



## TILL Photonics GmbH (KMU)

Dr. Rainer Uhl  
Lochhamer Schlag 19  
82166 Gräfelfing  
Tel.: 089 895662-0  
Fax: 089 895662-101  
E-Mail: info@TILL-photonics.com  
www.till-photonics.com

### Branche:

Mikroskopie, Imaging für die Lebenswissenschaften

### Projektschwerpunkte:

Aufbau und Anpassung eines Mikroskops für das Raman-Screening-Verfahren

## ECH Elektrochemie Halle GmbH (KMU)

Dr. Michael Hahn  
Weinbergweg 23  
06120 Halle  
Tel.: 0345 5583-736  
Fax: 0345 5583-710  
E-Mail: info@ech.de  
www.ech.de

### Branche:

Analytik, Software

**Projektschwerpunkte:** Softwareentwicklung für die Auswertung von Ramanspektren im automatisierten Screeningverfahren

## Tecan Deutschland GmbH

Norbert Tiesler  
Theodor-Storm-Str. 17  
74564 Crailsheim  
Tel.: 02683 9882-0  
Fax: 02683 9882-15  
E-Mail: norbert.tiesler@tecan.com  
www.tecan.de

### Branche:

Laborautomation, Liquid Handling

### Projektschwerpunkte:

Entwicklung von Pipettierverfahren für kleinste Volumina

## Tecan Austria GmbH

Dr. Alois Krutzenbichler  
Untersbergstr. 1A  
A-5082 Gröding  
Tel.: +43 6246 8933-163  
Fax: +43 6246 8933-6163  
E-Mail: alois.krutzenbichler@tecan.com  
www.tecan.com

### Branche:

Fluoreszenzreader

### Projektschwerpunkte:

Abschätzung der wirtschaftlichen Erfolgsaussichten des Raman-Screening-Verfahrens

## Taorad GbR (KMU)

Dr. Kurt Hoffmann  
Forckenbeckstr. 6  
52074 Aachen  
Tel.: 0241 608512030  
E-Mail: hoffmann@molbiotech.rwth-aachen.de

### Branche:

Proteinkristallographie

### Projektschwerpunkte:

Anpassung von Probenträgern für das Raman Screening, Ramankristallographie (Fragment Screening)

## Markerfreies Raman Screening zur molekularen Untersuchung biologischer Wechselwirkungen (MARAS)

### Das Projekt

In dem Projekt MARAS wird ein neuartiges Verfahren zur Untersuchung von Bindungsereignissen zwischen biologisch relevanten Molekülen entwickelt.

Spezifische Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und ihren molekularen Interaktions- oder Bindungspartnern bilden die Basis für fast alle biochemischen Prozesse in lebendigen Zellen. Die Bindung eines Rezeptors mit einem Liganden, zwischen komplementären DNA Einzelsträngen, zwischen Enzymen und ihren Substraten oder zwischen Antigenen und Antikörpern basiert dabei auf molekularen Erkennungsvorgängen, die in der Regel hochspezifisch verlaufen.

Die Erkennung solcher spezifischen Wechselwirkungen ist sowohl für das Verständnis der biochemischen Abläufe als auch für ein gezieltes Eingreifen mittels pharmakologischer Wirkstoffe unabdingbar. Zur Identifizierung möglicher Wirkstoffsubstanzen, die Proteine blockieren oder aktivieren können, werden heute so genannte Screeningverfahren zur Durchmusterung großer Substanzbibliotheken eingesetzt. Dabei hat sich die Fluoreszenzspektroskopie als ein empfindliches Verfahren zur Erkennung einer Wechselwirkung etabliert. Nachteil der Fluoreszenzmethoden ist jedoch die Notwendigkeit, Proteine mit Farbstoffmolekülen zu markieren. Dies erfordert nicht nur zusätzlichen Präparationsaufwand sondern stellt auch eine Veränderung des Proteins mit unter Umständen veränderten Bindungseigenschaften dar. Daher besteht ein großer Bedarf an analytischen Verfahren, mit denen sich Bindungsereignisse zwischen einem Zielmolekül und einem möglichen Wirkstoff ohne den Einsatz von Markerfarbstoffen nachweisen lassen.

Mit der Ramanspektroskopie steht ein markierungsfreies Analyseverfahren zur Verfügung, mit dem Schwingungsfrequenzen von Molekülen analysiert werden können. Dabei wird mit einem Laserstrahl auf die zu untersuchende Materie eingestrahlt. Das gestreute Licht wird spektral analysiert. Dabei werden Frequenzen beobachtet, die gegen die des eingestrahelten Laserlichts spektral verschoben sind, die so genannten Ramanfrequenzen. Diese Verschiebungen in der Frequenz entsprechen den für das Material charakteristischen Anregungsenergien, typischerweise beobachtet man Schwin-



Eingang FhG-ILT

gungsanregungen. Aus dem erhaltenen Raman-Spektrum lassen sich Rückschlüsse auf die untersuchte Substanz ziehen. Eine Probenvorbereitung ist dabei nicht notwendig, die Proben können direkt in wässriger, natürlicher Umgebung vermessen werden. Durch die Anlagerung eines Bindungspartners kommt es in der Regel zu einer Änderung und Verschiebung von Schwingungsfrequenzen, so dass die Bindung im Ramanspektrum erkannt werden kann. Besonders empfindlich können solche Änderungen

im Spektrum mit dem Verfahren der so genannten Differenzspektroskopie ermittelt werden, bei der die Spektren des reinen Proteins und der reinen Liganden vom Spektrum eines Protein-Ligand-Komplexes abgezogen werden.

Der Vorteil der Ramanspektroskopie gegenüber den heute üblichen fluoreszenzbasierten Verfahren besteht in dem höheren Informationsgehalt der Ramanspektren, aus denen auch Rückschlüsse auf die Art einer vorliegenden Bindung gezogen werden können.

Im Gegensatz zu fluoreszenzbasierten Verfahren besteht die Möglichkeit, spezifische von unspezifischen Wechselwirkungen zu unterscheiden. Die Fluoreszenzsignatur eines Markerchromophors (in der Regel ein organisches Farbstoffmolekül) ändert sich durch den Bindungsvorgang nicht, da der Farbstoff an der Peripherie des Proteins angebunden ist. In Screeningverfahren, in denen Proteine an immobilisierte Fängermoleküle (z. B. auf einem Biochip) anbinden, lässt sich durch die Detektion eines Fluoreszenzsignals nicht unterscheiden, ob das Protein unspezifisch an die Oberfläche adsorbiert oder spezifisch an ein Fängermolekül gebunden vorliegt. Dadurch kann das Ergebnis falsch-positive Aussagen enthalten die durch komplementäre Untersuchungen herausgefiltert werden müssen. Die Ramansignatur dagegen enthält eine molekulare Information über die Schwingungsfrequenzen des Proteins, die sich je nach Art, Position und Stärke eines Bindungspartners individuell ändern. So wird ein Protein, dessen Bindungspartner unspezifisch an der Oberfläche adsorbiert ist, ein anderes Differenzspektrum aufweisen als ein Protein, dessen Bindungspartner eine spezifische Bindung (z. B. in einer Bindungstasche des Proteins) eingegangen ist.





Eingang RWTH-Aachen

techniken die Leistungsfähigkeit in verschiedenen Modellfällen getestet.

### Die Kooperation

Im Verbund arbeiten drei Institute und sechs Unternehmen zusammen. Die Kompetenzen der Institute liegen dabei auf den Feldern Lasertechnik (Fraunhofer Institut für Lasertechnik ILT), Proteinbiochemie (Institut für molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen) und mathematische Algorithmen zur Datenauswertung (Institut für Bildverarbeitung und angewandte Informatik, Leipzig). Die Tätigkeitsfelder der Firmen liegen in den Bereichen Mikroskopie (TILL Photonics), Ramanspektroskopie (Spectroscopy and Imaging), Laserentwicklung (Sacher Lasertechnik), Laborautomation und Fluoreszenzreader (Tecan), Analytik (Elektrochemie Halle) und Proteinkristallographie (Taorad).

In dem Projekt wird ein Demonstratorsystem aufgebaut, mit dem die Möglichkeiten der neuartigen Technik evaluiert werden können. Der Anlagenbau sowie die Verfahrensentwicklung der neuen Messtechnik werden vorrangig am Fraunhofer ILT stattfinden. Dabei werden Komponenten der Partnerunternehmen Spectroscopy and Imaging, Sacher Lasertechnik und TILL Photonics eingesetzt. Durch die drei kleinen und mittelständischen Unternehmen sind alle notwendigen Technologiefelder abgedeckt, die zum Aufbau des Demonstrators benötigt werden. Aufbauend auf einer innovativen Mikroskop-Plattform von TILL Photonics werden ein High Power Diodenlaser der Firma Sacher Lasertechnik und ein hochempfindliches Ramanspektrometer der Firma Spectroscopy and Imaging vom Fraunhofer ILT zu einem Gesamtsystem integriert. Die enge Anbindung an einen Pipettierroboter der Firma Tecan ermöglicht einen automatisierten Ablauf aus Probenpräparation und Vermessung der unterschiedlichen Bindungsassays. Die Probenvorbereitung und Handhabung sowie die Entwicklung eines Referenz-Screens wird vom Institut für molekulare Biotechnologie zusammen mit den Firmen Tecan und Taorad durchgeführt. Ein neuartiger Probenträger, in dem auch sehr kleine Volumina (typischerweise 100 Nanoliter) untersucht werden können, wird im Projekt entwickelt.

Ramanspektren von Proteinen und großen Biomolekülen setzen sich aus einer Überlagerung einer Vielzahl von Einzelschwingungen zusammen. Die Interpretation im Sinne ei-

ner Zuordnung von einzelnen Normalschwingungen zu im Spektrum sichtbaren Banden ist in der Regel nicht möglich. Für ein automatisiertes Screeningverfahren mit einem hohen Durchsatz an Proben ist eine automatisierte Auswertung der Spektren unbedingt erforderlich. Hier setzt die Arbeit des Instituts für Bildverarbeitung und angewandte Informatik aus Leipzig (IBAI) sowie der Firma Elektrochemie Halle ein. Die Ramanspektren werden als rein mathematische Gebilde betrachtet und durch charakteristische Merkmale beschrieben. Dies können z. B. Schwingungsbanden, Konturen von Banden oder auch ganze Subspektren als Teil des Gesamtspektrums sein. Mit statistischen Verfahren (so genanntes Data Mining) können diese Merkmale aus den Spektren extrahiert werden. Auf der Basis mathematischer Algorithmen erfolgt dann eine Zuordnung eines Spektrums zu einer von mehreren vordefinierten Zielklassen. Dieser Vorgang wird Klassifikation genannt, der Zuordnungsalgorithmus ist entsprechend der Klassifikator. Bei den Zielklassen handelt es sich im Fall dieses Projektes um die zu unterscheidenden Bindungstypen (keine Bindung, unspezifische Bindung, spezifische Bindung etc). Der Nutzer des Systems muss sich daher nicht mit einer komplexen Interpretation eines Ramanspektrums befassen sondern erhält direkt die erwünschte biochemische Bindungsinformation.

### Die Perspektiven

Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines Demonstrators, mit dem ein neuartiges Screeningverfahren auf der Basis der Ramanspektroskopie entwickelt und evaluiert werden kann. Bei erfolgreichem Projektverlauf bietet das Ramanscreeningssystem eine Reihe von Vorteilen gegenüber herkömmlichen, fluoreszenzbasierten Screeningssystemen:

- Die Untersuchung von Proteinen erfolgt mit einem markerfreien Verfahren, native Proteine werden ohne Veränderung der Struktur (z. B. Anbindung eines Farbstoffes) analysiert.
- Die Analyse findet in wässriger Lösung im natürlichen Umfeld zellulärer Proteine statt (physiologischer Puffer), es muss keine Oberflächenanbindung erfolgen.
- Das Verfahren kommt mit geringsten Probenmengen (Proteinverbrauch im Nanogramm-Bereich) aus. Im Vergleich zu küvettenbasierten Ramanspektrometern kann eine Reduktion des Probenverbrauchs um 2 bis 3 Größenordnungen erreicht werden.
- Der MARAS-Demonstrator bietet – anders als die für Screeninganwendungen heute üblichen fluoreszenzbasierten Detektionssysteme – die Möglichkeit, spezifische von unspezifischen Bindungen zu unterscheiden.

Der Demonstrator stellt gleichzeitig auch den Ausgangspunkt der Verwertungsstrategie dar. Im Anschluss an das Projekt erfolgt eine Weiterentwicklung des Demonstratorsystems zu einem Serienprodukt, das unter der Führung der Firma Tecan weltweit vermarktet werden soll. Die kleinen und mittelständischen Unternehmen stellen dabei die wesentlichen Komponenten des Systems (Laser, Spektrometer,

Mikroskop, Software), die Integration und Vermarktung erfolgt über die Firma Tecan.

Durch die Entwicklung einer neuen Technologie haben die beteiligten Firmen die Chance, in einem schnell wachsenden Markt ein innovatives Produkt anbieten zu können. Die kleinen und mittelständischen Unternehmen profitieren dabei von dem guten Marktzugang, den Tecan im Bereich Laborautomation und Screeninganwendungen weltweit besitzt.

In Zukunft werden mit der Ramantechnologie nicht nur molekulare sondern auch zelluläre Screeningapplikationen durchgeführt werden. Dies stellt ein weiteres Anwendungsfeld für den im Projekt entwickelten Demonstrator dar.



### Das Projekt im Überblick

Markerfreies Raman Screening zur molekularen Untersuchung biologischer Wechselwirkungen (MARAS)

#### Technologiefeld / Branche:

Optik, Lasertechnik, Spektroskopie, Data Mining, Pharmazie, Life Sciences

#### Laufzeit:

01.01.2007 bis 31.12.2009

#### Projektkosten:

1.254.500 Euro

#### Förderungssumme:

967.828 Euro

### Projektpartner Forschung

#### Fraunhofer-Institut für Lasertechnik ILT

(Koordinator)

Dr. Christoph Janzen

Steinbachstr. 15

52074 Aachen

Tel.: 0241 8906-124

Fax: 030 8906-121

E-Mail: christoph.janzen@ilt.fraunhofer.de

www.ilt.fraunhofer.de

#### Fachgebiete:

Demonstratoraufbau, Lasermessverfahren

#### Projektschwerpunkte:

Projektkoordination, Anlagenbau und Verfahrensentwicklung

### Institut für molekulare Biotechnologie der RWTH-Aachen

Dr. Heinrich Delbrück

Forckenbeckstr. 6

52074 Aachen

Tel.: 0241 6085-10441

Fax: 0241 871062

E-Mail: delbrueck@molbiotech.rwth-aachen.de

www.molbiotech.rwth-aachen.de

#### Fachgebiete:

Proteinbiochemie, Probenträger

#### Projektschwerpunkte:

Probenpräparation, Probenträger, Verfahrensentwicklung, Referenz-Screen

### IBAI Institut für Bildbearbeitung und angewandte Informatik e.V.

Dr. Petra Perner

Körnerstr. 10

04107 Leipzig

Tel.: 0341 8612273

Fax: 0341 8612275

E-Mail: pperner@ibai-institut.de

www.ibai-research.de

#### Fachgebiete:

Statistische Datenauswertung, Data Mining

#### Projektschwerpunkte:

Automatisierte Auswerteverfahren

### Projektpartner Industrie

#### S & I Spectroscopy & Imaging GmbH (KMU)

Reinhold Schäfer

Poststr. 3

59609 Anröchte

Tel.: 02947 975090

Fax: 02947 975095

E-Mail: info@s-and-i.de

www.s-and-i.de

#### Branche:

Ramanspektroskopie

#### Projektschwerpunkte:

Aufbau und Anpassung eines hochempfindlichen Raman-Spektrometers

#### Sacher Lasertechnik GmbH (KMU)

Dr. Sandra Stry

Hannah Arendt Str. 3-7

35037 Marburg

Tel.: 06421 305-305

Fax: 06421 305-299

E-Mail: sandra.stry@sacher-laser.com

www.sacher-laser.de

#### Branche:

Lasertechnik

#### Projektschwerpunkte:

Aufbau und Anpassung eines High Power Diodenlasers