

Menlo Systems GmbH

Dr. Michael Mei
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried
Tel.: 089 189166-0
Fax: 089 189166-11
E-Mail: m.mei@menlosystems.com
www.menlosystems.com

Branche: Kurzpuls-Lasertechnologie, Faserlaser
Projektschwerpunkte: Bereitstellung und Weiterentwicklung der Kurzpuls-Lasersysteme

Roper Scientific GmbH

Wilhelm Pfanhauser
Rosenheimer Landstraße 87
85521 Ottobrunn
Tel.: 089 660779-3
Fax: 089 660779-50
E-Mail: wpfanhauser@roperscientific.de
www.roperscientific.de

Branche: CCD Technologie
Projektschwerpunkte: Bereitstellung und Weiterentwicklung der EMCCD-Sensoren

TILL Photonics GmbH

Dr. Josef Utz
Lochhamer Schlag 19
82166 Gräfelfing
Tel.: 089 895662-241
Fax: 089 895662-101
E-Mail: utz@till-photonics.com
www.till-photonics.com

Branche: Mikroskopie
Projektschwerpunkt: Entwicklung einer FCS-Reader-Plattform

Parallelisierte Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit Einzelmolekül-Analyse für pharmazeutische Screening-Verfahren und medizinische Diagnostik (FCS-Sensor)

Das Projekt

Ziel des Vorhabens ist die Entwicklung einer neuen Art der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), basierend auf der Anregung durch das evaneszente Feld eines Wellenleiters. Bei der Totalreflexion zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes fällt die Lichtintensität hinter der Grenzfläche nicht abrupt auf Null ab, sondern klingt exponentiell ab. Dieser Bereich wird als evaneszentes Feld bezeichnet. Das eingestrahelte Licht – hier von einem Laser erzeugt – dringt somit noch wenige hundert Nanometer tief in das zweite Medium ein. Gibt man der Strahlungsenergie innerhalb der Eindringtiefe die Möglichkeit zur Wechselwirkung, kann sie zurückgehalten werden, z. B. durch Absorption, Anregung von Fluoreszenz oder durch ein weiteres Prisma oder einen Wellenleiter, in dem das Licht propagieren kann. Man bezeichnet dies als abgeschwächte Totalreflexion.

Durch die neuartige Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie sollen molekulare Prozesse an Grenzflächen in vitro sowie membrangebundene Prozesse in lebenden Zellen in Echtzeit verfolgt werden. Das neuartige Verfahren zeichnet sich durch einen hohen Parallelisierungsgrad bei gleichzeitiger Ausweitung der erfassten Messparameter aus und verspricht eine extrem hohe Empfindlichkeit, die unter bestimmten Bedingungen sogar ein Monitoring von Einzelmolekülen gestattet. Zudem ergibt sich eine Vereinfachung des gerätetechnischen Aufwandes gegenüber existierenden FCS-Methoden.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde erstmals 1972 von Magde, Elson und Webb beschrieben. Sie basiert auf dem Zusammenhang zwischen spontanen Fluktuationen im Fluoreszenzsignal kleiner Molekülensembles und den zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen. Auf diese Weise kann die Dynamik inter- und intramolekularer Vorgänge in Form von Gleichgewichtskonzentrationen, Diffusionsraten, Reaktionskinetiken und Bindungsaffinitäten ohne Störung des Gleichgewichts untersucht werden. Um spontane zeitliche Fluktuationen eines Signals

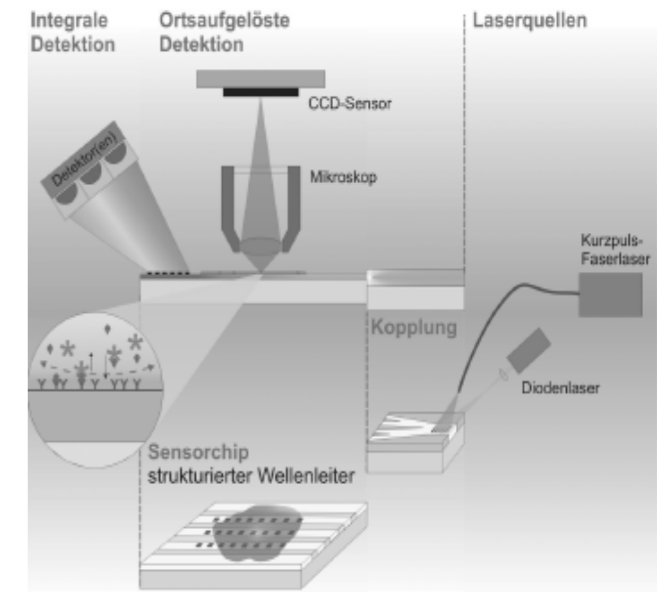


Bild 1: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen, neuen FCS-Technologie

messen zu können, muss das analysierte System so klein wie möglich gehalten werden. Erreichen kann man diese Beschränkung durch Kombination winziger Messvolumina mit sehr geringen Konzentrationen der fluoreszierenden Moleküle. Die hohe Empfindlichkeit der Messung molekularer Interaktionen in kleinen Volumina machte das FCS-Verfahren zur erfolgreichen High-Throughput-Screening Methode bei der pharmazeutischen Wirkstoffsuche.

Die FCS wird bisher mit Konfokalmikroskopen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Varianten des Lichtmikroskops, die zweidimensionale optische Schnitte mit mikroskopischer Auflösung in dreidimensionalen Objekten erzeugen können. Mit einem Computer können diese Schnittbilder schichtweise zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden. Im Gegensatz zur derzeit konfokal durchgeführten FCS ist das Ziel des vorliegenden Projektes die Realisierung von FCS-Messungen auf einem wellenleiterbasierten Biochip. In Analogie zur Totalreflektions-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence; TIRF) erfolgt die Anregung der Fluoreszenz durch das evaneszente Feld des im Wellenleiter geführten Anregungslichts. In Verbindung mit der Beobachtung über ein Mikroskop und einen CCD-Flächensensor lässt sich die FCS damit zum einen erheblich parallelisieren. Gleichzeitig wird das Anregungsvolumen erheblich reduziert – eine Folge der geringen Ausdehnung des evaneszenten Feldes senkrecht zur Wellenleiteroberfläche –, was in einer größeren Sensitivität des Verfahrens resultiert.

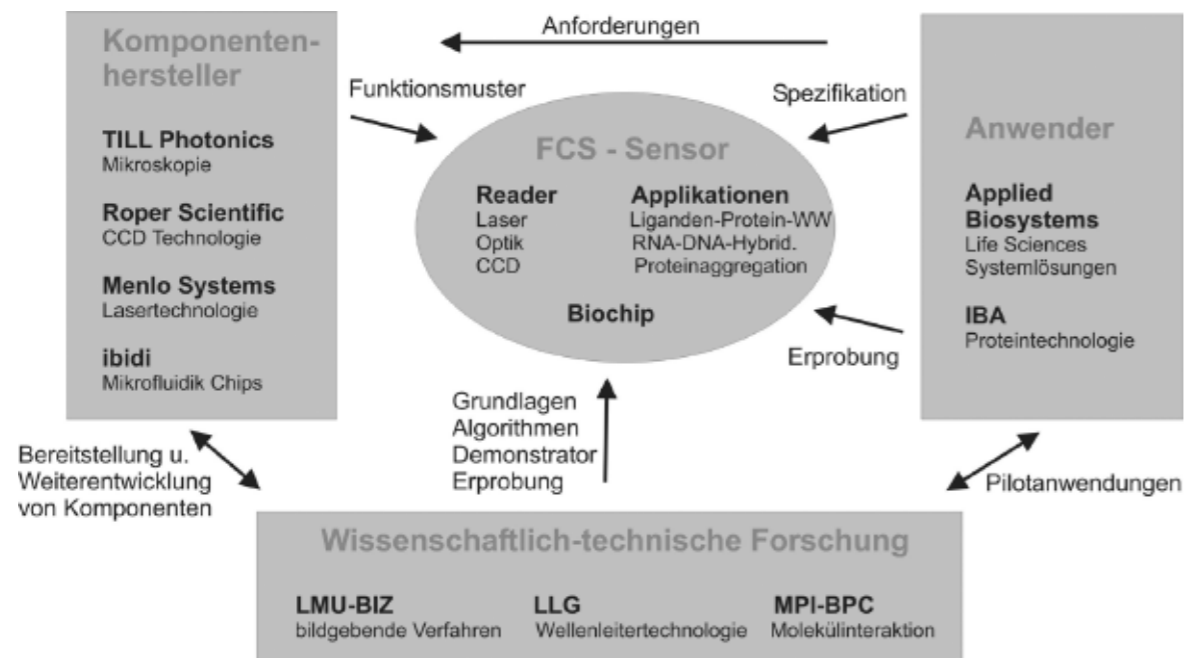


Bild 2: Netzwerk der Projektpartner

Ein weiterer Vorteil zum gezielten Studium von Molekül-Interaktionen besteht in der Möglichkeit, einen Bindungspartner auf dem Chip immobilisieren zu können. Während bei konventioneller FCS der Bindungsgrad aus der teils sehr geringen Verlangsamung der Diffusion des Komplexes gegenüber den einzelnen Molekülen abgeleitet werden muss, wird bei dem vorgeschlagenen FCS-Chip die Verweildauer eines fluoreszierenden Targets im evaneszenten Feld direkt durch die Affinität für den immobilisierten Liganden bestimmt (die Diffusion durch die extrem dünne Grenzschicht ist sehr schnell). Aus den Korrelationskurven lassen sich neben der Dissoziationskonstante auch Anbindungs- und Abbindungsraten bestimmen.

Zur Einführung des Verfahrens in den pharmazeutischen Screening-Markt werden Pilotanwendungen aus den Bereichen Liganden-Protein-Wechselwirkung und RNA-DNA-Hybridisierung erarbeitet. Im Diagnostik-Bereich zielt die Entwicklung auf die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen, z. B. bei pathophysiologischen Prozessen wie Erkrankungen, die auf falscher Proteinfaltung beruhen (z. B. Prionen, Creutzfeld-Jakob-Erkrankung) oder auf pathologischen Proteinkomplexen (z. B. Alzheimer). Innerhalb des Projektes werden auf Basis der wellenleiterbasierten FCS-Analyseprodukte entwickelt, die die Erforschung des Proteoms als „drug-target“ verbessern helfen.

Die Kooperation

Das beantragte Vorhaben soll in einem Netzwerk aus eng kooperierenden Forschungseinrichtungen und Industriepartnern bearbeitet werden. Mit Schwerpunkten in den Bereichen Wellenleitertechnologie und Mikrostrukturierung, Anwendung bildgebender Verfahren auf biologische Objekte, sowie Grundlagen der Interaktion von Biomolekülen ergibt sich eine ideale Ergänzung der Kernkompetenzen bei den beteiligten Instituten. Bei allen wesentlichen Kompo-

nenten (Lichtquelle, Biochip, Mikroskop, CCD Sensor) wird auf der technologischen Seite des Vorhabens das Know-how jeweils eines Industriepartners eingebracht. In Kombination mit der Marktkenntnis der Partner auf der Anwendungsseite, stellt der gesamte Verbund eine gute Basis zur Realisierung und Markteinführung des neuen FCS-Verfahrens dar.

Die Perspektiven

In dem geplanten Vorhaben werden Technologien und wissenschaftliche Grundlagen erarbeitet, die zur Entwicklung eines neuartigen Analysesystems führen, dessen Marktpotential von den Applikationen in der Bioanalytik bestimmt wird. Alle bisherigen Anwendungen der FCS-Analyse sollten auch mit der neuen Technik zugänglich sein. Durch die Parallelisierung und die angestrebte hohe Sensitivität der neuen Methode, können Assays vereinfacht und zugehörige Verfahren beschleunigt und rationalisiert werden. Damit werden sich eine Reihe von neuen Anwendungen ergeben, die einen breiten Einsatz im pharmazeutischen Screening-Bereich mit einem enormen Weltmarktpotential erwarten lassen. An der Erschließung neuer Anwendungen wird parallel im Projekt gearbeitet.

Die biomedizinische Forschung verlagert ihr Interesse im post-genomischen Zeitalter immer mehr auf die Erforschung des Proteoms und damit auf die Interaktion zwischen Proteinen. Da die FCS-generierten Analysedaten auf Einzelmolekülebene essentielle Analyseparameter bei der Erforschung der Protein-Protein-Wechselwirkung liefern, ermöglicht das neue Verfahren die Entwicklung von Analyseprodukten, die die Erforschung von Proteinen als „drug-target“ verbessern helfen. Auch hier besteht im pharmazeutischen und medizinischen Forschungsmarkt weltweit ein großes Potential. Durch das im Verbund „FCS-Sensor“ geplante Vorhaben soll das Studium bestimmter molekularer

Wechselwirkungen dramatisch vereinfacht werden. Zur FCS-Analyse ist damit in Zukunft kein komplettes Forschungsmikroskop mehr erforderlich, sondern nur noch eine relativ einfache Reader-Technologie. Entsprechend erschließen sich dann der FCS-Methode völlig neue Märkte im Bereich der medizinischen Diagnostik, wo anstatt einiger weniger teurer zentraler Messstationen in Zukunft viele preiswertere, dezentral platzierte FCS-Reader eingesetzt werden können.

Insgesamt kann die Umsetzung der technologischen Entwicklungen in dem geplanten Vorhaben einen wesentlichen Beitrag zur Festigung und zum weiteren Ausbau der Spitzenstellung Deutschlands in dem Markt für FCS-Systeme leisten.

Das Projekt im Überblick

Parallelisierte Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit Einzelmolekül-Analyse für pharmazeutische Screening-Verfahren und medizinische Diagnostik (FCS-Sensor)
Technologiefeld / Branche: Life Sciences, Medizinische Diagnostik, Proteintechnologie, Mikroskopie, Mikrofluidik Chips, CCD Technologie, Lasertechnologie
Laufzeit: 1.1.2006 bis 31.12.2008
Projektkosten: 1.318.055 Euro
Förderungssumme: 1.207.059 Euro

Projektpartner Forschung

Laser-Laboratorium Göttingen e. V.

(Koordinator)
 Dr. Thomas Fricke-Begemann
 Hans-Adolf-Krebs-Weg 1
 37077 Göttingen
 Tel.: 0551 5035-45
 Fax: 0551 5035-99
 E-Mail: tfb@llg.gwdg.de
 www.llg.gwdg.de
Fachgebiete: Laser, Optik, Photonik
Projektschwerpunkte: Wellenleiter- und Anregungstechnologie, Projektkoordination

Ludwig-Maximilians-Universität München

Biolumineszenz Zentrum
 Dr. Christian Seebacher
 Geschwister-Scholl-Platz 1
 80539 München
 Tel.: 089 2180-74189
 Fax: 089 2180-74192
 E-Mail: seebacher@biz.uni-muenchen.de
 www.biz.uni-muenchen.de
Fachgebiet: Life Science Mikroskopie
Projektschwerpunkte: Bildgebende Verfahren: Optimierung der Photonen-Anregung auf Basis der TIRF, Elemente der CCD-Auslesemodi

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Dr. Jürgen Klingauf
 Am Fassberg 11
 37077 Göttingen
 Tel.: 0551 201-1629
 Fax: 0551 201-1688
 E-Mail: J.Klingauf@mpi-bpc.mpg.de
 www.gwdg.de
Fachgebiet: Grundlagen der biophysikalischen Chemie
Projektschwerpunkte: Aufbau und Anpassung des TIRF-Messstandes, Einkopplung des Anregungs-Lasers, Integration und Test des Wellenleiter-Chips und des CCD-Sensors, Erprobung und Validierung des Funktionsmusters an einfachen in-vitro Systemen

Projektpartner Industrie

Applera Deutschland GmbH

Applied Biosystems
 Dr. Alexander Jung
 Frankfurter Straße 129B
 64293 Darmstadt
 Tel.: 07551 9178-15
 Fax: 07551 9178-30
 E-Mail: Alexander.Jung@eur.appliedbiosystems.com
 www.appliedbiosystems.com
Branche: Life Sciences
Projektschwerpunkte: Pilotapplikationen, Systemvalidierung

IBA BioTAGnology GmbH

PD Dr. Joachim Bertram
 Rudolph-Wissell-Straße 28
 37079 Göttingen
 Tel.: 0551 50672-118
 Fax: 0551 50672-181
 E-Mail: bertram@iba-go.com
 www.iba-go.com
Branche: Proteintechnologie
Projektschwerpunkte: biologische Funktionalisierung der Wellenleiteroberflächen, Definition der Systemanforderungen, Erprobung der Funktionsmuster

ibidi GmbH

Dr. Valentin Kahl
 Schellingstraße 4
 80799 München
 Tel.: 089 2180-6337
 Fax: 089 2180-13539
 E-Mail: vkahl@ibidi.de
 www.ibidi.de
Branche: Mikrofluidik Chips
Projektschwerpunkt: Integration der Wellen leitenden Biochips in das Gesamtsystem