

## Detektion einzelner p53-Autoantikörper mit fluoreszenzgelöschten Peptid-Sonden\*\*

Hannes Neuweiler, Andreas Schulz,  
Andrea C. Vaiana, Jeremy C. Smith, Sepp Kaul,  
Jürgen Wolfrum und Markus Sauer\*

Die Entwicklung neuer, schneller und empfindlicher Assay-Formate für die Krebsdiagnostik ist eine große Herausforderung für die biomedizinische Analytik. Da p53-Autoantikörper unabhängige und hochspezifische Tumormarker mit einem hohen Potenzial zur Früherkennung einer Erkrankung sind, sind sie vermehrt in den Brennpunkt der modernen Krebsdiagnostik gerückt.<sup>[1]</sup> Das hier vorgestellte Nachweisverfahren für p53-Autoantikörper beruht auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten, kurzen Peptiden, die von der Antikörper-Erkennungssequenz des p53-Proteins abgeleitet wurden. Die Effektivität dieser Peptid-Sonden zur Früherkennung und Verlaufskontrolle bösartiger Erkrankungen wird durch die Detektion individueller p53-Autoantikörper im klinisch relevanten Konzentrationsbereich, direkt in Seren von Krebspatienten, demonstriert.

Genmutationen in p53, dem „Wächter des Genoms“,<sup>[2]</sup> sind die häufigsten genetischen Veränderungen bei menschlichen Tumoren<sup>[3]</sup> und führen häufig zu einer Immunantwort des Körpers gegen das Zellkern-Tumorsuppressorprotein p53 – das DNA-Transkript des p53-Gens. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von p53-Autoantikörpern in menschlichen Seren mit einer nahezu 100-proz. Sicherheit auf eine maligne Erkrankung hindeutet, falls Autoimmunerkrankungen ausgeschlossen werden können.<sup>[1]</sup> Routinemäßig wird die nach einem heterogenen Verfahren arbeitende ELISA-Technik zur Detektion von p53-Autoantikörpern eingesetzt, deren Detektionslimit im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  M liegt. Große Nachteile dieses Tests sind die Testdauer (im Bereich von mehreren Stunden) und die hohen Kosten, bedingt durch die Verwendung von rekombinantem p53-Protein.

Lubin und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Immunantwort von Krebspatienten nicht gegen die mutierte zentrale Region in der p53-Sequenz gerichtet ist, sondern dass Antikörper hauptsächlich gegen zwei kurze, lineare Peptid-Epitope aus der N-terminalen Region (der Transaktivierungsdomäne) des Proteins gerichtet sind.<sup>[4]</sup> Die Nutzung dieser

Peptide zur Entwicklung eines homogenen, auf Fluoreszenz basierenden Immunassays ist daher vielversprechend.

Die Sequenzen beider Peptid-Epitope enthalten jeweils einen Tryptophan-Rest. Das Indolderivat Tryptophan löscht effizient die Fluoreszenz einiger umgebungssensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, die im roten Spektralbereich absorbieren und emittieren. Hier berichten wir, wie diese Fluoreszenzablösung durch Tryptophan das Design effizienter molekularer Sonden ermöglicht, die eine Antikörpererkennung durch einen starken Fluoreszenzanstieg signalisieren.

Beide immundominanten Epitope wurden N-terminal mit dem im roten Spektralbereich absorbierenden Oxazinfarbstoff MR121 (Abbildung 1a) markiert. Hydrophobe Wech-

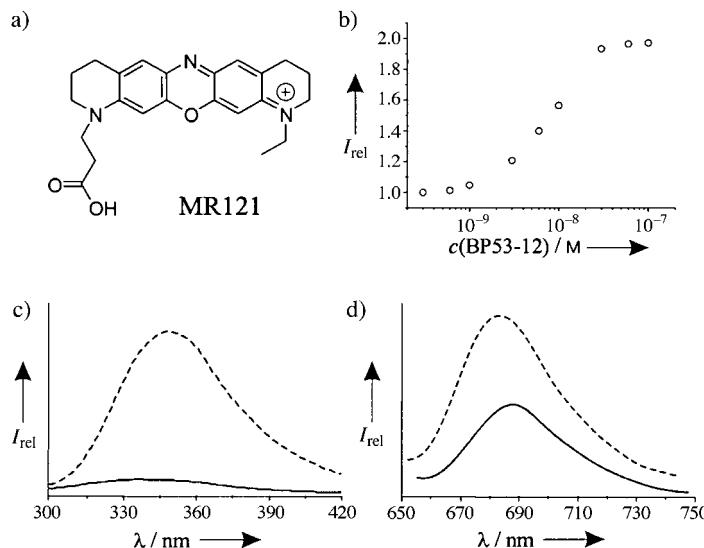


Abbildung 1. a) Struktur des Oxazinfarbstoffs MR121, der zur N-terminalen Markierung der beiden Epitope verwendet wurde (Epitop I: Aminosäuren 15 bis 29, MR121-SQETFSSDLWKLLPEN; Epitop II: Aminosäuren 46 bis 65, MR121-SPDDIEQWFTEDPGPDEAPR). b) Relative Fluoreszenzintensität ( $I_{\text{rel}}$ ) einer  $10^{-8}$  M Lösung des farbstoffmarkierten Epitops I in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Modell-Antikörpers BP53-12; alle Messungen wurden in Assay-Puffer durchgeführt. c)  $I_{\text{rel}}$  des Tryptophan-Restes in markiertem (—) und unmarkiertem (---) Epitop I ( $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ ). d)  $I_{\text{rel}}$  des Farbstoffs in markiertem Epitop I in Abwesenheit (—) und in Gegenwart (---) eines 100fachen Überschusses am Modell-Antikörper BP53-12 ( $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$ ). Abkürzungen der Aminosäuren: A Alanin, D Aspartat, E Glutamat, F Phenylalanin, G Glycin, I Isoleucin, K Lysin, L Leucin, N Asparagin, P Prolin, Q Glutamin, R Arginin, S Serin, T Threonin, W Tryptophan.

[\*] Priv.-Doz. Dr. M. Sauer, H. Neuweiler, Dr. A. Schulz,  
Prof. Dr. J. Wolfrum  
Physikalisch-Chemisches Institut  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49)6221-54-4225  
E-mail: sauer@urz.uni-heidelberg.de  
A. C. Vaiana, Prof. Dr. J. C. Smith  
IWR  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 368, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
Dr. S. Kaul  
Universitätsfrauenklinik Heidelberg  
Voßstraße 7, 69115 Heidelberg (Deutschland)

[\*\*] Die Autoren danken K. H. Drexhage für das Oxazinderivat MR121 und der Volkswagen-Stiftung, dem Land Baden-Württemberg sowie dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie für finanzielle Unterstützung.

selwirkungen führen zu einer Peptidkonformation, in der die Fluoreszenz des Oxazinfarbstoffs durch den Tryptophan-Rest effizient gelöscht wird; die relativen Fluoreszenzausbeuten  $\Phi_{\text{f,rel}}$  sind 0.38 (Epitop I) und 0.21 (Epitop II, Tabelle 1). Verschiebungen in den Absorptions- und Emissionspektronen deuten auf Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Tryptophan sowohl im Grund- wie auch im angeregten Zustand hin. Diese Daten und zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Messungen, die nahezu unveränderte Fluoreszenz-Lebensdauern ergaben (Tabelle 1), stützen das Modell eines statischen Charge-Transfer-Grundzustandskomplexes zwischen Farbstoff und Tryptophan, der nicht oder nur schwach fluoresziert. Die verbleibende Fluoreszenz kann mit einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einer gefalteten

Tabelle 1. Spektroskopische Daten des Oxazinfarbstoffs MR121 und der markierten Epitope.<sup>[a]</sup>

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	$\Phi_{\text{f,rel}}$	$\tau_1$ [ns]	$a_1$	$\tau_2$ [ns]	$a_2$	$\chi^2$
MR121	661	673	1.00	1.85	1.00	—		1.066
MR121-Epitop I	666	683	0.38	0.56	0.06	2.11	0.94	1.107
MR121-Epitop I + BP53-12	666	680	0.76	1.06	0.06	2.16	0.94	1.105
MR121-Epitop II	667	683	0.21	0.51	0.09	2.00	0.91	1.138
MR121-Epitop II + PAb 1801	666	679	0.56	0.61	0.09	1.89	0.91	1.085

[a] Die Messungen wurden in Assay-Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7.7, 0.3 mg mL<sup>-1</sup> Albumin, 0.05 % Tween 20) bei Raumtemperatur durchgeführt.  $\lambda_{\text{abs}}$  und  $\lambda_{\text{em}}$  sind die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima der gemessenen Sonden,  $\Phi_{\text{f,rel}}$  bezeichnet die relative Fluoreszenzquantenausbeute und  $\tau_i$  die Fluoreszenzlebensdauern mit den entsprechenden Amplituden  $a_i$ .

(„gelöschten“) und einer offenen („nicht gelöschten“) Konformation des Konjugats erklärt werden. Messungen der Tryptophanfluoreszenz der markierten Peptide stützen diesen Mechanismus. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist in beiden Epitopen nach Farbstoffkonjugation stark reduziert und das Emissionsmaximum erheblich blauverschoben (von 349 auf 337 nm, Abbildung 1c), was auf eine hydrophobe Umgebung für den Tryptophan-Rest hindeutet.

In-vitro-Antikörperbindungsstudien mit den farbstoffmarkierten Epitopen wurden mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen die N-terminale Region des p53-Proteins durchgeführt. Die Maus-Klone BP53-12<sup>[5]</sup> und Pab 1801<sup>[6]</sup> erkennen spezifisch die Aminosäuren von Epitop I bzw. Epitop II in der humanen p53-Sequenz. Abbildung 1d verdeutlicht, wie die Zugabe von Antikörpern zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Der spezifische Erkennungsprozess des Antikörpers induziert eine Konformationsänderung in der Peptid-Sonde, die die Tryptophan-Farbstoff-Wechselwirkung aufhebt. Dieser aus den spektroskopischen Daten abgeleitete Mechanismus ist in Abbildung 2 gezeigt. Nach Zugabe des Antikörpers ist das Emissionsmaximum des Farbstoffs leicht blauverschoben (Tabelle 1), was anders als beim Tryptophan-Rest eher auf eine hydrophilere Umgebung schließen lässt. Um die Eignung dieser Peptid-Sonden zur Quantifizierung von Antikörpern in homogener Lösung zu testen, wurden die Fluoreszenzintensitäten von 10<sup>-8</sup> M Lösungen der beiden farbstoffmarkierten Peptide in Gegenwart verschiedener Antikörperkonzentrationen gemessen. Wie Abbildung 1b verdeutlicht, können Antikörper bis in den nanomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Die gewonnenen Daten stützen das Modell einer Änderung der Sondenkonformation bei Komplexierung durch den Antikörper: der Tryptophan-Rest zeigt eine starke Wechselwirkung mit der Bindungstasche, was mit einer reduzierten Fluoreszenzlösung einhergeht (Abbildung 2).

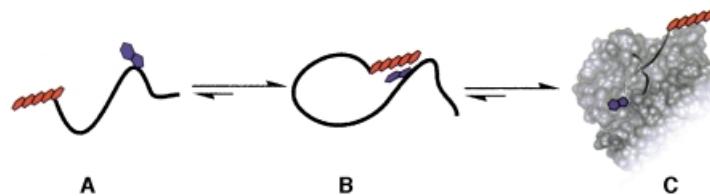


Abbildung 2. Funktionsprinzip der Peptid-Sonden: Die wegen hydrophober Effekte bevorzugte gelöste Konformation **B** des Peptids steht im Gleichgewicht mit einer „offenen“, weniger gelösten Konformation **A**. Bei spezifischer Antikörpererkennung liegt das Peptid in einer neuen Konformation **C** vor, in der die Charge-Transfer-Wechselwirkungen zwischen Tryptophan und Farbstoff stark reduziert sind. Daraus resultiert ein Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit wurden die Fluoreszenzintensitäten durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Die Verwendung von kleinen Anregungs- und Detektionsvolumina reduziert elastische und inelastische Lichtstreuung sowie die Hintergrund-Fluoreszenz erheblich. Detektionsvolumina in der Größenordnung von etwa 1 fL ermöglichen die Beobachtung einzelner Moleküle in 10<sup>-9</sup> bis

10<sup>-12</sup> M Lösungen. Diese können anhand von Photonenschauern („Fluoreszenz-Bursts“) mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis erkannt werden, die bei der Diffusion einzelner Moleküle durch das Detektionsvolumen entstehen.<sup>[7]</sup> Bei Verwendung von roten, gepulsten Diodenlasern als Anregungslichtquellen und von Fluoreszenzfarbstoffen, die im fernen roten Spektralbereich emittieren, ist diese Technik eine wertvolle Methode für Messungen in humanen Blutserum-Proben.<sup>[8]</sup> Da die Einzelmolekül-Spektroskopie ferner die Detektion von Subpopulationen mit nur geringfügig veränderten spektroskopischen Parametern erlaubt, lassen sich gebundene und freie farbstoffmarkierte Epitope über ihre unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten („Burst-Höhen“) unterscheiden.<sup>[9]</sup> Details zum experimentellen Aufbau und zur Datenanalyse sind in der Literatur beschrieben.<sup>[10]</sup>

Abbildung 3 zeigt Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren von 5 × 10<sup>-11</sup> M Lösungen der beiden markierten Epitope in Abwesenheit und in Gegenwart von verschiedenen konzentrierten Lösungen der Modell-Antikörper. Die Zeitspuren der gelöschten Epitope zeichnen sich durch geringe Burst-Höhen mit Zählraten (Photonen s<sup>-1</sup>) bis zu 20–30 kHz bei einer Anregungsenergie von 250 µW aus (Abbildung 3a, d). Die Erkennung durch den Antikörper induziert eine Konformationsänderung im Peptid, was zu einer verminderten Charge-Transfer-Wechselwirkung führt. Folglich können höhere Burst-Raten (Bursts pro Zeit) und Burst-Höhen mit Zählraten bis 100 kHz beobachtet werden (Abbildung 3b, c, e, f). Die etwas niedrigeren Burst-Raten für Epitop II (Abbildung 3e, f) lassen sich durch eine geringere Bindungsaffinität zum Antikörper erklären. Um die Anzahl der Bursts oberhalb eines gegebenen Schwellenwertes zu quantifizieren, wurde eine automatisierte Burst-Erkennungsroutine benutzt: Zur effektiven Unterdrückung gelöschter (ungebundener) Epitope wurden nur Bursts mit Zählraten von mehr als 30 kHz (Epitop I) oder 20 kHz (Epitop II) gewertet. Die Start- und Endpunkte der Bursts wurden durch Zählraten von 5 kHz festgelegt. Mit dieser Erkennungstechnik lag die Hintergrund-Burst-Rate der Epitope bei 0.04 Hz. Das Zählen aller Fluoreszenz-Bursts oberhalb dieser Schwellenwerte ist eine einfache und schnelle Methode zur Steigerung der Assay-Sensitivität.

Abbildung 3g zeigt die Bindungsisotherme von Epitop I, die durch die Titration einer 5 × 10<sup>-11</sup> M Lösung mit dem Maus-Antikörper BP53-12 erhalten wurde. Eine Datenaufnahme von 3 min ist ausreichend, um eine 10<sup>-11</sup> M Antikörperlösung durch eine um das Sechsfache gegenüber dem Schwellenwert von

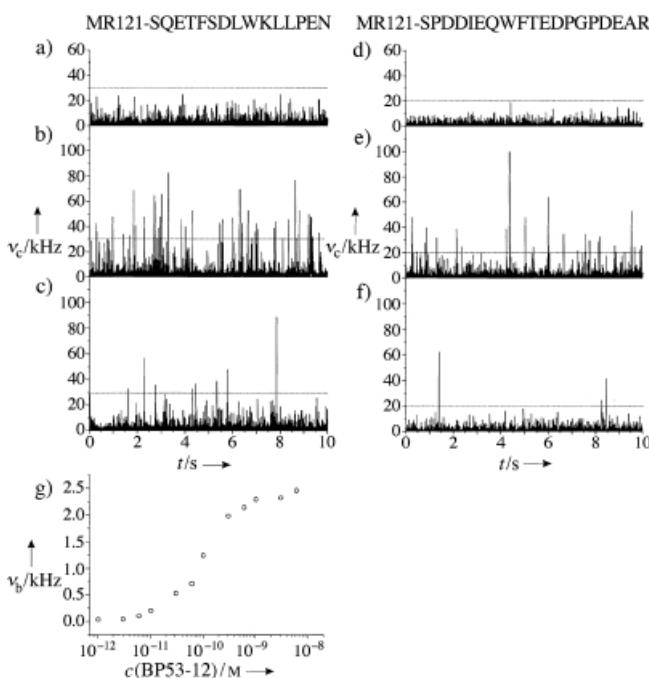


Abbildung 3. Fluoreszenzsignale (Zählrate  $\nu_c$  gegen die Zeit  $t$ ) einer  $5 \times 10^{-11}\text{M}$  Lösung von Epitop I (linke Seite) und Epitop II (rechte Seite) in Abwesenheit (a, d) und Gegenwart der Modell-Antikörper BP53-12 und PAb 1801 in Konzentrationen von  $10^{-9}\text{M}$  (b, e) oder  $10^{-10}\text{M}$  (c, f). Zusätzlich sind die Schwellenwerte für die Burst-Erkennung eingezeichnet. Die Daten sind in Zeitintervallen von 1 ms dargestellt (Laseranregungsenergie in der Probe:  $250\text{ }\mu\text{W}$ ). g) Bindungsisotherme, die aus der Titration einer  $5 \times 10^{-11}\text{M}$  Lösung von Epitop I mit dem Modell-Antikörper BP53-12 erhalten wurde. Die Messungen wurden auf Einzelmolekül-Niveau durchgeführt.

0.04 Hz erhöhte Burst-Rate (0.24 Hz) zu detektieren. Unter Sättigungsbedingungen, d.h. bei einer Antikörperkonzentration von  $10^{-8}\text{M}$ , steigt die Burst-Rate um das 62.5fache an (2.50 Hz, Abbildung 3g). Der Fehler der gemessenen Burst-Raten ist hauptsächlich durch die Dauer der Datenaufnahme determiniert. Der relative Fehler in den gemessenen Burst-Raten  $\nu_b$  ist proportional zu  $N^{-1/2}$  für  $N$  in einem unendlichen Zeitfenster gezählte Bursts. Für eine Burst-Rate von 2.5 Hz, die sich aus 450 detektierten Bursts innerhalb von 3 min berechnet, ist damit der Fehler zu vernachlässigen. Für kleinere Burst-Raten wie 0.24 Hz liegt der Fehler im Bereich von 15 %. Anders als bei den Einzelmolekül-Messungen steigt in Ensemble-Messungen die Fluoreszenzintensität lediglich um das Doppelte an. Die entscheidend verbesserte Unterscheidung zwischen gelöschten und nicht gelöschten Peptid-Epitopen demonstriert den Vorteil der Einzelmolekül-Spektroskopie gegenüber Ensemble-Messungen für diagnostische Anwendungen.

Ob die entwickelten Peptid-Sonden für die Krebsfrüherkennung und zur Überwachung des Krankheitsverlaufs einsetzbar sind, wurde in einer Studie mit Blutserum-Proben von Krebs-Patienten und gesunden Spendern untersucht. Hierbei sollte gezeigt werden, dass die entwickelten Peptid-Sonden auch von humanen p53-Autoantikörpern erkannt werden. Als potenziell positive Proben wurden Seren von 40 Brustkrebs-Patientinnen getestet. Alle Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur mit einer  $10^{-11}\text{M}$  Lösung beider Epitope inkubiert.

Während die Seren der gesunden Personen Burst-Höhen  $< 60\text{ kHz}$  für 1:10-Verdünnung und  $< 30\text{ kHz}$  für 1:100-Verdünnung aufweisen (Abbildung 4), finden sich in 8 von 40 Seren der Brustkrebspatientinnen deutlich höhere Signale, die leicht gegen die Signale ungebundener Epitope und die Autofluoreszenz des Serums diskriminiert werden können (Abbildung 4c–e). Für Serum-Messungen muss der Schwellenwert für eine effiziente Diskriminierung zwischen positiven und negativen Signalen entsprechend der Autofluoreszenzintensität und somit der Serum-Verdünnung gewählt werden. Für Serum-Verdünnungen von 1:100 oder 1:1000 wurde z.B. ein Schwellenwert von  $30\text{ kHz}$  verwendet, während für 1:10-Verdünnungen ein Schwellenwert von etwa  $60\text{ kHz}$  notwendig war. Abbildung 4e verdeutlicht, dass sogar in einer 1:1000-Verdünnung einer positiven Serum-Probe p53-Autoantikörper mit einer gemessenen Burst-Rate von 0.16 Hz eindeutig identifiziert werden konnten. Mit derselben Burst-Erkennungstechnik wurden in negativen Serum-Proben Burst-Raten von 0.01 bis 0.05 Hz gefunden.

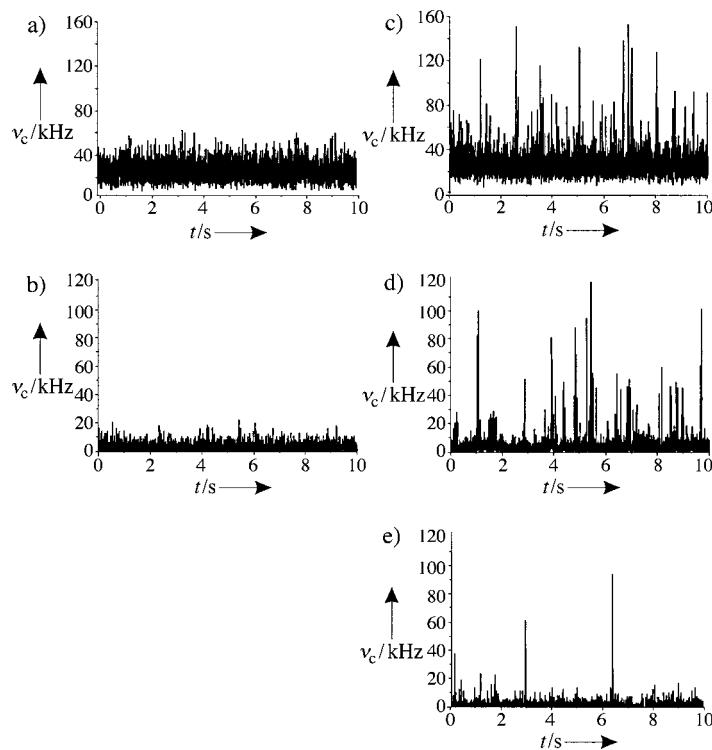


Abbildung 4. Zeitaufgelöste Fluoreszenzintensitäten einer 1:1-Mischung beider Epitope ( $5 \times 10^{-11}\text{M}$ ) in verdünnten Humanserum-Proben. a) 1:10- und b) 1:100-Verdünnung einer Serum-Probe eines gesunden Spenders. c)–e) 1:10-, 1:100- bzw. 1:1000-Verdünnung einer Serum-Probe einer Brustkrebspatientin mit nachgewiesener p53-Protein-Akkumulation im Tumorgewebe.

Um die Ergebnisse mit heterogenen Assays zu vergleichen, wurden ELISA-Tests mit denselben Serum-Proben in gleichen Verdünnungen durchgeführt, wobei rekombinantes, immobilisiertes p53-Protein als Antigen diente. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind die Sensitivität und der dynamische Bereich der neuen Sonden und des konventionellen ELISA-Tests vergleichbar. Beim ELISA-Test wird durch unspezifische Oberflächenadsorption von Serum-Protein

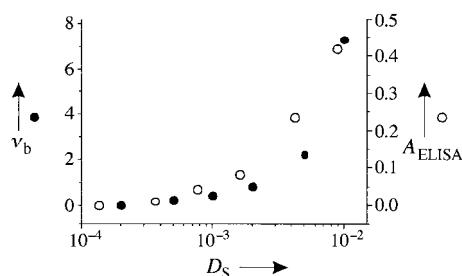


Abbildung 5. Direkter Vergleich der Sensitivität und des dynamischen Bereichs des neuen homogenen Assays (die Burst-Rate  $v_b$  entspricht dem Mittelwert der in einem Zeitfenster von 400 s gezählten Bursts pro Sekunde oberhalb eines Schwellenwertes von 30 kHz) mit dem konventionellen heterogenen ELISA (relative Absorption  $A_{ELISA}$  gemessen bei 450 nm nach enzymatischer Amplifikation). Gemessen wurde dieselbe Serum-Probe in verschiedenen Verdünnungen  $D_S$ . Quantitative ELISA-Tests von Serum-Proben, die weniger als 1:100 verdünnt sind, werden durch unspezifische Oberflächenadsorption erschwert.

und nachfolgende Bindung von Sekundärantikörpern ein spezifischer Antikörper-Nachweis in Serum-Verdünnungen  $< 1:100$  erschwert. Im Gegensatz hierzu erlaubt der neue homogene Test auch Messungen in nur wenig verdünnten Serum-Proben (Abbildung 4c). Da der homogene Test Inkubationszeiten von nur 1 h benötigt, ist er bedeutend schneller als der ELISA, dessen Durchführung zahlreiche zeitaufwendige Wasch- und Inkubationsschritte erfordert. Ferner ist die Synthese größerer Mengen an Peptid-Sonden unkompliziert und kostengünstig im Vergleich zum Einsatz von rekombinantem p53-Protein. Da mehr als 90 % der p53-Autoantikörper-positiven Seren von Patienten mit verschiedenen Krebsarten mit wenigstens einem der beiden untersuchten immundominanten N-terminalen Epitope reagieren,<sup>[4]</sup> scheint der hier vorgestellte homogene Test ideal für das schnelle Hochdurchsatz-Screening auf p53-Autoantikörper geeignet zu sein. Des Weiteren erlaubt die zeitaufgelöste Messung der Burst-Rate die Bestimmung der Antikörper-Bindungskinetiken in Echtzeit. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Einzelmolekül-Spektroskopie eine elegante Methode zur effizienten Diskriminierung zwischen Spezies mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten ist. Die klinische Durchführbarkeit des entwickelten Assays stand in den hier beschriebenen Experimenten nicht im Vordergrund. Die erhaltenen Ergebnisse weisen aber dennoch darauf hin, dass rationell entwickelte, fluoreszenzmarkierte Peptid-Sonden in Kombination mit der Einzelmolekül-Detektionstechnik neue Wege zur Früherkennung maligner Erkrankungen und zur Verlaufskontrolle direkt aus menschlichen Serumproben eröffnen können. Derzeit wird die Spezifität des Assays zur Detektion von p53-Autoantikörpern unter realen klinischen Bedingungen getestet. Leider ist ein absoluter Vergleich der Ergebnisse, die mit dem neuen homogenen Verfahren erhalten wurden, mit dem konventionell eingesetzten ELISA nicht unproblematisch. Wie gezeigt werden konnte, sind die mit verschiedenen p53-Autoantikörper-ELISAs von derselben Serum-Probe erhaltenen Ergebnisse nicht immer konsistent.<sup>[11]</sup> Diese Diskrepanz resultiert vermutlich aus der Verwendung unterschiedlicher Antigene, verschiedener „Cut-off“-Schwellen und verschiedener Immobilisierungs- und Passivierungstechniken. Mit dem hier vorgestellten, homoge-

nen Assay könnten diese Probleme in naher Zukunft vermieden werden.

### Experimentelles

Die N-terminale Markierung der Peptide mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde mithilfe klassischer Succinimidylester(NHS-Ester)-Chemie unter Verwendung von Standardlösungsmitteln der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt. Der Oxazinfarbstoff MR121 (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) und das synthetische Peptid (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) wurden jeweils in Dimethylformamid gelöst. 10  $\mu\text{L}$  (10 nmol) der Farbstofflösung wurden zu 100  $\mu\text{L}$  (100 nmol, 10facher Überschuss) der Peptidlösung und 2  $\mu\text{L}$  Diisopropylethylamin gegeben. Die Lösung wurde 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Konjugat wurde durch Umkehrphasen-HPLC (Hypersil-ODS-Säule: Knauer, Berlin; HPLC: Agilent Technologies, Waldbronn) mit einem Gradienten von 0–75 % Acetonitril in 0.1 M wässrigem Triethylammoniumacetat gereinigt und in Ausbeuten von ca. 55 % erhalten. Die Reinheit der Produkte wurde mithilfe der Kapillargelelektrophorese bestimmt. Zur Durchführung der Antikörper-Bindungsstudien und Serum-Messungen wurden die vorgemischten Lösungen (Assay-Puffer: 0.1 M Natriumphosphat, pH 7.7, 0.3  $\text{mg mL}^{-1}$  Hühnereiweißalbumin, 0.05 % Tween 20) 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Der p53-Autoantikörper-ELISA-Kit wurde von Dianova (Hamburg) bezogen. Die Assays der Serumproben wurden nach dem vom Anbieter vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Die  $\Phi_{\text{fre}}$ -Werte sind auf die Fluoreszenzintensität des freien Farbstoffes bezogen. Die Ensemble-Fluoreszenzlebensdauern  $\tau$  wurden mit einem Standardspektrometer für zeitkorreliertes Einzelphotonenzählern (TCSPC) der Firma IBH (Modell 5000 MC; Glasgow, Großbritannien) aufgenommen. Hierbei wurde die Probe mit einer gepulsten Laserdiode bei 635 nm angeregt (4096 Kanäle à 12.5 ps, 5000 Photonen im Maximumskanal). Um Polarisationseffekte auszuschließen, wurde die Fluoreszenz unter dem „magischen“ Winkel von 54.7° detektiert. Die Fluoreszenzabklingparameter wurden mit der Methode der kleinsten Quadrate und die Qualität der Anpassung über einen  $\chi^2$ -Test bestimmt. Wenn ein monoexponentielles Modell die gemessene Abklingfunktion nicht zufriedenstellend beschreiben konnte, wurde ein mehrexponentielles Modell zur Anpassung der Abklingfunktion verwendet [Gl. (1)]. Hierbei sind  $a_i$  die

$$I(t) = I(0) \sum a_i \tau_i \quad (1)$$

präexponentiellen Faktoren, die die Anteile der angeregten Spezies mit den Lebensdauern  $\tau_i$  wiederspiegeln. Wegen der begrenzten Zeitauflösung können stark gelöschte Populationen mit Abklingdauern kürzer als etwa 50 ps durch die verwendete Messapparatur nicht erfasst werden.

Der Aufbau für Einzelmolekül-Experimente besteht im Wesentlichen aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop, das mit einem gepulsten Diode-laser ausgerüstet ist, der Laserpulse bei 635 nm (100 ps Halbwöhnenbreite) mit einer Wiederholungsfrequenz von 64 MHz emittiert (Picoquant, Berlin). Der kollimierte Laserstrahl wurde über einen halbdurchlässigen Spiegel (645DLRP; Omega Optics, Brattleboro, VT, USA) in ein Öl-Immersionsobjektiv (100x, NA 1.4; Nikon, Japan) eingekoppelt. Die mittlere Laserleistung in der Probe betrug 250  $\mu\text{W}$ . Das Fluoreszenzsignal wurde vom selben Objektiv gesammelt, mithilfe eines Bandpass-Filters (675RDF50; Omega Optics, Brattleboro, VT, USA) spektral mit einer 100- $\mu\text{m}$ -Lochblende räumlich gefiltert und auf die aktive Fläche einer Lawinen-Photodiode (AQR-14; EG&G, Kanada) abgebildet. Das Detektorsignal wurde mithilfe einer PC-Einsteckkarte (SPC-630; Becker&Hikkel, Berlin) aufgenommen. Die Probenlösungen wurden in einen Objektträger mit Mulde pipettiert und mit einem Deckglas verschlossen.

Ein eingegangen am 18. Juni 2002,  
veränderte Fassung am 18. September 2002 [Z19549]

- [1] T. Soussi, *Immunol. Today* **1996**, *17*, 354–356.
- [2] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15–16.
- [3] a) J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, *Nature* **1989**, *342*, 705–708; b) M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris, *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- [4] R. Lubin, B. Schlichtholz, D. Bengoufa, G. Zalcman, J. Trédaniel, A. Hirsch, C. Caron de Fromental, C. Preudhomme, P. Fenaux, G.

- Fournier, P. Mangnin, P. Laurent-Puig, G. Pelletier, M. Schlumberger, F. Desgrandchamps, A. Le Duc, J. P. Peyrat, N. Janin, B. Bressac, T. Soussi, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5872–5876.
- [5] J. Bartek, J. Bartkova, J. Lukas, Z. Staskova, B. Vojtesek, D. P. Lane, *J. Pathol.* **1993**, *169*, 27–34.
- [6] L. Banks, G. Matlashewski, L. Crawford, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *159*, 529–534.
- [7] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, *Science* **1994**, *266*, 1018–1021.
- [8] M. Sauer, C. Zander, R. Mueller, B. Ullrich, K. H. Drexhage, S. Kaul, J. Wolfrum, *Appl. Phys. B* **1997**, *65*, 427–431.
- [9] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683.
- [10] M. Sauer, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Foldes-Papp, F. Goebel, K. T. Han, R. Rigler, A. Schulz, J. Wolfrum, C. Zander, *J. Biotechnol.* **2001**, *86*, 181–201.
- [11] M. Montenarh, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2000**, *125*, 141–143.