach Singer *et al.* [127] insgesamt vier essentielle ([pThr231]/[Lys234]/[pSer235]/[Pro236]), zwei sekundäre ([Pro232]/[Pro233]) und eine nicht-essentielle Aminosäure ([Ser237]) im Tau-Peptid identifiziert werden (vgl. Abb. 4.6 (a)). Essentielle Aminosäuren zeichneten sich in diesem Fall dadurch aus, dass in ihrer Abwesenheit der monoklonale Antikörper nicht oder nur noch schwach an das Tau-Peptid bindet. Beim Austausch sekundärer Aminosäuren wurde eine Bindung ausgebildet, diese war jedoch deutlich schwächer und kurzlebiger im Vergleich zur Wechselwirkung zwischen dem

Antikörper und dem Referenz-Peptid. Nicht-essentielle Aminosäuren haben keinen Einfluss auf die spezifische Erkennung des Peptids durch den mAk HPT-101.

Die Untersuchung der einzelnen Wechselwirkungen anhand von relativen Bindungshäufigkeiten zeigte, dass  $h_B$  für vier Peptide, bei denen die ausgetauschte Aminosäure in den zuvor durchgeführten ELISA-Messungen als essentiell bestimmt wurde, um das Zweifache niedriger ist als für die Interaktion zwischen dem mAk HPT-101 und dem Ausgangspeptid. Für sekundäre und nicht-essentielle Aminosäuren konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine Abhängigkeit gefunden werden. Trotz des beobachteten Trends waren die gemessenen Unterschiede nicht signifikant (Median-Test,  $\alpha = 10\%$ ).

In Abschnitt 4.1.2 wurden durch die Auswertung der Abrisskrafthistogramme mit dem DHS-Modell die Lebensdauer einer Bindung im kraftfreien Zustand  $\tau_0$ , die Bindungslänge  $x_{ts}$  und die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  bestimmt. Für die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Peptiden und mAk HPT-101 ergaben sich folgende Kriterien zur Bestimmung der drei Aminosäureklassen, die sich jeweils an den Bindungsparametern der Interaktion zwischen dem Referenz-Peptid Tau[pThr231/pSer235] und dem Antikörper orientierten: Die niedrigsten Werte für  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  wurden für essentielle Aminosäuren beobachtet. Dies traf zu für die Peptidaminosäuren [pThr231], [Lys234], [pSer235] und [Pro236]. Sekundäre Aminosäuren wiesen eine verkürzte Bindungslebensdauer auf, die Bindungslänge sowie die Potentialtiefe blieben jedoch unverändert ([Pro232] und [Pro233]). Für nicht-essentielle Aminosäuren ([Ser237]) wurden keine Änderungen in den Bindungsparametern beobachtet. Um sicherzustellen, dass die bestimmten Werte für  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  nicht von der Wahl des Modells zur Auswertung der Messdaten abhängen, wurden diese mit den Ergebnissen der Theorie nach Bell-Evans und Friddle-De Yoreo verglichen (vgl. Abschnitt 4.1.3). Im Rahmen der Fehlergrenzen wurde Übereinstimmung zwischen allen drei Modellen gefunden.

Ausgehend von den Werten der Bindungshäufigkeit  $h_B$ , der Bindungslänge  $x_{ts}$  und der freien Aktivierungsenergie  $\Delta G$  wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich der Dissoziationsprozess des mAk HPT-101/Tau[pThr231/pSer235]-Komplexes durch die Bindungsparameter der beiden monophosphorylierten Peptide  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pThr231}]$  und  $\text{Tau}^{\text{Iso}}[\text{pSer235}]$  darstellen lässt. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass diese beiden Peptide das jeweils komplementäre Epitop des biphosphorylierten Peptids besitzen. Zur Überprüfung dieser Behauptung wurde das Superpositionsmodell beschrieben und in Stangner *et al.* [54] veröffentlicht. Durch die Annahme zweier unabhängiger Bindungen konnte die wahrscheinlichste Abrisskraft des Dissoziationsprozesses der Bindung zwischen Tau[pThr231/pSer235] und mAk HPT-101 bestimmt werden (vgl. Abschnitt 4.1.4). Abweichungen ergaben sich in der Breite und Höhe der berechneten Abrisskrafthistogramme. Für eine vollständige Übereinstimmung mit den experimentellen Daten müssen somit weitere Aspekte, wie Wechselwirkungen zwischen den beiden Bindungsstellen oder der Einfluss der umliegenden essentiellen und sekundären Aminosäuren, beachtet werden.

Für einen adäquaten Vergleich zwischen den ELISA- und DFS-Messungen wurden für Letztere die Affinitätskonstanten aus den Bindungsparametern der entsprechenden Wechselwirkungen berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass die relative Affinitätskonstante  $K_a^{\text{rel}}$  einer Rezeptor-Ligand-Bindung proportional zum Produkt aus Bindungshäufigkeit  $h_B$  und der in-

versen Lebensdauer einer Bindung  $\tau_0$  ist. Wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben, folgen die berechneten Affinitätswerte der verschiedenen Peptide dem Trend der zuvor gefundenen Aminosäureinteilung. Die niedrigsten relativen Affinitäten wurden für die vier für die Bindung essentiellen Aminosäuren beobachtet. Sekundäre Aminosäuren zeigten mittlere Affinitäten, wohingegen sich für nicht-essentielle Aminosäuren keine Änderung in  $K_a^{\text{rel.}}$  ergab. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den ELISA-Resultaten. Dass mit beiden Methoden der identische Trend beobachtet wurde ist besonders hervorzuheben, da es sich um experimentell unterschiedliche Herangehensweisen handelt. So wurden in den hier durchgeführten Kraftspektroskopieexperimenten beide Interaktionspartner auf Kolloiden immobilisiert, wohingegen die Antikörper in den ELISA-Messungen frei in Lösung sind. Somit unterscheiden sich die Assoziationsraten  $k_{\text{on}}$ , die direkt in die Berechnung der relativen Affinitätskonstanten eingehen. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass für kleine Moleküle  $K_a^{\text{rel.}}$  von der Dissoziationsrate dominiert wird [51].

In Abschnitt 4.1.6 wurde mittels Molekulardynamik-Simulationen überprüft, ob sich die aufgetretenen Affinitätsunterschiede durch strukturelle Änderungen in der Peptidkonformation erklären lassen, die durch den Austausch einzelner Aminosäuren durch ein Alanin auftreten können. Im Rahmen der Simulationsgenauigkeit konnte bei der Auswertung verschiedener Parameter (z.B. die Wahrscheinlichkeitsverteilung des End-zu-End Abstandes und des Gyrationradius der Peptide) jedoch ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Trend in den relativen Affinitätswerten durch Konformationsänderungen hervorgerufen wird. Die Simulationsergebnisse deuten darauf hin, dass die Unterschiede in  $K_a^{\text{rel.}}$  durch lokale Effekte, wie die Verschiebung der Ladungsverteilung um die Antikörperbindungsstelle oder Änderung der Wasserstruktur um die ersetzte Aminosäure, bedingt sind.

Insgesamt kann aus den ELISA- und den kraftspektroskopischen Experimenten geschlossen werden, dass Methoden-unabhängige Kriterien zur Definition essentieller, sekundärer und nicht-essentieller Aminosäuren festgelegt werden konnten. Diese basieren ausschließlich auf den Bindungseigenschaften der untersuchten Antikörper-Peptid-Komplexe. Es zeigt sich, dass für die spezifische Erkennung von Tau[pThr231/pSer235] durch mAk HPT-101 nicht ausschließlich ein spezielles Phosphorylierungsmuster benötigt wird, sondern auch benachbarte Aminosäuren des Antikörperepitops im gleichen Maße zur Bindung beitragen.

## 4.2 Wechselwirkungen zwischen dem monoklonalen Antikörper HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231]

Wie im vorhergehenden Abschnitt 4.1 gezeigt wurde, können Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen unter Verwendung von dynamischer Kraftspektroskopie genau untersucht werden. Für den Vergleich mehrerer solcher Interaktionen untereinander werden charakteristische Parameter, wie zum Beispiel die Bindungshäufigkeit  $h_B \propto k_{on}$ , die Lebensdauer einer Bindung  $\tau_0 = k_{off}^{-1}$  und die Affinitätskonstante  $K_a$ , benötigt. Die Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeit ist häufig stark fehlerbehaftet, sodass ein adäquater Vergleich anhand dieses Parameters oft nicht aussagekräftig ist (vgl. Abschnitt 4.1.1). Weiterhin geht die Assoziationsrate  $k_{on}$ , die proportional zu  $h_B$  ist, in die Berechnung der Assoziationskonstanten  $K_a$  ein, wodurch sich die verhältnismäßig große Messunsicherheit auch in diesem Parameter widerspiegelt. Ausschlaggebend für die Schwankungen in der Messung von  $h_B$  ist die Variation der Oberflächenbeladung  $\Sigma$  auf den einzelnen Mikropartikeln<sup>56</sup>. Somit muss zur Reduktion des Messfehlers der relativen Bindungshäufigkeit eine gleichmäßigere Oberflächenbeladung auf allen Mikropartikeln erreicht werden. Eine Möglichkeit zu Realisierung dieses Vorhabens ist die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Peptiden. Nach deren Verankerung auf den Kolloiden können diese anhand ihrer Fluoreszenzintensität an einem FACS-Spektrometer (vgl. Abschnitt 3.1.9) sortiert werden. Die daraus entstandene Partikelpopulation besitzt eine gleichmäßigere Oberflächenbeladung und weist einen geringeren Fehler in den Bindungshäufigkeitsmessungen auf als unsortierte Kolloide. Zur Demonstration dieses Verfahrens sollen im Folgenden die Wechselwirkungen zwischen dem phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörper HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten, monophosphorylierten Peptid Tau[Fl-pThr231] betrachtet werden. Dazu werden die Tau-beschichteten Kolloide mit einem FACS-Spektrometer charakterisiert und die Bindungseigenschaften zwischen Rezeptor und Ligand mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie bestimmt. Die Messunsicherheit der extrahierten Parameter wird in Klammern angegeben und beziehen sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen des Messwertes, z.B.  $h_B = 23(16)\%$ .

### 4.2.1 Charakterisierung der Oberflächenbeladung von Mikropartikeln

Zur Charakterisierung der Oberflächenbeladung  $\Sigma$  anhand von FACS-Messungen muss zunächst der Zusammenhang zwischen der zugegebenen Menge an Tau-Peptid-Lösung während der Präparation  $V_{\text{Peptid}}$ , der resultierenden Oberflächenbeladung und der gemessenen Fluoreszenzintensität geklärt werden. Dazu werden Kolloide mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.2.2.1 präpariert. Die zugegebene Menge an Peptidlösung variiert dabei im Bereich von  $V_{\text{Peptid}} \in [0,5 - 20] \mu\text{L}$ . Anschließend wird aus

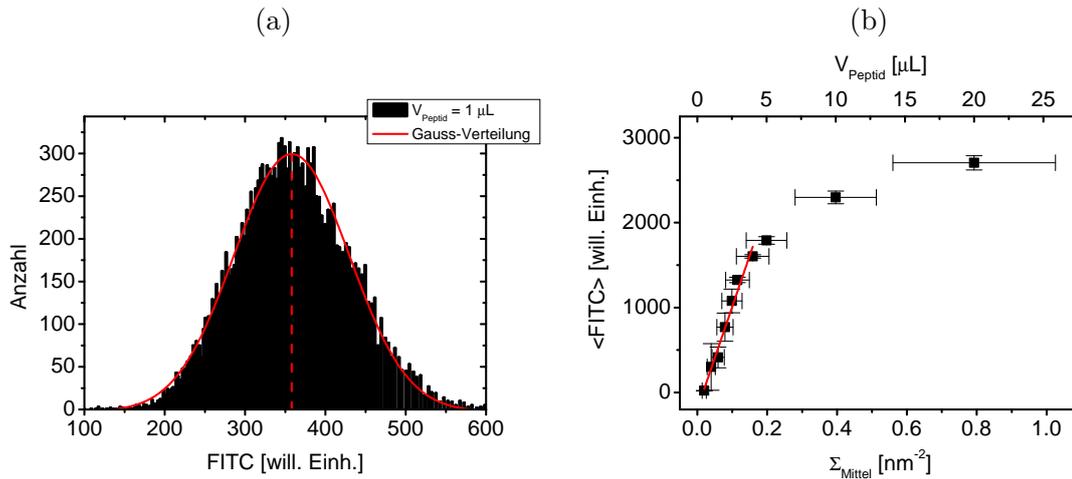
<sup>56</sup>Die Schwankungen in der Oberflächenbeladung auf den Mikropartikeln treten auch dann auf, wenn alle verwendeten Kolloide aus einem Präparationsansatz stammen. Diese Problematik wird in Abschnitt 4.2.1 diskutiert.

jedem Präparationsansatz die Fluoreszenzintensität von 17500 Kolloiden an einem FACS-Spektrometer gemessen. Der Detektionskanal (FITC, englisch: *Fluorescein isothiocyanate*) wird so gewählt, dass die charakteristische Emissionswellenlänge des Fluoresceinmoleküls detektiert wird<sup>57</sup>. Um auszuschließen, dass die verwendeten Melaminharz-Partikel nicht selber fluoreszenzaktiv sind, werden zunächst Kontrollmessungen mit blanken, unbehandelten Kolloiden durchgeführt. Es ergeben sich Intensitätswerte von  $\text{FITC} < 20$ . Abb. 4.7 (a) zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten FITC von insgesamt 17500 Kolloiden, die alle aus einem Präparationsansatz stammen ( $V_{\text{Peptid}} = 1 \mu\text{L}$ ). Es ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal der Partikel nicht konstant ist, sondern sich näherungsweise durch eine Gaußverteilung (rote Linie) beschreiben lässt. Unter der Annahme, dass die gemessene Intensität ein Maß für die Anzahl fixierter Peptide auf einem Kolloid ist, kann geschlussfolgert werden, dass die Oberflächenbeladung in gleicher Weise um eine mittlere Beladungsdichte  $\Sigma_{\text{Mittel}}$  (rot gestrichelte Linie) schwankt<sup>58</sup>. Rechts und links von diesem angestrebten Wert befinden sich Kolloide, die mehr bzw. weniger Peptide auf ihrer Oberfläche haben. Da die Bindungshäufigkeit  $h_B$  unter anderem mit der Anzahl zur Verfügung stehender Wechselwirkungspartner korreliert, kann die Verteilungsbreite mit den beobachteten Messunsicherheiten in Zusammenhang gebracht werden (vgl. Abschnitt 4.2.4). An dieser Stelle soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der Ausbildung einer spezifischen Bindung um einen stochastischen Prozess handelt (vgl. Abschnitt 2.1.2). Somit würden auch bei absolut identischer Oberflächenbeladung Schwankungen in den Bindungshäufigkeitsmessungen auftreten.

Abb. 4.7 (b) zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität  $\langle \text{FITC} \rangle$  von der Beladungsdichte  $\Sigma_{\text{Mittel}}$ . Ein Messpunkt gibt die Maximumsposition der Gaußverteilung aus (a) an. Dieser wird über drei voneinander unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Oberflächenbeladung  $\Sigma_{\text{Mittel}}$  berechnet sich über Gl. 3.9 aus den  $V_{\text{Peptid}}$ -Werten. Es soll erwähnt werden, dass sich der  $x$ -Fehler nur auf die Oberflächenbeladung bezieht. Das bei der Präparation verwendete Peptidvolumen  $V_{\text{Peptid}}$  kann deutlich genauer bestimmt werden ( $\Delta V_{\text{Peptid}} \approx 1\%$ ). Werden während der Präparation weniger als  $4 \mu\text{L}$  Peptid-Lösung  $V_{\text{Peptid}}$  verwendet, steigt die mittlere Intensität linear mit der Oberflächenbeladung bzw. mit  $V_{\text{Peptid}}$  (rote Linie). Oberhalb dieses Wertes wird  $\langle \text{FITC} \rangle$  nur noch langsam größer, bis schließlich eine Sättigung erreicht ist. Dieses Verhalten kann durch thermodynamische und kinetische Hemmung (englisch: *thermodynamic, kinetic hindrance*) erklärt werden, da die Kopplung zwischen Kolloidoberfläche und Tau-Peptid ausschließlich durch Diffusion bestimmt ist. Sind bereits viele Peptide auf dem Substrat verankert, wird der chemische Gradient zwischen Peptidlösung und Partikeloberfläche sehr gering, wodurch die Diffusion sehr langsam wird. Darüber hinaus müssen sich die bereits immobilisierten Peptide „strecken“, um weiteren Molekülen den Zugang zur Oberfläche zu gewährleisten. Dieser entropisch ungünstige Prozess resultiert in einer thermodynamischen Barriere, die eine weitere Erhöhung der Beladungsdichte unterbindet [162, 163]. Die eben beschriebenen Effekte müssen bei großen Beladungsdichten auch in Gl. 3.9 beachtet werden. Somit behält sie ihre Gültigkeit nur im linearen Bereich der  $\langle \text{FITC} \rangle$ - $\Sigma_{\text{Mittel}}$ -Beziehung.

<sup>57</sup>Das Emissionsspektrum reicht von  $\lambda = 490 - 620 \text{ nm}$  und besitzt ein Maximum bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  [161]. Für die hier durchgeführten Messungen detektiert der Kanal FITC eine Wellenlänge von  $\lambda = 520 \text{ nm}$ .

<sup>58</sup>Dieser Mittelwert wurde in Abschnitt 3.2.3.2 als optimale Beladungsdichte bezeichnet.

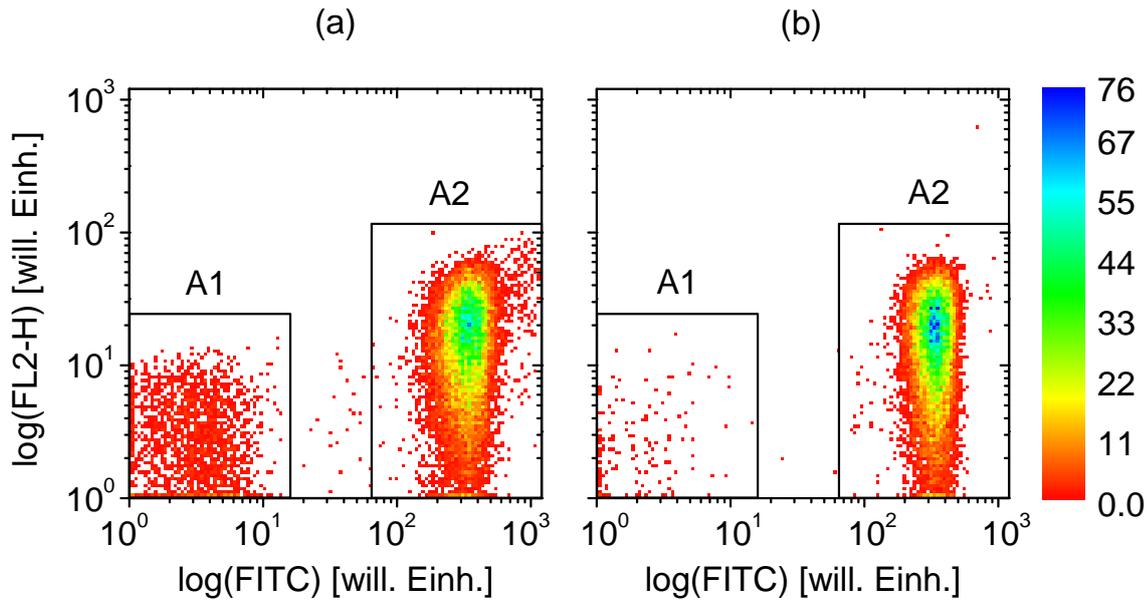


**Abbildung 4.7:** (a) Dargestellt ist die Verteilung der Oberflächenbeladung verschiedener Kolloide aus einem Präparationsansatz ( $V_{\text{Peptid}} = 1 \mu\text{L}$ , schwarze Balken). Als Maß für die Anzahl der auf der Partikeloberfläche verankerten Peptide wird die FITC-Intensität an einem FACS-Spektrometer gemessen. Es ist zu erkennen, dass sich die Verteilung durch eine Gaußkurve (rote Linie) beschreiben lässt. Die mittlere Beladungsdichte  $\Sigma_{\text{Mittel}}$  ist durch die gestrichelte rote Linie dargestellt. (b) Zusammenhang zwischen mittlerer  $\langle \text{FITC} \rangle$ -Intensität, Oberflächenbeladung  $\Sigma_{\text{Mittel}}$  und der bei der Präparation hinzugegebenen Peptidmenge  $V_{\text{Peptid}}$ .  $\langle \text{FITC} \rangle$  entspricht dem Maximum der Gaußverteilung aus (a) und wird über drei voneinander unabhängigen Messungen bestimmt. Für  $V_{\text{Peptid}} \leq 4 \mu\text{L}$  ist ein linearer Zusammenhang zwischen allen Größen zu erkennen (rote Linie). Oberhalb dieses Wertes steigt  $\langle \text{FITC} \rangle$  nur noch langsam an, was durch Sättigungseffekte (z.B. sterische Abstoßung der Peptide untereinander) zu begründen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse unabhängig von den verwendeten Tau-Peptid-Proben sind und für jede Präparation, die nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.2.2 durchgeführt wird, beobachtet werden. Weiterhin konnte ein direkter Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und Beladungsdichte der Kolloide nachgewiesen werden. In Kombination mit dem in Abschnitt 3.2.3.2 vorgestellten Verfahren kann die Oberflächenbeladung von Mikrokugeln durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Peptiden sehr genau charakterisiert werden.

#### 4.2.2 Vorsortieren von Mikropartikeln mit FACS

Um Kolloide mit ähnlichen Oberflächenbeladungen zu erhalten, werden die Tau[Fl-pThr231]-beschichteten Partikel an einem FACS-Spektrometer anhand ihrer Fluoreszenzintensität sortiert. In Abschnitt 4.2.1 wurde gezeigt, dass diese ein Maß für die Anzahl der auf den MF-Partikeln verankerten Peptide ist. In Abb. 4.8 (a) ist das Ergebnis dieses Experimentes vor dem Sortiervorgang dargestellt. Der Graph zeigt die gemessene Fluoreszenzintensität von Kanal FL2-H (Detektionswellenlänge  $\lambda = 580 \text{ nm}$ ) gegen Kanal FITC (vgl. Abschnitt 4.2.1) für zirka 18000 Partikel. Beide Detektionskanäle sind so gewählt worden, um das charakteristische Emissionsspektrum des Fluorescein-Moleküls aufzuzeichnen. Die verwendete Farbskala skaliert mit der Anzahl detektierter Kolloide in einer Histogrammklasse, wobei rot für eine niedrige und blau für eine hohe Partikelanzahl steht. Um die Vergleichbarkeit der Populationen vor und nach dem Selektionsprozess anhand des Farbschemas zu gewährleisten, wird dieses für beide Abbildungen konstant gehalten. Es ist zu erkennen, dass das zweidimensionale



**Abbildung 4.8:** 2-dimensionales Dichtehistogramm von Tau[Fl-pThr231]-beschichteten Kolloiden in Abhängigkeit des Intensitätssignals, detektiert von Kanal FL2-H und FITC, vor (a) und nach (b) dem Sortiervorgang. Die Farbskala entspricht der Anzahl der gezählten Kolloide in jeder Histogrammkategorie, wobei blau für eine hohe und rot für eine niedrige Kolloidanzahl steht. Um die Vergleichbarkeit zwischen beiden Graphen zu gewährleisten, wurde die identische Farbskala gewählt. (a) FACS-Signal, bevor der Sortierprozess gestartet wird. Es sind zwei Kolloidpopulationen sichtbar: A1 enthält unbeschichtete und A2 die Tau-Peptid-beschichteten Kolloide. Wie zu erkennen ist, können beide Verteilungen gut voneinander unterschieden werden. (b) Zeigt die gleiche Charge an Kolloiden wie in (a), nur nach dem Sortierprozess. Population A1 ist aussortiert, so dass nur noch die Zielpopulation A2 übrig ist. Die Breite von A2 ist signifikant reduziert ( $\Delta_w = 33\%$ ,  $F$ -Test,  $\alpha = 0,01$ ) und die Kolloiddichte im mittleren Bereich sichtbar erhöht (blaue Farbe).

le Dichtehistogramm vor dem Sortiervorgang zwei unterschiedliche Populationen enthält. Der Bereich um A1 beinhaltet unbeschichtete Partikel, wohingegen A2 die Zielpopulation mit den Peptid-beschichteten Kolloiden enthält. Um hervorzuheben, dass A1 und A2 getrennt voneinander im FACS-Spektrometer betrachtet werden können, werden der Messlösung zusätzliche blanke Partikel hinzugefügt. Durch die Auswahl eines schmalen Bereiches, der die grün gefärbte Region in der Mitte von A2 enthält, wird der Sortiervorgang gestartet. Nach dessen Beendigung wird die verbliebene Kolloidlösung erneut analysiert, um die Genauigkeit der Methodik zu überprüfen (vgl. Abb. 4.8 (b)). Offensichtlich ist Population A1 fast vollständig aussortiert. Die verbliebene Anzahl an Kolloiden in diesem Bereich ist kleiner als 0,5% bezogen auf die Gesamtpopulation. Um die Population A2 vor und nach dem Selektionsprozess anhand der Farbskala und der Verteilungsbreite zu vergleichen, wird die Anzahl an detektierten Kolloiden in diesem Bereich innerhalb der experimentellen Genauigkeit<sup>59</sup> konstant gehalten. Beim Vergleich von Bereich A2 aus Abb. 4.8 (a) und (b) wird zum einen ersichtlich, dass die Breite der Verteilung der Tau-beschichteten Kolloide reduziert ist. Zum anderen ist die Kolloiddichte in der Mitte von Population A2 nach dem Selektionsprozess deutlich erhöht, was durch die blaue Farbe hervorgehoben wird. Um die Unterschiede in der Breite beider Verteilungen zu quantifizieren, wird deren Standardabweichung  $\sigma_{\text{FITC}}$  sowie de-

<sup>59</sup>Die Genauigkeit des verwendeten FACS-Spektrometers beläuft sich auf  $\Delta_{\text{FACS}} \approx 3\%$ . Somit ergibt sich ein Populationsunterschied bei zirka 18000 detektierten Kolloiden von zirka 560 Partikeln.

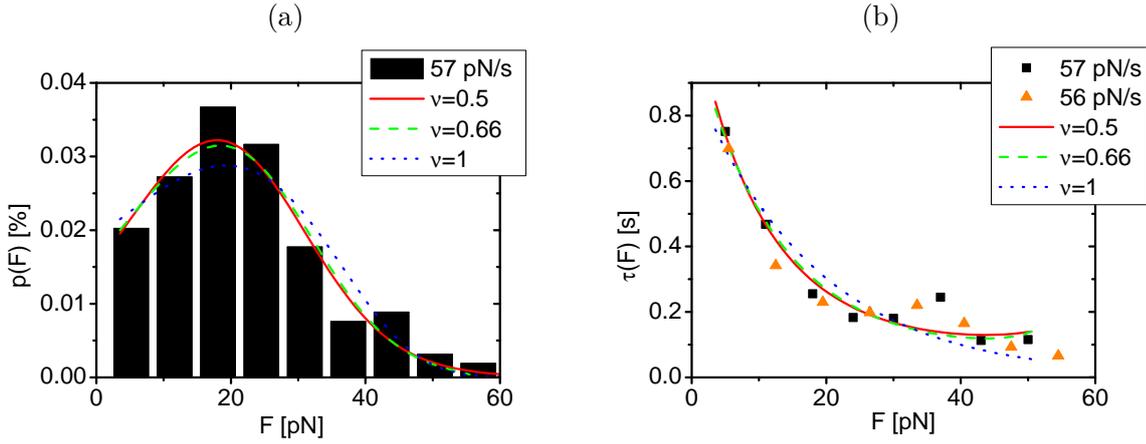
ren Varianzen berechnet. Sie variieren um zirka 33 %. Für ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  konnte mittels  $F$ -Test [164] nachgewiesen werden, dass diese Abweichungen signifikant sind. Die entsprechende Rechnung zum  $F$ -Test kann in Anhang A.4.1 gefunden werden.

Eine weitere Reduktion der Verteilungsbreite von A2 durch mehrmaliges Sortieren konnte keine besseren Ergebnisse erzielen, da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten FL2-H und FITC nach jedem Selektionsvorgang sehr stark abnehmen und bereits nach der zweiten Anregung unterhalb der Auflösungsgrenze des verwendeten FACS-Spektrometers liegen. Dies ist mit dem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe bei Mehrfachanregungen (englisch: *photobleaching*) zu erklären. Abhilfe könnte die Verwendung eines anderen Farbstoffes schaffen, der häufiger angeregt werden kann, ohne dabei an Emissionsintensität zu verlieren.

Abschließend kann gesagt werden, dass es durch Sortieren von fluoreszenzmarkierten Kolloiden mit einem FACS-Spektrometer möglich ist, Partikel mit ähnlicher Oberflächenbeladung  $\Sigma$  anzureichern. Weiterhin bietet diese Prozedur eine verlässliche Methode, verschiedene Rezeptor-Ligand-Systeme unter ähnlichen kolloidalen Beladungsdichten zu vergleichen, indem dasselbe FACS-Protokoll verwendet wird.

### 4.2.3 Dynamische Kraftspektroskopie

Aufgrund hydrophober Eigenschaften und der Nähe des Fluorescein-Moleküls zum Epitop des mAk HPT-104 muss überprüft werden, ob der Fluorophor die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Tau-Peptid und Antikörper beeinflusst. Dazu werden kraftspektroskopische Messungen durchgeführt, um die Interaktionen zwischen dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] und dem mAk HPT-104 zu charakterisieren. Die Peptid-beschichteten Kolloide werden durch das im vorherigen Abschnitt 4.2.2 beschriebene Verfahren vorsortiert. Die aus diesen Messungen hervorgehenden Bindungsparameter werden anschließend mit denen des nicht-markierten Peptids Tau[pThr231] verglichen. Abb. 4.9 (a) zeigt das Abrisskrafthistogramm bei einer Belastungsrate  $\dot{F} = 57(10)$  pN/s. Dazu werden die Kraft-Abstandskurven (vgl. Abschnitt 3.1.5) von zwölf verschiedenen Kolloidpaaren untersucht, woraus insgesamt 245 Einzelbindungsabrisse resultieren. Die Klassenbreite wird entsprechend nach der Regel von Scott [149] berechnet (vgl. Abschnitt 4.1.2). Um die Bindungsparameter zu bestimmen, wird aus den Abrisskrafthistogrammen die kraftabhängige Lebensdauer  $\tau(F)$  mit Hilfe von Gl. 2.33 berechnet. Das Ergebnis ist für eine Belastungsrate ( $\dot{F} = 57(10)$  pN/s) in Abb. 4.9 (b) dargestellt (schwarze Quadrate). Diese Daten werden anschließend mit Gl. 2.30 für  $\nu = 1/2$  (rote Linie),  $\nu = 2/3$  (grün gestrichelte Linie) und  $\nu = 1$  (blau gepunktete Linie) angepasst, woraus sich  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  ergeben. Wie zu erkennen ist, stimmen die Anpassungskurven für  $\nu = 1/2$  und  $\nu = 2/3$  über den gesamten Kraftbereich mit den experimentellen Daten überein. Abweichungen bei mittleren und großen Kräften treten nur für das Bell-Evans-Modell ( $\nu = 1$ ) auf. Die aus dieser Prozedur bestimmten Bindungsparameter werden anschließend in Gl. 2.31 eingesetzt und die theoretische Abrisskraftverteilung  $p_{DHS}(F)$  für die entsprechende Belastungsrate und Energielandschaften berechnet (vgl. Abb. 4.9 (a), durchgehende, gestrichelte und gepunktete Linie). Es kann Übereinstimmung mit den Messwerten festgestellt



**Abbildung 4.9:** (a) Abrisskraft-Histogramm bei einer Belastungsrate von  $\dot{F} = 57(10)$  pN/s für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] (schwarze Balken). Die Datenanpassung erfolgt mittels Gl. 2.31 für verschiedene Energielandschaftstypen  $\nu = 1/2$  (rote Linie),  $\nu = 2/3$  (grün gestrichelte Linie),  $\nu = 1$  (blau gepunktete Linie). Daraus ergeben sich die vorläufigen Bindungsparameter  $\tau_0, x_{ts}, \Delta G$ . (b) Kraftabhängige Lebensdauer  $\tau(F)$  der Rezeptor-Ligand-Bindung aus (a) bei derselben Belastungsrate  $\dot{F}$  (schwarze Quadrate). Die Datenpunkte werden aus dem Abrisskraft-Histogramm nach Gl. 2.33 berechnet und anschließend mit der Funktion  $\tau_{DHS}(F)$  (vgl. Gl. 2.30) angepasst. Um den Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes auf die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Tau[Fl-pThr231] und mAk HPT-104 zu bestimmen, wird die diskrete Lebensdauer  $\tau(F)$  mit der des unmarkierten Peptids bei vergleichbarer Belastungsrate verglichen (orange Dreiecke, die Daten stammen aus [53]). Wie zu sehen ist, stimmen beide Datensätze im Rahmen der Messgenauigkeit überein.

werden. Damit die Anwendbarkeit des DHS-Modells gewahrt ist, soll erwähnt werden, dass alle Abrisskräfte unterhalb der kritischen Kraft  $F_{krit}$  liegen (vgl. Abschnitt 2.1.2.4).

In Tab. 4.4 (linke Spalte) sind die erhaltenen Werte für die Bindungslängende  $\tau_0$ , die Bindungslänge  $x_{ts}$ , die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$  sowie die kritische Kraft  $F_{krit}$  in Abhängigkeit vom Energielandschaftsparameter  $\nu$  aufgelistet. Die Abweichungen der Bindungsparameter für  $\nu = 1/2$  und  $\nu = 2/3$  liegen im Rahmen der in Dudko *et al.* [97] angegebenen Schwankungen, nur die Werte für  $\nu = 1$  unterschätzen die Stärke der Bindung. Insgesamt kann gesagt werden, dass die charakteristische Bindungslänge für die Wechselwirkung zwischen Tau[Fl-pThr231] und mAk HPT104 zirka 0,4 nm und die Lebensdauer der Bindung 1 s beträgt. Die Höhe der Energiebarriere liegt im Bereich von  $3,5 k_B T$ . Trotz der beobachteten Schwankungen können Bindungsparameter als unabhängig von der Form der Energielandschaft bezeichnet werden [97].

Um den Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes auf die spezifische Interaktion zwischen Tau[Fl-pThr231] und mAk HPT-104 abzuschätzen, werden die erhaltenen charakteristischen Bindungsparameter mit denen der Wechselwirkung zwischen dem nicht-fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[pThr231] und demselben Antikörper verglichen. In Abb. 4.9 (b) ist die kraftabhängige Lebensdauer  $\tau(F)$  für das unmarkierte Peptid bei einer Belastungsrate von  $\dot{F} = 56(9)$  pN/s dargestellt (orange Dreiecke). Zur besseren Übersicht werden die Messdaten nur für eine Belastungsrate verglichen. Beide Datensätze stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Auch der Vergleich der Bindungsparameter  $\tau_0, x_{ts}$  und  $\Delta G$  (vgl. Tab. 4.4, rechte Spalte) folgt diesem Trend. Ein Unterschied zwischen beiden Bindungen kann somit nicht festgestellt werden. Damit ist bewiesen, dass der Fluorophor keinen messbaren Einfluss

auf die Wechselwirkung zwischen dem Peptid Tau[Fl-pThr231] und mAk HPT-104 hat.

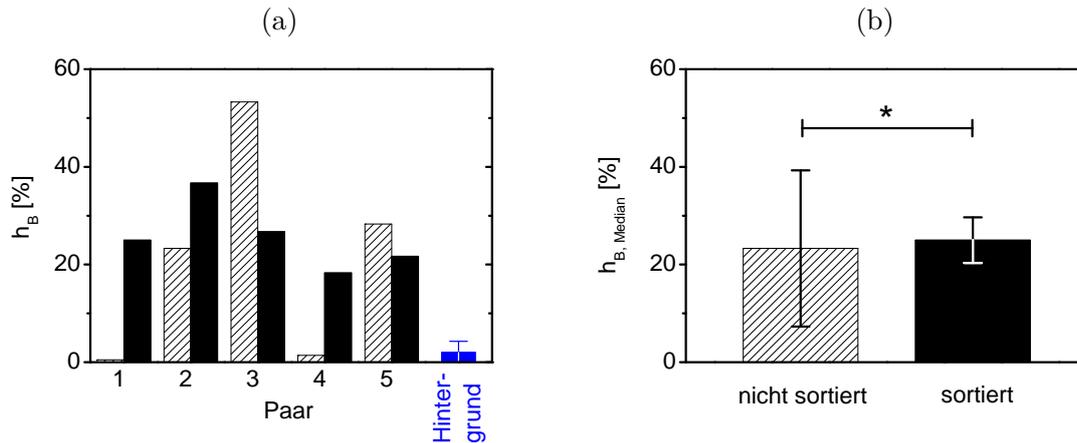
**Tabelle 4.4:** Übersicht über die Bindungsparameter  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$ ,  $\Delta G$  für die Wechselwirkung zwischen HPT-104 und Tau[Fl-pThr231] (linke Spalte) bzw. Tau[pThr231]<sup>60</sup> (rechte Spalte) für  $\nu = [1/2, 2/3, 1]$ . Im Rahmen der Messgenauigkeit können keine Unterschiede zwischen beiden Datensätzen festgestellt werden, woraus geschlossen wird, dass der Farbstoff keinen Einfluss auf die spezifische Wechselwirkung zwischen Peptid und Antikörper hat. Der Messfehler ist in Klammern angegeben und bezieht sich immer auf die letzten (Komma-)Stellen. Die Messunsicherheiten der Bindungsparameter werden nach der Anleitung in Abschnitt 3.1.8 berechnet, die von  $F_{krit}$  über Fehlerfortpflanzung [150].

$\nu$	Tau[Fl-pThr231]				Tau[pThr231]		
	$\tau_0$ [s]	$x_{ts}$ [nm]	$\Delta G$ [ $k_B T$ ]	$F_{krit}$ [pN]	$\tau_0$ [s]	$x_{ts}$ [nm]	$\Delta G$ [ $k_B T$ ]
1/2	1,15(7)	0,44(4)	3,7(4)	69(1)	1,04(10)	0,40(5)	4(1)
2/3	1,08(4)	0,37(4)	3(2)	56(23)	0,97(9)	0,33(4)	4(1)
1	0,92(2)	0,23(2)	k.A.	k.A.	0,84(6)	0,22(2)	k.A.

#### 4.2.4 Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeit und Reduktion der Datenvarianz

Nach dem Anreichern von Kolloiden mit ähnlicher Oberflächenbeladung  $\Sigma$  und dem Nachweis, dass der an das Tau-Peptid gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff keine Auswirkungen auf die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Antikörper hat, soll der Einfluss einer homogenen Beladungsdichte auf die Datenvarianz in Bindungshäufigkeitsmessungen  $h_B$  untersucht werden. Dazu werden die Bindungshäufigkeiten der Wechselwirkungen zwischen Tau[Fl-pThr231, sortiert]/Tau[Fl-pThr231, unsortiert] und mAk HPT-104 gemessen. Insgesamt werden 60 Kraft-Abstandskurven für jeweils fünf verschiedene Kolloidpaare detektiert und die Anzahl der auftretenden Bindungsdissoziationen gezählt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.10 (a) dargestellt. Für die nicht sortierten Tau-Partikel werden große Schwankungen in  $h_B$  beobachtet (schraffierte Balken). Diese variieren von einer Bindungshäufigkeit von 0,5 % für Paar 1 bis hin zu 53 % für Paar 3. Im Gegensatz dazu zeigen sich für die sortierten Tau-Kolloide mit einer homogenen Oberflächenbeladung (schwarze Balken) nur geringe Unterschiede innerhalb der verschiedenen Partikelpaare. Die Bindungshäufigkeit schwankt im Bereich von  $h_B \in [19, 36]$  %. Der blaue Balken beschreibt die Hintergrundinteraktionen, die aus unspezifischen Wechselwirkungen zwischen beispielsweise Kolloidoberfläche und Antikörper resultieren können. Mit einem Wert von  $\approx 2$  % sind diese jedoch vernachlässigbar (vgl. Abschnitt 3.2.3.1). Die Mediane der Bindungshäufigkeit für die unsortierten ( $h_{B, Median} = 23(16)$  %) und die sortierten Kolloide ( $h_{B, Median} = 25(5)$  %) unterscheiden sich nur geringfügig (vgl. Abb. 4.10 (b)). Die Datenvarianz ist im Fall der sortierten Kolloide um einen Faktor  $\approx 3$  im Vergleich zu den nicht sortierten Tau-Partikeln reduziert. Durch Anwendung des  $F$ -Tests wird nachgewiesen, dass diese Unterschiede bei einer statistischen Sicherheit von  $S = 95$  % ( $\alpha = 0,05$ ) signifikant

<sup>60</sup>Die Daten wurden aus [53] übernommen.



**Abbildung 4.10:** (a) Dargestellt ist die relative Bindungshäufigkeit  $h_B$  für fünf verschiedene Kolloidpaare. Die schraffierten Balken stehen für die Bindungshäufigkeitsmessungen, bei denen die Tau-Peptid-beschichteten Kolloide nicht vorsortiert wurden, und die schwarzen Balken für die sortierten Kolloide. Es werden große Schwankungen in  $h_B$  für die nicht sortierten Partikel beobachtet, wobei die relativen Bindungshäufigkeiten für die sortierten Kolloide nur geringfügig voneinander abweichen. Der blaue Balken beschreibt die Hintergrundinteraktionen, die mit einem Wert von 2% vernachlässigt werden können. (b) Median der relativen Bindungshäufigkeit für die unsortierten (schraffierter Balken) und die sortierten (schwarzer Balken) Kolloide. Die Median-Werte ergeben sich zu  $h_{B, \text{unsort.}} = 23(16)\%$  und zu  $h_{B, \text{sort.}} = 25(5)\%$ . Die Datenvarianz des Medians konnte signifikant um einen Faktor  $\approx 3$  reduziert werden. Der Unterschied kann der homogeneren Oberflächenbeladung der sortierten, Tau-beschichteten Kolloide zugeschrieben werden.

sind. Details zum Signifikanztest können im Anhang A.4.2 gefunden werden. Dieser Effekt kann auf die Verwendung von Kolloiden mit ähnlicher Oberflächenbeladung zurückgeführt werden. Wie bereits erwähnt, korreliert die Assoziationsrate - und somit auch die Bindungshäufigkeit - mit der Anzahl der auf den Kolloidoberflächen verankerten Moleküle. Ist diese vergleichbar, wirkt sich das positiv auf die Schwankungen in der Bestimmung von  $h_B$  verschiedener Kolloidpaare aus, wodurch die relativen Bindungshäufigkeiten genauer bestimmt werden können.

#### 4.2.5 Schlussbemerkung zu Abschnitt 4.2

In Abschnitt 4.2 wurde eine kombinierte Methodik aus FACS-Analyse und dynamischer Kraftspektroskopie vorgestellt, die geeignet ist, Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen unter ähnlichen kolloidalen Oberflächenbeladungen zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden in Stangner *et al.* [142] veröffentlicht. Zur Demonstration dieses Ansatzes dienten die Interaktionen zwischen dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[F1-pThr231] und seinem spezifischen, monoklonalen Antikörper HPT-104. Im ersten Schritt wurden Melaminharz-Partikel unter Zugabe verschiedener Peptidmengen präpariert. Es konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der auf den Kolloiden verankerten Tau-Peptiden einer Gaußverteilung unterliegt. Anschließend wurde mit Hilfe von FACS-Messungen der Zusammenhang zwischen der Menge an Tau-Peptid-Lösung, die während der Präparation verwendet wird,  $V_{\text{Peptid}}$ , der Oberflächenbeladung  $\Sigma$  und der gemessenen Fluoreszenzintensität *FITC* bestimmt (vgl. Abschnitt 4.2.1). Es stellte sich heraus, dass bis zu einem Schwellwert von  $V_{\text{Peptid}} = 4 \mu\text{L}$  ein linearer Zusammenhang zwischen  $\Sigma$  und *FITC* besteht. Oberhalb dieses Grenzwertes trat Sättigung ein.

Durch die Festlegung eines bestimmten Schwellwertes, der sich an der Fluoreszenzintensität *FITC* orientierte, konnten die Tau-beschichteten Kolloide mit einem FACS-Spektrometer sortiert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2). Bei der Reanalyse der verbliebenen Kolloidlösung wurde festgestellt, dass sich die Breite der Fluoreszenzintensitätsverteilung um 33 % reduziert hatte. Das war gleichbedeutend mit der Ansammlung von Partikeln mit ähnlicher Beladungsdichte. Aufgrund hydrophober Eigenschaften und der Nähe des Farbstoffes zur Bindungsstelle des mAk HPT-104 im Peptid musste überprüft werden, ob dieser einen Einfluss auf die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand hatte. Dazu wurden die Bindungsparameter für die Bindung zwischen Tau[Fl-Thr231] und mAk HPT-104 mit denen des nicht-markierten Peptidanalogs verglichen. Im Rahmen der Messgenauigkeit konnten keine Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abschnitt 4.2.3).

In Abschnitt 4.2.4 wurde demonstriert, dass sich eine ähnliche Oberflächenbeladung der Tau-Peptid-Kolloide positiv auf die Bestimmung der relativen Bindungshäufigkeiten auswirkt. Beim Vergleich der  $h_B$  von nicht sortieren und sortieren Partikeln wurde eine signifikante Reduktion der Datenvarianz beobachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kombination aus FACS-Analyse und dynamischer Kraftspektroskopie erlaubt, Bindungshäufigkeiten genauer zu messen, indem die Varianz dieser Messwerte deutlich verkleinert wird. Das ist besonders für den Vergleich mehrerer Rezeptor-Ligand-Systeme wichtig, wenn diese anhand von Bindungshäufigkeiten und Affinitätskonstanten verglichen werden sollen (vgl. Abschnitt 4.1), um auch kleinere Unterschiede in diesen Parametern aufzulösen. Weiterhin kann durch die Verwendung des identischen FACS-Protokolls eine fortwährend homogene Oberflächenbeladung bei unterschiedlichen Präparationsansätzen gewährleistet werden, was ebenfalls eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der FACS-Methodik ist, dass die Kraftspektroskopieexperimente mit denselben Kolloiden durchgeführt werden können, die am FACS-Spektrometer vorsortiert wurden, ohne dass diese dabei beschädigt werden oder ungepuffert werden müssen.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Gegenstand dieser Arbeit waren die Wechselwirkungen zwischen Tau-Peptiden und ihren phosphorylierungsspezifischen, monoklonalen Antikörpern, die auf Einzelmolekülniveau untersucht wurden. Die verwendeten Tau-Peptide stammten aus der längsten humanen Isoform des Tau-Proteins und wurden synthetisch über Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Das Tau-Protein gehört zur Klasse der Mikrotubuli-bindenden Moleküle und ist hauptsächlich am Aufbau und der Stabilisierung der Mikrotubuli von Neuronen beteiligt. Ist das Tau-Protein jedoch pathogen verändert und trägt an bestimmten Aminosäuren (z.B. an Threonin231 und Serin235) eine Phosphatgruppe, verliert es seine Mikrotubuli-bindende Funktion und beginnt sich in neurofibrillären Knäuel zu formieren [4, 122]. Die daraus entstehenden Krankheitsbilder, zu denen auch die Alzheimer-Krankheit gehört, sind als Tauopathien bekannt [4–7, 9, 122]. Um solche Phosphatgruppen im Tau-Protein in der vorklinischen Phase der Krankheit zu detektieren, können unter anderem monoklonale Antikörper, wie mAk HPT-101 und mAk HPT-104, eingesetzt werden, die ein spezifisches Phosphorylierungsmuster erkennen. Für eine klinische Anwendung solcher monoklonaler Antikörper wird eine hohe Affinität und Spezifität dieser Moleküle an ihr Zielepitop benötigt. Kreuzreaktion oder unspezifische Wechselwirkungen zu andern Tau-Isoformen sollen möglichst nicht auftreten.

Zur Bestimmung der Affinität des monoklonalen Antikörpers HPT-101 wurden die Interaktionen mit dem doppelt-phosphorylierten Peptid Tau[pThr231/pSer235] untersucht. Dieses Peptid enthält die Aminosäuren 226–240 aus der längsten humanen Isoform des Tau-Proteins und besitzt Phosphorylierungen an Threonin231 und Serin235. Die Verwendung solcher kurzen Peptide bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen geringfügiger Änderungen in der Aminosäuresequenz sowie im Phosphorylierungsmuster auf die Wechselwirkungen mit ihrem spezifischen Antikörper zu untersuchen. Um das Epitop des mAk HPT-101 auf Basis einzelner Aminosäuren zu bestimmen, kam der sogenannte Alanin-Scan zum Einsatz. Dabei wurden aus dem ursprünglichen Peptid Tau[pThr231/pSer235] mittels Substitution der Aminosäuren 231 – 237 durch *ein* Alanin insgesamt sieben Tau-Isoformen hergestellt (vgl. Abschnitt 2.2.1.4 und 3.2.1). Die Charakterisierung der einzelnen Bindungen erfolgte zum einen durch die Auswertung von Bindungshäufigkeiten  $h_B$ , die proportional zur Assoziationskonstante  $k_{on}$  ist. Zum anderen wurden Abrisskrafthistogramme mit der dynamischen Kraftspektroskopie gemessen, aus deren Analyse die Bindungsparameter, wie die Lebensdauer einer Bindung im kraftfreien Zustand  $\tau_0$ , die Bindungslänge  $x_{ts}$  und die freie Aktivierungsenergie  $\Delta G$ , hervorgingen. Durch die Verwendung der Raten  $k_{on}$  und  $k_{off}^0 = \tau_0^{-1}$  konnte die relative Affinitätskonstante  $K_a^{rel}$  berechnet werden. Anhand dieser Größe wurden die Ergebnisse der kraftspektroskopischen mit ELISA-Messungen verglichen. Mit Hilfe der eben beschriebenen

Parameter wurden Kriterien zur Bestimmung essentieller, sekundärer und nicht-essentieller Aminosäuren für die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und Tau[pThr231/pSer235] festgelegt. Das Kriterium für essentielle Aminosäuren definiert sich darüber, dass durch ihren Austausch gegen ein Alanin mAk HPT-101 nur noch sehr schwach an das entsprechende Peptid bindet. Dies zeigte sich darin, dass für alle bestimmten Parameter ( $h_B$ ,  $\tau_0$ ,  $x_{ts}$ ,  $\Delta G$ ,  $K_a^{\text{rel.}}$ ) die niedrigsten Werte beobachtet wurden (vgl. Abschnitt 4.1). Aufgrund der großen Messunsicherheit in der Bestimmung von  $h_B$  und  $\Delta G$  konnten für diese beiden Parameter jedoch keine aussagekräftigen Merkmale postuliert werden. Für sekundäre Aminosäuren ergaben sich verkürzte Bindungslebensdauern sowie reduzierte Affinitätswerte. In den durchgeführten Messungen lagen die erhaltenen Werte dieser beiden Parameter zwischen denen der essentiellen Aminosäuren und denen des unveränderten Referenz-Peptids. Abweichungen für  $h_B$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$  konnten in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen mAk HPT-101 und Tau[pThr231/pSer235] nicht ermittelt werden. Beim Austausch nicht-essentieller Aminosäuren wurden keine Änderungen der Parameter, die eine Bindung charakterisieren, innerhalb der Messgenauigkeit festgestellt. Es galt jedoch zu beachten, dass die festgelegten Kriterien ihre Gültigkeit nur im direkten Vergleich mit den Bindungsparametern des Referenz-Peptids Tau[pThr231/pSer235] behalten. Die aus den kraftspektroskopischen Messungen berechneten relativen Affinitätskonstanten stimmten mit denen aus den ELISA-Experimenten überein. Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den Bindungsparametern aus Änderungen der Peptidkonformation, hervorgerufen durch die chemische Modifikation der Aminosäuresequenz, resultieren, wurden Struktursimulationen durchgeführt. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die Peptidstruktur beim Austausch einzelner Aminosäuren durch ein Alanin erhalten blieb. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Unterschiede in den Affinitätskonstanten durch lokale Effekte, wie die Verschiebung der Ladungsverteilung um die Antikörperbindungsstelle oder Änderung der Wasserstruktur um die ersetzte Aminosäure, bedingt waren.

Eine Möglichkeit die Klassifizierung des Epitops von mAk HPT-101 zu verfeinern stellte die Reduktion der Datenvarianz in Bindungshäufigkeitsmessungen dar, sodass auch anhand dieses Parameters ein aussagekräftiges Kriterium über das Vorhandensein von essentiellen, sekundären und nicht essentiellen-Aminosäuren aufgestellt werden kann. Im Zuge dieses Ansatzes wurde in dieser Arbeit eine kombinierte Methode aus FACS- und Kraftspektroskopieexperimenten vorgestellt, um die Oberflächenbeladung von Mikropartikeln genau zu charakterisieren und somit den Messfehler in der Bindungshäufigkeit  $h_B$  zu minimieren. Dazu wurden die Kolloide mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] beschichtet und anschließend mit einem FACS-Spektrometer anhand ihrer Fluoreszenzintensität sortiert. Die daraus hervorgehende Kolloidpopulation besaß eine gleichmäßige Anzahl von Peptiden, die auf den Partikeloberflächen verankert waren. Um auszuschließen, dass der Fluorophor aufgrund hydrophober Eigenschaften einen Einfluss auf die spezifische Bindung zwischen mAk HPT-104 und dem fluoreszenzmarkierten Peptid Tau[Fl-pThr231] hatte, wurden kraftspektroskopische Messungen durchgeführt. Der Vergleich der erhaltenen Bindungsparameter ( $\tau_0$ ,  $x_{ts}$  und  $\Delta G$ ) mit denen der Wechselwirkung zwischen dem nicht-markierten Peptidanalogen und HPT-104 zeigte, dass die Parameter im Rahmen des Messfehlers übereinstimmten. Daraus folgte, dass

der Farbstoff die Rezeptor-Ligand-Bindung nicht beeinflusste. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Datenvarianz des Medianfehlers bei der Messung von relativen Bindungshäufigkeiten signifikant reduziert, indem vorsortierte Kolloide anstelle unsortierter verwendet wurden.

Insgesamt kann resümiert werden, dass es mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie gelungen ist, die Wechselwirkungen zwischen Tau-Peptiden und den monoklonalen Antikörpern HPT-101 und HPT-104 auf dem Niveau einzelner Bindungen zu charakterisieren. Das Vorsortieren Peptid-beschichteter Kolloide anhand des FACS-Verfahrens ermöglicht eine genauere Vergleichbarkeit verschiedener Rezeptor-Ligand-Systeme durch relative Bindungshäufigkeiten und Affinitätskonstanten. Somit können zukünftige Messungen durch den verkleinerten Messfehler auch Unterschiede in diesen Parametern auflösen, die ohne Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens im Rauschen der Messdaten verborgen bleiben würden.

Die mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie durchgeführte Epitopanalyse ermöglicht die Definition von Kriterien zur Festlegung von essentiellen, sekundären und nicht-essentiellen Epitopaminosäuren, die ausschließlich auf den spezifischen Bindungseigenschaften der untersuchten Antikörper-Peptid-Komplexe basieren. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit ELISA-Messungen. Auf Grundlage dieses fundierten Wissen können zukünftige Experimente auf die Untersuchung der Bindung zwischen dem monoklonalen Antikörper HPT-101 und dem vollständigen Tau-Protein erweitert werden. Dabei ist es notwendig zu überprüfen, ob das hier untersuchte Epitop im Protein dem Antikörper weiterhin zugänglich ist und falls ja, ob dessen Spezifität erhalten bleibt. Die sich daraus ergebenden Details komplettieren die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen dem Tau-Peptid und mAk HPT-101 und haben großes therapeutisches Potential in der klinischen Anwendung. So hat die genaue Kenntnis der Spezifität Einfluss auf die Entwicklung und Optimierung zukünftiger (therapeutischer/diagnostischer) Antikörper, die in der Humanmedizin eingesetzt werden können [129].



# A Anhang

## A.1 Übersicht der Messungen und Experimentatoren

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden ausschließlich vom Autor, Tim Stanger, durchgeführt. Messungen und Simulationen die von anderen Experimentatoren ohne Mitwirkung des Autors dieser Arbeit unternommen wurden, sind an der entsprechenden Stelle gekennzeichnet sowie in folgender Tabelle aufgelistet:

**Tabelle A.1:** Liste der Messungen und Simulationen die von anderen Experimentatoren ohne Mitwirkung des Autors dieser Arbeit unternommen wurden.

<b>von Anderen zugearbeitete Messungen und Simulationen</b>	<b>relevanter Abschnitt</b>	<b>Experimentator</b>
DFS-Messungen HPT-101/Tau[pThr231/pSer235]	4.1.2	Dr. Carolin Wagner <sup>a</sup>
ELISA-Messungen	4.1.5	Dr. David Singer <sup>b</sup>
Struktursimulationen	4.1.6	Dr. Stefano Angioletti-Uberti <sup>c</sup>
DFS-Messungen HPT-104/Tau[pThr231]	4.2.3	Dr. Carolin Wagner <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Arbeitsgruppe Molekülphysik, Prof. Dr. Friedrich Kremer, Universität Leipzig

<sup>b</sup> Arbeitsgruppe Bioanalytik, Prof. Dr. R. Hoffmann, BBZ Leipzig

<sup>c</sup> Arbeitsgruppe Theorie und Simulation von Vielteilchensystemen, Prof. Dr. J. Dzubiella, Humboldt-Universität zu Berlin

## A.2 Chemikalien- und Pufferverzeichnis

### A.2.1 Chemikalienverzeichnis

- TCEP Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid ( $C_9H_{15}O_6P \cdot HCl$ )
- L-Cystein  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -mercaptopropionsäure ( $C_3H_7NO_2S$ )
- Glycin Aminoethansäure ( $C_2H_5NO_2$ )
- DMP Dimethylpimelimidat Dihydrochlorid ( $C_9H_{18}N_2O_2$ )
- Tween20<sup>®</sup> Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat ( $C_{58}H_{114}O_{26}$ )
- EDC-HCl 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid ( $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ )
- TRIS-HCl Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid ( $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ )

### A.2.2 Pufferverzeichnis

#### Carbonat-Puffer

- 100 mM  $NaCO_3 / NaHCO_3$
- pH 9,6

#### Glycin-Puffer

- 100 mM Glycin
- pH 8

#### Phosphat-Puffer

- 10 mM  $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$
- 20 mM NaCl
- pH 4,5 (Präp. Abschnitt 3.2.2.2)  
/ pH 7 (Präp. Abschnitt 3.2.2.1)

#### DMP-Vernetzungspuffer

- 200 mM  $C_6H_{15}NO_3$
- 20 mM DMP
- pH 8,2

#### L-Cystein-Phosphat-Puffer

- 10 mM  $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$
- 20 mM NaCl
- 10 mM L-Cystein
- pH 7

#### Borat-Puffer

- 100 mM  $Na_2B_4O_7 \cdot H_2O / H_3BO_3$
- pH 8,5

#### Vernetzungspuffer

- 200 mM  $C_6H_{15}NO_3$
- pH 8,2

#### TRIS-HCl-Puffer

- 50 mM  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$
- pH 7,5

#### Lagerungspuffer

- PBS (1x)<sup>61</sup>
- 0,1% m/v Tween20<sup>®</sup>
- pH 7,4

#### Kopplungspuffer

- 22 mM  $C_6H_8O_7$
- 25 mM  $Na_2HPO_4$
- pH 5

**EDC-HCl-Phosphat-Puffer**

- 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 20 mM NaCl
- 2% m/v EDC
- pH 4,5

---

<sup>61</sup>137 mM NaCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,7 mM KCl; 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### A.3 Median-Test (vgl. Abschnitt 4.1.1)

Der Median-Test dient dem Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen zwei voneinander unabhängigen Medianen [148]. Zunächst wird angenommen, dass die Nullhypothese  $H_0 : \tilde{x}_1 = \tilde{x}_2$  erfüllt ist. Wird diese abgelehnt, tritt die Alternativhypothese in Kraft:  $H_1 : \tilde{x}_1 \neq \tilde{x}_2$  und es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen  $\tilde{x}_1$  und  $\tilde{x}_2$  vor. Zur Durchführung des Tests wird zunächst eine gemeinsame Stichprobe (Stichprobenumfang  $n$ ) aus den beiden zu vergleichenden Gruppen (Stichprobenumfang  $n_1$  bzw.  $n_2$ ) gebildet und der Gesamt-Medianwert  $\tilde{x}_{\text{Median}}$  bestimmt. Anschließend wird folgendes Schema befolgt:

**Tabelle A.3:** Schema zum Durchführen des Median-Tests.  $a$  und  $c$  geben an, wie viele Werte aus Stichprobe 1 bzw. 2 kleiner sind als der Gesamt-Medianwert  $\tilde{x}_{\text{Median}}$ .  $b$  und  $d$  geben an, wie viele Werte größer sind als Gesamt-Medianwert  $\tilde{x}_{\text{Median}}$ .  $n_1$ ,  $n_2$  und  $n$  entsprechen dem Stichprobenumfang der Stichprobe 1 und 2 bzw. dem der gesamten Stichprobe.

	$< \tilde{x}_{\text{Median}}$	$> \tilde{x}_{\text{Median}}$	Stichprobenumfang
Stichprobe 1	$a$	$b$	$n_1$
Stichprobe 2	$c$	$d$	$n_2$
Summe	$a + c$	$b + d$	$n$

Der Prüfwert berechnet sich für kleine Stichprobenumfänge, für die zusätzlich gilt  $n_1 = n_2$ , zu:

$$\chi_{\text{Prüf}}^2 = \frac{(n-1)(a-c)^2}{(a+c)(b+d)}. \quad (\text{A.1})$$

$H_0$  wird zugunsten von  $H_1$  abgelehnt, wenn der Prüfwert  $\chi_{\text{Prüf}}^2$  bei der geforderten statistischen Sicherheit  $\alpha$  den kritischen  $\chi^2$ -Wert aus der  $\chi^2$ -Verteilung für den Freiheitsgrad  $FG$  erreicht oder überschreitet [148]:

$$\chi^2(FG|\alpha) \leq \chi_{\text{Prüf}}^2. \quad (\text{A.2})$$

Dieses Verfahren wird verwendet um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede in den Bindungshäufigkeiten  $h_B$  aus Abschnitt 4.1.1 signifikant sind. Die Rechnung soll exemplarisch für den Vergleich der Bindungshäufigkeiten des Referenz-Peptids Tau[pThr231/pSer235] und der Tau-Isoform Tau<sup>Iso</sup>[pThr231] durchgeführt werden. Es werden folgende Bindungshäufigkeiten verwendet:

- Tau[pThr231/pSer235]: 4 %; 24 %; 40 %; 48 %; 54 %
- Tau<sup>Iso</sup>[pThr231]: 1,7 %; 6,6 %; 18 %; 30 %; 48,4 %

Daraus folgen die Parameter zur Berechnung des Prüfwertes:  $\tilde{x}_{\text{Median}} = 27\%$ ,  $a = d = 2$ ,  $b = c = 3$  und  $n = 10$ . Der Prüfwert berechnet sich über Gl. A.1 zu  $\chi_{\text{Prüf}}^2 = 0,36$ . Der kritische  $\chi^2(FG|\alpha)$ -Wert ergibt sich für eine statistische Sicherheit  $\alpha = 10\%$  ( $FG = 1$ ) zu:  $\chi^2(1|10\%) = 2,71$ . Somit gilt nach Gl. A.2:

$$\chi^2(1|10\%) = 2,71 \geq 0,36 = \chi_{\text{Prüf}}^2. \quad (\text{A.3})$$

Damit ist die Nullhypothese bestätigt, es liegt kein signifikanter Unterschied im Median beider Stichproben vor. Dieses Verfahren wurde auch auf alle anderen Bindungshäufigkeiten aus Abschnitt 4.1.1 angewendet. Es konnten keine signifikanten Abweichungen gefunden werden.

## A.4 F-Tests

Zum Nachweis, dass sich die Varianzen  $\sigma$  zweier unabhängiger, normalverteilter Messwerte signifikant unterscheiden, kommt der  $F$ -Test zum Einsatz [164]. Beim  $F$ -Test wird zunächst die Nullhypothese  $H_0: \sigma_1 = \sigma_2$  angenommen. Stellt sich heraus, dass diese erfüllt ist, liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen beider Verteilungen vor. Ist die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese  $H_1: \sigma_1 \neq \sigma_2$  erfüllt, sind die Abweichungen signifikant, bezogen auf ein Signifikanzniveau  $\alpha$ . Das Prüfverfahren funktioniert folgendermaßen: Zunächst wird die Prüfgröße  $\hat{F}$  berechnet:

$$\hat{F} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}, \quad (\text{A.4})$$

wobei gilt, dass  $\sigma_1 > \sigma_2$ . Erreicht oder überschreitet der errechnete  $\hat{F}$ -Wert bei der geforderten statistischen Sicherheit  $\alpha$  den theoretischen  $F$ -Wert für die Freiheitsgrade  $FG_1 = N_1 - 1$  und  $FG_2 = N_2 - 1$ , dann ist die Nullhypothese abgelehnt und die Varianzen gelten als signifikant verschieden [164]:

$$F(FG_1; FG_2|\alpha) \leq \hat{F}. \quad (\text{A.5})$$

Andernfalls ist die Nullhypothese angenommen.

### A.4.1 $F$ -Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede der Varianzen von Oberflächenbeladungsverteilungen (vgl. Abschnitt 4.2.2)

Mit diesem Test wird überprüft, ob sich Varianzen der Verteilungen A2 vor (Bezeichnung: A2<sub>vor</sub>) und nach (Bezeichnung: A2<sub>nach</sub>) dem Selektionsprozess signifikant unterscheiden. A2<sub>vor</sub> bezieht sich dabei auf die Verteilung A2 in Abb. 4.8 (a) und A2<sub>nach</sub> auf die Verteilung A2 in Abb. 4.8 (b). Die Varianz  $\sigma_{\text{FITC}, x}$ , der Stichprobenumfang  $N_x$  und die Anzahl der Freiheitsgrade  $FG_x$  für die beiden Verteilungen sind aus Tab. A.4 ersichtlich. Daraus berechnet sich der Prüfwert zu  $\hat{F} = 2,25$ . Der theoretische  $F$ -Wert für die Freiheitsgrade  $FG_1$  und  $FG_2$  ergibt sich für eine statistische Sicherheit  $\alpha = 0,01$  zu  $F(18004; 17353|0,01) \approx 1$ . Somit gilt nach Gl. A.5:

$$F(18004; 17353|0,01) \approx 1 \leq 2,5 = \hat{F}. \quad (\text{A.6})$$

**Tabelle A.4:** Varianz  $\sigma_{\text{FITC}, x}$ , Stichprobenumfang  $N_x$  und Anzahl der Freiheitsgrade  $FG_x$  für die Verteilungen A2 aus Abschnitt 4.2.2.

Parameter	Verteilung A2 <sub>vor</sub>	Verteilung A2 <sub>nach</sub>
$\sigma_{\text{FITC}, x}$	117	78
$N_x$	18004	17353
$FG_x$	18003	17352

Damit ist die Nullhypothese abgelehnt. Die Varianzen beider Verteilungen unterscheiden sich signifikant.

#### A.4.2 F-Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede der Varianzen zweier relativer Bindungshäufigkeiten (vgl. Abschnitt 4.2.4)

Zur Überprüfung, ob sich die Varianzen zweier Bindungshäufigkeiten signifikant unterscheiden, wird zunächst die Nullhypothese  $H_0$  angenommen. Die relative Bindungshäufigkeit, die aus der Messung mit den unsortierten Partikeln resultiert, wird mit  $h_{\text{B, vor}}$  und die mit den sortierten Kolloiden mit  $h_{\text{B, nach}}$  bezeichnet. Die Werte für die Varianzen  $\sigma_x$ , die Stichprobenumfänge  $N_x$  und die Anzahl der Freiheitsgrade  $FG_x$  sind aus Tab. A.5 ersichtlich. Der Prüfwert berechnet sich nach Gl. A.4 zu:  $\hat{F} = 9,87$ . Der F-Wert für die Freiheitsgrade  $FG_1 = FG_2 = 4$  bei einer statistischen Sicherheit von  $S = 95\%$  ( $\alpha = 0,05$ ) ist:  $F(4; 4|0,05) = 6,39$ . Nach Gl. A.5 gilt:

$$F(4; 4|0,05) = 6,39 \leq 9,87 = \hat{F}. \quad (\text{A.7})$$

Damit ist die Nullhypothese abgelehnt. Die Varianzen beider Verteilungen unterscheiden sich signifikant.

**Tabelle A.5:** Varianz  $\sigma_x$ , Stichprobenumfang  $N_x$  und Anzahl der Freiheitsgrade  $FG_x$  für die relativen Bindungshäufigkeiten aus Abschnitt 4.2.4.

Parameter	$h_{\text{B, vor}}$	$h_{\text{B, nach}}$
$\sigma_x$	21,83	6,95
$N_x$	5	5
$FG_x$	4	4

## Literaturverzeichnis

- [1] LAU, L.-F und M. A. BRODNEY: *Therapeutic Approaches for the Treatment of Alzheimer's Disease: An Overview*. In: LAU, L.-F und M. A. BRODNEY (Herausgeber): *Alzheimer's Disease*, Band 2 der Reihe *Topics in Medicinal Chemistry*, Seiten 1–24. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [2] ALZHEIMER'S ASSOCIATION: *Alzheimer's Disease Facts and Figures 2013*. [http://www.alz.org/documents/facts\\_figures\\_2013.pdf](http://www.alz.org/documents/facts_figures_2013.pdf), [Online; Stand 15. August 2014].
- [3] ALZHEIMER'S ASSOCIATION: *Alzheimer's Disease Facts and Figures 2007*. [http://www.alz.org/national/documents/Report\\_2007FactsAndFigures.pdf](http://www.alz.org/national/documents/Report_2007FactsAndFigures.pdf), [Online; Stand 15. August 2014].
- [4] IQBAL, K., A. DEL C. ALONSO, S. CHEN, M. O. CHOCHAN, E. EL-AKKAD, C.-X GONG, S. KHATOON, B. LI, F. LIU, A. RAHMAN, H. TANIMUKAI und I. GRUNDKE-IQBAL: *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies*. *The Biology and Pathobiology of Tau*, 1739(2–3):198–210, 2005.
- [5] IQBAL, K. und I. GRUNDKE-IQBAL: *Alzheimer Neurofibrillary Degeneration: Pivotal Role and Therapeutic Targets*. In: MARTINEZ, A. und D. E. THURSTON (Herausgeber): *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease: Volume 1: Beta-Amyloid, Tau Protein and Glucose Metabolism*, Seiten 137–152. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.
- [6] HERNÁNDEZ, F. und J. AVILA: *Tauopathies*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(17):2219–2233, 2007.
- [7] BALLATORE, C., V. M.-Y LEE und J. Q. TROJANOWSKI: *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9):663–672, 2007.
- [8] WISCHIK, C.M, WISCHIK D.J., STOREY J.M.D. und HARRINGTON C.R.: *Rationale for Tau-Aggregation Inhibitor Therapy in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies*. In: MARTINEZ, A. und D. E. THURSTON (Herausgeber): *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease: Volume 1: Beta-Amyloid, Tau Protein and Glucose Metabolism*, Seiten 210–232. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.
- [9] WOLFE, M.S: *The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease and Prospects for Therapeutics*. In: MARTINEZ, A. und D. E. THURSTON (Herausgeber): *Emerging Drugs and*

- Targets for Alzheimer's Disease: Volume 1: Beta-Amyloid, Tau Protein and Glucose Metabolism*, Seiten 3–18. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.
- [10] BRAAK, H. und E. BRAAK: *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathologica, 82(4):239–259, 1991.
- [11] YOSHIYAMA, Y., V. M. Y. LEE und J. Q. TROJANOWSKI: *Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 84(7):784–795, 2013.
- [12] KÖHLER, G. und C. MILSTEIN: *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 256(5517):495–497, 1975.
- [13] BUSS, N. A. P. S., S. J. HENDERSON, M. MCFARLANE, J. M. SHENTON und L. DE HAAN: *Monoclonal antibody therapeutics: history and future*. Current Opinion in Pharmacology, 12(5):615–622, 2012.
- [14] CASI, G. und D. NERI: *Antibody–drug conjugates: Basic concepts, examples and future perspectives*. Journal of Controlled Release, 161(2):422–428, 2012.
- [15] GERBER, H.-P, F. E. KOEHN und R. T. ABRAHAM: *The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics*. Natural Product Reports, 30(5):625, 2013.
- [16] LIN, K. und J. TIBBITTS: *Pharmacokinetic Considerations for Antibody Drug Conjugates*. Pharmaceutical Research, 29(9):2354–2366, 2012.
- [17] NELSON, A. L., E. DHIMOLEA und J. M. REICHERT: *Development trends for human monoclonal antibody therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery, 9(10):767–774, 2010.
- [18] REICHERT, J. M. und E. DHIMOLEA: *The future of antibodies as cancer drugs*. Drug Discovery Today, 17(17–18):954–963, 2012.
- [19] REICHERT, J. M.: *Antibodies to watch in 2013: Mid-year update*. mAbs, 5(4), 2013.
- [20] CAHILL, D. J.: *Protein and antibody arrays and their medical applications*. Journal of Immunological Methods, 250(1–2):81–91, 2001.
- [21] ENGVALL, E. und P. PERLMANN: *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 8(9):871–874, 1971.
- [22] WEEMEN, B. K. VAN und A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay using antigen–enzyme conjugates*. FEBS Letters, 15(3):232–236, 1971.
- [23] RENART, J., J. REISER und G. R. STARK: *Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(7):3116–3120, 1979.

- [24] LEQUIN, R. M.: *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. *Clinical Chemistry*, 51(12):2415–2418, 2005.
- [25] BINNIG, G., C. F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [26] NEUMAN, K. C. und A. NAGY: *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*. *Nature Methods*, 5(6):491–505, 2008.
- [27] ASHKIN, A., J. M. DZIEDZIC, J. E. BJORKHOLM und S. CHU: *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. *Optics letters*, 11(5):288, 1986.
- [28] BOUCHIAT, C., M. D. WANG, J. F. ALLEMAND, T. STRICK, S. M. BLOCK und V. CROQUETTE: *Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements*. *Biophysical Journal*, 76(1):409–413, 1999.
- [29] BUSTAMANTE, C., Z. BRYANT und S. B. SMITH: *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*. *Nature*, 421(6921):423–427, 2003.
- [30] MARKO, J. F. und E. D. SIGGIA: *Stretching DNA*. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.
- [31] ANSELMETTI, D., F. W. BARTELS, A. BECKER, B. DECKER, R. ECKEL, M. MCINTOSH, J. MATTAY, P. PLATTNER, R. ROS, C. SCHÄFER und N. SEWALD: *Reverse Engineering of an Affinity-Switchable Molecular Interaction Characterized by Atomic Force Microscopy Single-Molecule Force Spectroscopy†*. *Langmuir*, 24(4):1365–1370, 2007.
- [32] BOCKELMANN, U.: *Single-molecule manipulation of nucleic acids*. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(3):368–373, 2004.
- [33] SISCHKA, A., K. TOENSING, R. ECKEL, S. D. WILKING, N. SEWALD, R. ROS und D. ANSELMETTI: *Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands*. *Biophysical Journal*, 88(1):404–411, 2005.
- [34] BERTZ, M. und M. RIEF: *Mechanical Unfoldons as Building Blocks of Maltose-binding Protein*. *Journal of Molecular Biology*, 378(2):447–458, 2008.
- [35] BORNSCHLÖGL, T., D. M. ANSTROM, E. MEY, J. DZUBIELLA, M. RIEF und K. T. FOREST: *Tightening the Knot in Phytochrome by Single-Molecule Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 96(4):1508–1514, 2009.
- [36] BOTELLO, E., N. C. HARRIS, J. SARGENT, W.-H CHEN, K.-J LIN und C.-H KIANG: *Temperature and Chemical Denaturant Dependence of Forced Unfolding of Titin I27*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(31):10845–10848, 2009.

- [37] DIETZ, H. und M. RIEF: *Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(46):16192–16197, 2004.
- [38] JUNKER, J. P., F. ZIEGLER und M. RIEF: *Ligand-Dependent Equilibrium Fluctuations of Single Calmodulin Molecules*. Science, 323(5914):633–637, 2009.
- [39] OBERHAUSER, A. F., P. K. HANSMA, M. CARRION-VAZQUEZ und J. M. FERNANDEZ: *Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(2):468–472, 2001.
- [40] DAMMER, U., M. HEGNER, D. ANSELMETTI, P. WAGNER, M. DREIER, W. HUBER und H. J. GÜNTHERODT: *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*. Biophysical Journal, 70(5):2437–2441, 1996.
- [41] MILZ, F., A. HARDER, P. NEUHAUS, O. BREITKREUZ-KORFF, V. WALHORN, T. LÜBKE, D. ANSELMETTI und T. DIERKS: *Cooperation of binding sites at the hydrophilic domain of cell-surface sulfatase Sulf1 allows for dynamic interaction of the enzyme with its substrate heparan sulfate*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, (0), 2013.
- [42] CLAUSEN-SCHAUMANN, H., M. SEITZ, R. KRAUTBAUER und H. E. GAUB: *Force spectroscopy with single bio-molecules*. Current Opinion in Chemical Biology, 4(5):524–530, 2000.
- [43] KIENBERGER, F., G. KADA, H. MUELLER und P. HINTERDORFER: *Single Molecule Studies of Antibody–Antigen Interaction Strength Versus Intra-molecular Antigen Stability*. Journal of Molecular Biology, 347(3):597–606, 2005.
- [44] BOZNA, B. L., P. POLZELLA, C. RANKL, R. ZHU, M. SALIO, D. SHEPHERD, M. DUMAN, V. CERUNDOLO und P. HINTERDORFER: *Binding strength and dynamics of iNKT TCR/CD1d-glycosphingolipids interaction on living cells by single molecule force spectroscopy*. Journal of Biological Chemistry, 286:15973–15979, 2011.
- [45] LORITZ, H.-M, N. KIRCHGESSNER, S. BORN, B. HOFFMANN und R. MERKEL: *Mechanical Strength of Specific Bonds Acting Isolated or in Pairs: A Case Study on Engineered Proteins*. The Journal of Physical Chemistry B, 115(11):2582–2592, 2011.
- [46] FLORIN, E., V. MOY und H. GAUB: *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. Science, 264(5157):415–417, 1994.
- [47] LEE, G. U., D. A. KIDWELL und R. J. COLTON: *Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 10(2):354–357, 1994.
- [48] MOY, V. T., E. L. FLORIN und H. E. GAUB: *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors*. Science, 266(5183):257–259, 1994.

- [49] BERTZ, M. und M. RIEF: *Ligand Binding Mechanics of Maltose Binding Protein*. Journal of Molecular Biology, 393(5):1097–1105, 2009.
- [50] BIZZARRI, A. R., S. DI AGOSTINO, L. ANDOLFI und S. CANNISTRARO: *A combined atomic force microscopy imaging and docking study to investigate the complex between p53 DNA binding domain and Azurin*. Journal of Molecular Recognition, 22(6):506–515, 2009.
- [51] SCHWESINGER, F., R. ROS, T. STRUNZ, D. ANSELMETTI, H.-J. GÜNTHERODT, A. HONEGGER, L. JERMUTUS, L. TIEFENAUER und A. PLÜCKTHUN: *Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(18):9972–9977, 2000.
- [52] SALOMO, M., U. F. KEYSER, M. STRUHALLA und F. KREMER: *Optical tweezers to study single Protein A/Immunoglobulin G interactions at varying conditions*. European Biophysics Journal, 37(6):927–934, 2008.
- [53] WAGNER, C., D. SINGER, O. UEBERSCHÄR, T. STANGNER, C. GUTSCHE, R. HOFFMANN und F. KREMER: *Dynamic force spectroscopy on the binding of monoclonal antibodies and tau peptides*. Soft Matter, 7(9):4370, 2011.
- [54] STANGNER, T., C. WAGNER, D. SINGER, S. ANGIOLETTI-UBERTI, C. GUTSCHE, J. DZUBIELLA, R. HOFFMANN und F. KREMER: *Determining the Specificity of Monoclonal Antibody HPT-101 to Tau-Peptides with Optical Tweezers*. ACS Nano, 7(12):11388–11396, 2013.
- [55] STANGNER, T.: *Wechselwirkungen zwischen Polymer-gepfropften Kolloiden*. Diplomarbeit, Universität Leipzig, Leipzig, 2010.
- [56] ASHKIN, A.: *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*. Biophysical Journal, 61(2):569–582, 1992.
- [57] REN, K. F., G. GRÉHA und G. GOUESBET: *Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a Gaussian beam by using the generalized Lorenz-Mie theory, and associated resonance effects*. Optics Communications, 108(4–6):343–354, 1994.
- [58] NEVES, A. A. R., A. FONTES, C. L. CESAR, A. CAMPOSEO, R. CINGOLANI und D. PISIGNANO: *Axial optical trapping efficiency through a dielectric interface*. Physical review E, 76(6):061917, 2007.
- [59] ASHKIN, A.: *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure*. Physical Review Letters, 24:156–159, 1970.
- [60] HARADA, Y. und T. ASAKURA: *Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime*. Optics Communications, 124(5–6):529–541, 1996.

- [61] SVOBODA, K. und S. M. BLOCK: *Biological applications of optical forces*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 23:247–285, 1994.
- [62] DAVIS, L.: *Theory of electromagnetic beams*. Physical Review A, 19:1177–1179, 1979.
- [63] NEUMAN, K. C. und S. M. BLOCK: *Optical trapping*. The Review of scientific instruments, 75(9):2787–2809, 2004.
- [64] DENG, Y., J. BECHHOEFER und N.R FORDE: *Brownian motion in a modulated optical trap*. Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 9(8):S256, 2007.
- [65] WAGNER, C.: *Kraftspektroskopie mittels optischer Pinzetten zur Untersuchung einzelner RezeptorLigand-Komplexe*. Doktorarbeit, Universität Leipzig, 2013.
- [66] PETERMAN, E. J. G., F. GITTES und C. F. SCHMIDT: *Laser-Induced Heating in Optical Traps*. Biophysical Journal, 84(2):1308–1316, 2003.
- [67] BOOKS, L. L.C.: *Buffers: Buffer Solution, Tris, Phosphate Buffered Saline, Buffering Agent, Hepes, Tae Buffer, Good's Buffers, Bis-Tris Propane, Mes, Mops*. General Books LLC, 2010.
- [68] SACKMANN, E. und R. MERKEL: *Lehrbuch der Biophysik*. Master. Wiley-VCH-Verl., Weinheim, 2010.
- [69] LODISH, H. F. (Herausgeber): *Molecular cell biology*. Freeman, New York, 7 Auflage, 2012.
- [70] ISRAELACHVILI, J. N.: *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, Burlington and MA, 3 Auflage, 2011.
- [71] BECK, E.: *Faszination Lebenswissenschaften*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [72] MERKEL, R.: *Force spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds*. Physics Reports, 346(5):343–385, 2001.
- [73] LEE, S.-H, Y. ROICHMAN, G.-R YI, S.-H KIM, S.-M YANG, A. VAN BLAADEREN, P. VAN OOSTRUM und D. G. GRIER: *Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy*. Optic Express, 15(26):18275–18282, 2007.
- [74] JANEWAY, C.: *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland Science, New York, 6 Auflage, 2005.
- [75] FISCHER, E.: *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 27:2985–2993, 1894.
- [76] KOSHLAND, D. E.: *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 44(2):98–104, 1958.

- [77] ROBERT, P., A.-M BENOLIEL, A. PIERRES und P. BONGRAND: *What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies?* Journal of Molecular Recognition, 20(6):432–447, 2007.
- [78] LIFSHITZ, E. M. und L. P. PITAEVSKIJ: *Physical kinetics*. Course of theoretical physics / L. D. Landau and E. M. Lifshitz. Pergamon Press, Oxford and New York and Toronto and Sydney and Paris and Frankfurt [Main i.e. Kronberg-Taunus], 1 Auflage, 1981.
- [79] BONGRAND, P.: *Ligand-receptor interactions*. Reports on Progress in Physics, 62(6):921–968, 1999.
- [80] EVANS, E. und P. WILLIAMS: *Dynamic Force Spectroscopy*. In: FLYVBJERG, F., F. JÜLICHER, P. ORMOS und F. DAVID (Herausgeber): *Physics of bio-molecules and cells. Physique des biomolécules et des cellules*, Band 75 der Reihe *Les Houches - Ecole d'Ete de Physique Theorique*, Seiten 145–204. Springer Berlin Heidelberg, 2002.
- [81] FRIDDLE, R. W.: *Theoretical Models in Force Spectroscopy*. In: BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO (Herausgeber): *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*, Seiten 93–132. CRC Press, Boca Raton and FL, 2012.
- [82] WILLIAMS, A. F.: *Out of equilibrium*. Nature, 352(6335):473–474, 1991.
- [83] BONGRAND, P.: *Biomolecular Recognition: The Current Challenge*. In: BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO (Herausgeber): *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*, Seiten 1–50. CRC Press, Boca Raton and FL, 2012.
- [84] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophysical Journal, 72(4):1541–1555, 1997.
- [85] DUDKO, O. K., G. HUMMER und A. SZABO: *Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(41):15755–15760, 2008.
- [86] KRAMERS, H. A.: *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*. Physica, 7(4):284–304, 1940.
- [87] EINSTEIN, A.: *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. Annalen der Physik, 322(8):549–560, 1905.
- [88] EINSTEIN, A.: *Zur Theorie der Brownschen Bewegung*. Annalen der Physik, 324(2):371–381, 1906.
- [89] SMOLUCHOWSKI, M. V.: *Über Brownsche Molekularbewegung unter Einwirkung äußerer Kräfte und deren Zusammenhang mit der verallgemeinerten Diffusionsgleichung*. Annalen der Physik, 353(24):1103–1112, 1916.

- [90] BELL, G.: *Models for the specific adhesion of cells to cells*. Science, 200(4342):618–627, 1978.
- [91] MAITRA, A. und G. ARYA: *Model Accounting for the Effects of Pulling-Device Stiffness in the Analyses of Single-Molecule Force Measurements*. Physical Review Letters, 104(10):108301, 2010.
- [92] SEIFERT, U.: *Rupture of Multiple Parallel Molecular Bonds under Dynamic Loading*. Physical Review Letters, 84(12):2750–2753, 2000.
- [93] THOMAS, W. E., V. VOGEL und E. SOKURENKO: *Biophysics of Catch Bonds*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 37(1):399–416, 2008.
- [94] GILLESPIE, D. T.: *Markov processes: An introduction for physical scientists*. Academic Press, Boston, 1992.
- [95] EVANS, E.: *Probing the relation between force - lifetime - and chemistry in single molecular bonds*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 30(1):105–128, 2001.
- [96] FRIDDLE, R. W., A. NOY und J. J. DE YOREO: *Interpreting the widespread nonlinear force spectra of intermolecular bonds*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(34):13573–13578, 2012.
- [97] DUDKO, O. K., G. HUMMER und A. SZABO: *Intrinsic Rates and Activation Free Energies from Single-Molecule Pulling Experiments*. Physical Review Letters, 96(10):108101, 2006.
- [98] SZABO, A., K. SCHULTEN und Z. SCHULTEN: *First passage time approach to diffusion controlled reactions*. The Journal of Chemical Physics, 72(8):4350–4357, 1980.
- [99] MERKEL, R., P. NASSOY, A. LEUNG, K. RITCHIE und E. EVANS: *Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*. Nature, 397(6714):50–53, 1999.
- [100] BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO (Herausgeber): *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*. CRC Press, Boca Raton and FL, 2012.
- [101] VIJAYENDRAN, R. A. und D. E. LECKBAND: *A Quantitative Assessment of Heterogeneity for Surface-Immobilized Proteins: Analytical Chemistry*. Analytical Chemistry, 73(3):471–480, 2000.
- [102] KRATKY, O. und G. POROD: *Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 68(12):1106–1122, 1949.
- [103] NGUYEN-DUONG, M., K. W. KOCH und R. MERKEL: *Surface anchoring reduces the lifetime of single specific bonds*. Europhysics Letters, 61(6):845, 2003.

- [104] HU, J., R. LIPOWSKY und T. R. WEIKL: *Binding constants of membrane-anchored receptors and ligands depend strongly on the nanoscale roughness of membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(38):15283–15288, 2013.
- [105] SALOMO, M., K. KEGLER, C. GUTSCHE, M. STRUHALLA, J. REINMUTH, W. SKOKOV, U. HAHN und F. KREMER: *The elastic properties of single double-stranded DNA chains of different lengths as measured with optical tweezers*. Colloid and Polymer Science, 284(11):1325–1331, 2006.
- [106] SMITH, S. B., Y. CUI und C. BUSTAMANTE: *Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules*. Science, 271(5250):795–799, 1996.
- [107] TOLIĆ-NØRRELYKKE, S. F., M. B. RASMUSSEN, F. S. PAVONE, K. BERG-SØRENSEN und L. B. ODDERSHEDE: *Stepwise Bending of DNA by a Single TATA-Box Binding Protein*. Biophysical Journal, 90(10):3694–3703, 2006.
- [108] BENNINK, M. L., S. H. LEUBA, G. H. LENO, J. ZLATANOVA, B. G. DE GROOTH und J. GREVE: *Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers*. Nature Structural Biology, 8(7):606–610, 2001.
- [109] DAME, R. T., M. C. NOOM und G. J. L. WUITE: *Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation*. Nature, 444(7117):387–390, 2006.
- [110] SALOMO, M., K. KROY, K. KEGLER, C. GUTSCHE, M. STRUHALLA, J. REINMUTH, W. SKOKOV, C. IMMISCH, U. HAHN und F. KREMER: *Binding of TmHU to Single dsDNA as Observed by Optical Tweezers*. Journal of Molecular Biology, 359(3):769–776, 2006.
- [111] SALOMO, M., U. F. KEYSER, K. KEGLER, C. GUTSCHE, M. STRUHALLA, C. IMMISCH, U. HAHN und F. KREMER: *Kinetics of TmHU binding to DNA as observed by optical tweezers*. Microscopy Research and Technique, 70(11):938–943, 2007.
- [112] WAGNER, C., C. OLBRICH, H. BRUTZER, M. SALOMO, U. KLEINEKATHÖFER, U. KEYSER und F. KREMER: *DNA condensation by TmHU studied by optical tweezers, AFM and molecular dynamics simulations*. Journal of Biological Physics, 37(1):117–131, 2011.
- [113] BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO: *Biological Applications of Dynamic Force Spectroscopy*. In: BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO (Herausgeber): *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*, Seiten 193–241. CRC Press, Boca Raton and FL, 2012.
- [114] ALZHEIMER, A.: *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin, (1-2):146–148, 1907.

- [115] VOET, D. und J. G. VOET: *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Hoboken and NJ, 4 Auflage, 2011.
- [116] GOATE, A., M.-C CHARTIER-HARLIN, M. MULLAN, J. BROWN, F. CRAWFORD, L. FIDANI, L. GIUFFRA, A. HAYNES, N. IRVING, L. JAMES, R. MANT, P. NEWTON, K. ROOKE, P. ROQUES, C. TALBOT, M. PERICAK-VANCE, A. ROSES, R. WILLIAMSON, M. ROSSOR, M. OWEN und J. HARDY: *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 349(6311):704–706, 1991.
- [117] CHARTIER-HARLIN, M.-C, F. CRAWFORD, H. HOULDEN, A. WARREN, D. HUGHES, L. FIDANI, A. GOATE, M. ROSSOR, P. ROQUES, J. HARDY und M. MULLAN: *Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the [beta]-amyloid precursor protein gene*. Nature, 353(6347):844–846, 1991.
- [118] MURRELL, J., M. FARLOW, B. GHETTI und M. D. BENSON: *A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease*. Science, 254(5028):97–99, 1991.
- [119] SIMONS, M., P. KELLER, B. DE STROOPER, K. BEYREUTHER, C. G. DOTTI und K. SIMONS: *Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(11):6460–6464, 1998.
- [120] FASSBENDER, K., M. SIMONS, C. BERGMANN, M. STROICK, D. LÜTJOHANN, P. KELLER, H. RUNZ, S. KÜHL, T. BERTSCH, K. VON BERGMANN, M. HENNERICI, K. BEYREUTHER und T. HARTMANN: *Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease betaamyloid peptides A beta 42 and A beta 40 in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(10):5856–5861, 2001.
- [121] CORDY, J. M., I. HUSSAIN, C. DINGWALL, N. M. HOOPER und A. J. TURNER: *Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(20):11735–11740, 2003.
- [122] WILTFANG, J., P. LEWCZUK, P. RIEDERER, E. GRÜNBLATT, C. HOCK, P. SCHELTENS, H. HAMPEL, H. VANDERSTICHELE, K. IQBAL, D. GALASKO, L. LANNFELT, M. OTTO, H. ESSELMANN, A. W. HENKEL, J. KORNHUBER und K. BLENNOW: *Consensus Paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: The role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia*. World Journal of Biological Psychiatry, 6(2):69–84, 2005.
- [123] BARRANTES, A., J. SOTRES, M. HERNANDO-PÉREZ, M. J. BENÍTEZ, P. J. DE PABLO, A. M. BARÓ, J. ÁVILA und J. S. JIMÉNEZ: *Tau Aggregation Followed by Atomic Force Microscopy and Surface Plasmon Resonance, and Single Molecule Tau-Tau Interaction Probed by Atomic Force Spectroscopy*. Journal of Alzheimer's Disease, 18(1):141–151, 2009.

- [124] ALZHEIMER FORSCHUNG INITIATIVE E.V.: *Faktenblatt 2: Zahlen und Daten 2012*. [http://www.alzheimer-forschung.de/images/user-images/downloads/alzheimer-krankheit/Faktenblatt2\\_ZahlenundFakten.pdf](http://www.alzheimer-forschung.de/images/user-images/downloads/alzheimer-krankheit/Faktenblatt2_ZahlenundFakten.pdf), [Online; Stand 23. Mai 2014].
- [125] CAMPBELL, N. A., J. B. REECE und J. MARKL: *Biologie*. Spektrum Lehrbuch. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 6 Auflage, 2003.
- [126] DUCRY, L. und B. STUMP: *Antibody–Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies*. *Bioconjugate Chemistry*, 21(1):5–13, 2009.
- [127] SINGER, D, J. LEHMANN, K. HANISCH, W. HÄRTIG und R. HOFFMANN: *Neighbored phosphorylation sites as PHF-tau specific markers in Alzheimer’s disease*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3):819–828, 2006.
- [128] BORREBAECK, C. A. K.: *Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips*. *Immunology Today*, 21(8):379–382, 2000.
- [129] *Persönliche Kommunikation mit Dr. David Singer*.
- [130] CROCKER, J.C und D. G. GRIER: *When Like Charges Attract: The Effects of Geometrical Confinement on Long-Range Colloidal Interactions*. *Physical Review Letters*, 77(9):1897, 1996.
- [131] LEE, C.-K, Y.-M WANG, L.-S HUANG und S. LIN: *Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein–ligand interaction*. *Micron*, 38(5):446–461, 2007.
- [132] UEBERSCHÄR, O., C. WAGNER, T. STANGNER, C. GUTSCHE und F. KREMER: *A novel video-based microsphere localization algorithm for low contrast silica particles under white light illumination*. *Optics and Lasers in Engineering*, 50(3):423–439, 2012.
- [133] DEMTRÖDER, W.: *Elektrizität und Optik*, Band 2, Ed. 6 der Reihe *Springer-Lehrbuch*. Springer, Berlin, 6 Auflage, 2013.
- [134] WAGNER, C., T. STANGNER, C. GUTSCHE, O. UEBERSCHÄR und F. KREMER: *Optical tweezers setup with optical height detection and active height regulation under white light illumination*. *Journal of Optics*, 13(11):115302, 2011.
- [135] WILLIAMS, M.C: *Optical Tweezers: Measuring Piconewton Forces*. *Single Molecule Techniques*, 2002.
- [136] FAXÉN, H.: *Der Widerstand gegen die Bewegung einer starren Kugel in einer zähen Flüssigkeit, die zwischen zwei parallelen ebenen Wänden eingeschlossen ist*. *Annalen der Physik*, 373(10):89–119, 1922.
- [137] EVANS, E., K. HALVORSEN, K. KINOSHITA und W. P. WONG: *A New Approach to Analysis of Single-Molecule Force Measurements*. In: HINTERDORFER, PETER und

- ANTOINE OIJEN (Herausgeber): *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, Seiten 571–589. Springer US, 2009.
- [138] TEES, D. F. J., R. E. WAUGH und D. A. HAMMER: *A Microcantilever Device to Assess the Effect of Force on the Lifetime of Selectin-Carbohydrate Bonds*. *Biophysical Journal*, 80(2):668–682, 2001.
- [139] AKHREMITCHEV, B. B.: *Immobilization and Interaction Strategies in DFS of Biomolecular Partners*. In: BIZZARRI, A. R. und S. CANNISTRARO (Herausgeber): *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*, Seiten 133–162. CRC Press, Boca Raton and FL, 2012.
- [140] FULWYLER, M. J.: *Electronic Separation of Biological Cells by Volume*. *Science*, 150(3698):910–911, 1965.
- [141] ROTHE, G.: *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*. In: SACK, U., A. TARNOK und G. ROTHE (Herausgeber): *Zelluläre Diagnostik*, Seiten 27–70. Karger, Basel and Freiburg [Breisgau] and Paris and London and New York and Bangalore and Bangkok and Singapore and Tokyo and Sydney, 2007.
- [142] STANGNER, T., D. SINGER, C. WAGNER, C. GUTSCHE, O. UEBERSCHÄR, R. HOFFMANN und F. KREMER: *FACS-sorted particles reduce the data variance in optical tweezers-assisted dynamic force spectroscopy measurements*. *Physical Biology*, 10(4):046004, 2013.
- [143] SALOMO, M.: *Optische Pinzetten zum Studium der Wechselwirkungen zwischen histoähnlichen Proteinen und einzelnen DNA-Molekülen*. Doktorarbeit, 01.01.2007.
- [144] BECK-SICKINGER, A. G., H. WITTNEBEN, K.-D WILLIM, K. RUDOLF und G. JUNG: *Complete L-Alanine Scan of Neuropeptide Y Reveals Ligands Binding to Y1 and Y2 Receptors with Distinguished Conformations*. *European Journal of Biochemistry*, 225(3):947–958, 1994.
- [145] CUNNINGHAM, B. C. und J. A. WELLS: *High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis*. *Science*, 244(4908):1081–1085, 1989.
- [146] TAM, J. P., W. LIU, J.-W ZHANG, M. GALANTINO, F. BERTOLERO, C. CRISTIANI, F. VAGHI und R. DE CASTIGLIONE: *Alanine scan of endothelin: Importance of aromatic residues*. *Peptides*, 15(4):703–708, 1994.
- [147] WEISS, G. A., C. K. WATANABE, A. ZHONG, A. GODDARD und S. S. SIDHU: *Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16):8950–8954, 2000.
- [148] LOZÁN, J. L. und H. KAUSCH: *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler: Mit 39 Tabellen*. Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg, 4 Auflage, 2007.

- [149] SCOTT, D. W.: *On optimal and data-based histograms*. *Biometrika*, 66(3):605–610, 1979.
- [150] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 1: Mechanik und Wärme*. *Mechanik und Wärme*, 2008.
- [151] DALY, N. L., R. HOFFMANN, L. OTVOS und D. J. CRAIK: *Role of Phosphorylation in the Conformation of Tau Peptides Implicated in Alzheimer’s Disease*. *Biochemistry*, 39(30):9039–9046, 2000.
- [152] SIBILLE, N., I. HUVENT, C. FAUQUANT, D. VERDEGEM, L. AMNIAI, A. LEROY, J.-M WIERUSZESKI, G. LIPPENS und I. LANDRIEU: *Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(2):454–462, 2012.
- [153] GINGRAS, A. R., W. H. ZIEGLER, A. A. BOBKOV, M. G. JOYCE, D. FASCI, M. HIMMEL, S. ROTHEMUND, A. RITTER, J. G. GROSSMANN, B. PATEL, N. BATE, B. T. GOULT, J. EMSLEY, I. L. BARSUKOV, G. C. K. ROBERTS, R. C. LIDDINGTON, M. H. GINSBERG und D. R. CRITCHLEY: *Structural Determinants of Integrin Binding to the Talin Rod*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13):8866–8876, 2009.
- [154] ALLEN, M. P. und D. J. TILDESLEY: *Computer simulation of liquids*. Oxford science publications. Clarendon Press and Oxford University Press, Oxford [England] and New York, 1989, c1987.
- [155] FRENKEL, D. und B. SMIT: *Understanding molecular simulation: From algorithms to applications*, Band 1 der Reihe *Computational science series : from theory to applications*. Academic Press and Elsevier e-books, San Diego, 2 Auflage, 2014.
- [156] RAPAPORT, D. C.: *The art of molecular dynamics simulation*. Cambridge University Press, Cambridge and New York, 1995.
- [157] BORN, M. und R. OPPENHEIMER: *Zur Quantentheorie der Molekeln*. *Annalen der Physik*, 389(20):457–484, 1927.
- [158] BERENDSEN, H. J. C., D. VAN DER SPOEL und R. VAN DRUNEN: *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation*. *Computer Physics Communications*, 91(1–3):43–56, 1995.
- [159] DOI, M. und S. F. EDWARDS: *The theory of polymer dynamics*, Band 73 der Reihe *The International series of monographs on physics*. Clarendon Press, Oxford, 1986.
- [160] CERIOTTI, M., G. A. TRIBELLO und M. PARRINELLO: *Simplifying the representation of complex free-energy landscapes using sketch-map*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32):13023–13028, 2011.

- [161] INTERNETPRÄSENZ ZEISS. <https://www.micro-shop.zeiss.com/?s=123870722fe0b4a&l=en&p=us&f=f&a=v&b=d&id=object-0000-142&o=>, [Online; Stand 08. August 2014].
- [162] RÜHE, J., M. BALLAUFF, M. BIESALSKI, P. DZIEZOK, F. GRÖHN, D. JOHANNSMANN, N. HOUBENOV, N. HUGENBERG, R. KONRADI, S. MINKO, M. MOTORNOV, R. R. NETZ, M. SCHMIDT, C. SEIDEL, M. STAMM, T. STEPHAN, D. USOV und H. ZHANG: *Polyelectrolyte Brushes*. In: SCHMIDT, MANFRED (Herausgeber): *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture I*, Band 165 der Reihe *Advances in Polymer Science*, Seiten 189–198. Springer Berlin / Heidelberg, 2004.
- [163] BALLAUFF, M. und O. BORISOV: *Polyelectrolyte brushes*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(6):316–323, 2006.
- [164] SACHS, L.: *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden; mit 317 Tabellen*. Springer, Berlin, 11 Auflage, 2004.

# Publikationsliste

## Peer-reviewed

1. UEBERSCHÄR, O., C. WAGNER, T. STANGNER, C. GUTSCHE und F. KREMER: *The effective hydrodynamic radius of single DNA-grafted colloids as measured by fast Brownian motion analysis*. Polymer, 52:1829, 2011.
2. WAGNER, C., D. SINGER, O. UEBERSCHÄR, T. STANGNER, C. GUTSCHE, R. HOFFMANN und F. KREMER: *Dynamic force spectroscopy on the binding of monoclonal antibodies and tau peptides*. Soft Matter, 7:4370, 2011.
3. GUTSCHE, C., M.M. ELMAHDY, K. KEGLER, I. SEMENOV, T. STANGNER, O. OTTO, O. UEBERSCHÄR, U.F. KEYSER, M. KRUEGER, M. RAUSCHER, R. WEEBER, J. HARTING, Y.W. KIM, V. LOBASKIN, R.R. NETZ und F. KREMER: *Micro-Rheology on (Polymer-Grafted) Colloids Using Optical Tweezers*. Journal of Physics: Condensed Matter, 23:1841114, 2011.
4. UEBERSCHÄR, O., C. WAGNER, T. STANGNER, K. KÜHNE, C. GUTSCHE und F. KREMER: *Drag reduction by DNA-grafting for single microspheres in a dilute  $\lambda$ -DNA solution*. Polymer, 52:4021, 2011.
5. WAGNER, C., T. STANGNER, C. GUTSCHE, O. UEBERSCHÄR und F. KREMER: *Optical tweezers setup with optical height detection and active height regulation under white light illumination*. Journal of Optics, 13:115302, 2011.
6. UEBERSCHÄR, O., C. WAGNER, T. STANGNER, C. GUTSCHE und F. KREMER: *A novel video-based microsphere localization algorithm for low contrast silica particles under white light illumination*. Optics and Lasers in Engineering, 50:423, 2012.

7. UEBERSCHÄR, O., M. KRÜGER, C. GUTSCHE, T. STANGNER, C. WAGNER, K. KÜHNE und F. KREMER: *Microfluidic mobility of single (DNA-grafted) colloids in dilute DNA suspensions*. *Polymer*, 53:5760, 2012.
8. STANGNER, T., D. SINGER, C. WAGNER, O. UEBERSCHÄR, C. GUTSCHE, R. HOFFMANN und F. KREMER: *FACS-sorted particles reduce the data variance in Optical Tweezers assisted Dynamic Force Spectroscopy measurements*. *Physical Biology*, 10:046004, 2013.
9. STANGNER, T., C. WAGNER, D. SINGER, S. ANGIOLETTI-UBERTI, C. GUTSCHE, J. DZUBIELLA, R. HOFFMANN und F. KREMER: *Determining the Specificity of Monoclonal Antibody HPT-101 to Tau-Peptides with Optical Tweezers*. *ACS Nano*, 12:11388, 2013.

## Buchbeiträge

10. STANGNER, T., C. WAGNER, C. GUTSCHE, K. STANGNER, D. SINGER, S. ANGIOLETTI-UBERTI und F. KREMER: *Probing receptor-ligand interactions on a single molecule level using optical tweezers*. Akzeptiert in: H. OHSHIMA (Eds.) *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2014.

# Danksagung

Diese Danksagung möchte ich all denjenigen widmen, die maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

- Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Friedrich Kremer bedanken, der mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit zu erstellen. Weiterhin danke ich ihm für die vielen wertvollen fachlichen Diskussionen und Tipps zur Durchführung der Experimente sowie deren Auswertung.
- Ich danke Prof. Dr. Klaus Kroy für die Zweitbetreuung dieser Arbeit im Rahmen der Graduiertenschule BuildMoNa.
- Besonders hervorzuheben sind meine ehemaligen Kollegen Dr. Christof Gutsche und Dr. Carolin Wagner. Dank der vielen fachlichen sowie alltäglichen Gespräche und Diskussionen herrschte im Büro immer eine tolle Atmosphäre, ohne die so manch missglückter Messtag schwerer zu bewältigen gewesen wäre. Ludwig Popp soll nicht unerwähnt bleiben. Durch die vielen gemeinsamen Mittagessen und Trainingsstunden gab es ausreichend Zeit über interessante, wichtige sowie belanglose Dinge zu diskutieren und zu lachen.
- Prof. Dr. Ralf Hoffmann danke ich für die langjährige, erfolgreiche Zusammenarbeit, aus der viele interessante Ergebnisse und Publikationen hervorgegangen sind. In diesem Zusammenhang möchte ich Dr. David Singer und Dr. Daniel Knappe für die Bereitstellung der Peptide und Antikörper danken, sowie dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten, wenn ich Fragen zu biologischen und biochemischen Problemen hatte.
- Prof. Dr. Joachim Dzubiella und Dr. Stefano Angioletti-Uberti danke ich für die produktive Kooperation und für die Simulation der Tau-Peptid-Strukturen.
- Bei Prof. Dr. Kurt Engeland möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir seine Labore und Geräte zur Verfügung gestellt hat, wenn es Probleme bei der Probenpräparation gab.
- Unerlässlich für die erfolgreiche Durchführungen der Experimente war das schier unerschöpfliche Wissen von Wiktor Skokow und Jörg Reinmuth, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Neben der Herstellung von sehr vielen Messzellen möchte ich Jörg Reinmuth vor allem auch für seine Geduld danken, wenn er mal wieder einen Bericht von mir korrekturlesen musste.

- Für ihre stete Hilfe und Zuarbeit bei allen organisatorischen Angelegenheiten bedanke ich mich bei Karin Girke, Cordula Krause und Kerstin Lohse. Außerdem danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekülphysik für die durchweg freundliche und entspannte Atmosphäre und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft.
- Ich bedanke mich bei Carolin Wagner, Christof Gutsche, Sebastian Sambale, Jörg Reinmuth, David Singer, Stefano Angioletti-Uberti, Jakob Tómas Bullerjahn, Isolde und Konstanze Stangner dafür, dass sie die Zeit und Mühe aufgebracht haben, meine Dissertation orthografisch sowie inhaltlich zu korrigieren.
- Den wichtigsten Platz in meinem Leben nehmen meine Frau Konstanze und mein Sohn Mattis ein. Durch ihre Rücksicht, Hilfe, Motivation, Geduld und Lebensfreude habe ich die Kraft gewonnen, die während des Studiums und der Doktorarbeit nötig war, um beides erfolgreich zu beenden. Besonders das Wissen meiner Frau über biochemische Sachverhalte hat mich mehr gelehrt als jedes Seminar, das ich zu dieser Thematik besucht habe.
- Zu guter Letzt möchte ich meiner gesamten Familie für die jahrelange Unterstützung beim Studium und der Promotion danken. Ohne ihren fortwährenden Rückhalt wären die vergangenen Jahre nicht so reibungslos zu bewältigen gewesen.

**Vielen Dank!**

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und erbrachten Dienstleistungen sind als solche gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der geistigen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt und haben keine geldwerten Leistungen für Arbeiten im Zusammenhang mit der Dissertation erhalten, insbesondere wurde nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt und in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht. Ich versichere, dass keine erfolglosen Prüfungsversuche stattgefunden haben.

Leipzig, den 03. November 2014

.....  
Tim Stangner