<u>Sachbericht</u> für den Zeitraum 1.1.2004-30.4.2004 und <u>Abschlußbericht</u> für das Verbundprojekt " Advanced Nanotiter Technology (ANT) im Förderprogramm „Mikrosystemtechnik 1994-1999“

Förderkennzeichen: 16SV1257
Zeitraum: 1.11.2000 - 30.4.2004
Koordinator: Laser-Laboratorium Göttingen (LLG)
Projektteilnehmer: EVOTEC OAI AG, Dr. Karsten Gall und Dr. Stefan Jäger, 22525 Hamburg, Schnackenburgallee 114. Tel: 040 56081 262, Fax: 040 56081 222.
Unterauftragnehmer: MPI für Biophysikalische Chemie Göttingen, Dr. Petra Schwille, 37077 Göttingen, Am Faßberg 11. Derzeitige Adresse: Prof. Dr. Petra Schwille Biophysics/BioTec TU Dresden c/o Max-Planck-Institute for Molecular Cell Biology and Genetics Pfotenhauerstr. 108 D-01307 Dresden Tel: +49 351 210 1444 Fax:+49 351 210 1409 Email: pschwil@gwdg.de, Secretary Claudia Lorenz: *Tel. +49 351 210 1402.*

Projektleiter: Dr. Stefan Jäger

I. Ausgangslage: Zielsetzung des geförderten Projektes und Stand der Technik

Die Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen erfordert eine erhebliche Beschleunigung des aktuellen Screening-Prozesses, wobei auch wirtschaftliche Aspekte (z. B. Kosten für anfallende Reagenzien) eine Rolle spielen. Dies kann grundsätzlich auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, die alle Ziele dieses Projektes waren:

1) Beschleunigung der existierenden Verfahren durch Entwicklung neuer, schnellerer Detektionstechniken. -> siehe Kreuzkorrelation in Zellen.
2) Optimierung bestehender Markierungsverfahren und Strategien zur Umgehung von Markierungsverfahren. -> siehe Klonieren von GFP (Green Fluorescent Protein) an relevante Proteine.
3) Entwicklung von neuen, robusten Ausleseparametern zur Evaluierung der Ergebnisse, ausgehend von den Detektionstechniken. -> siehe Amplitude der Kreuzkorrelation, Zweiphotonen-Koinzidenzanalyse.
4) Reduzierung der eingesetzten Mengen. -> siehe Screening Volumen (bis runter zu 1 µL für Zellen).

5) Beschleunigung des gesamten Screening-Prozesses durch den verstärkten Einsatz von lebenden Zellen in der Stufe des Ultra-Hochdurchsatz-Screenings. Die Qualität der gewonnenen Daten erhöht sich aufgrund eines hohen Informationsgehaltes und führt zu Einsparungen in der Anzahl der benötigten unterschiedlichen Screens für eine Substanzbank (Screening library). -> siehe Dispensiergerät für lebende Zellen und Kultivierungs-System für das reproduzierte Heranwachsen von Zellen im Screening Betrieb.

Schon in einem frühen Stadium der Wirkstoffsuche müssen pharmakodynamisch sowie möglichst auch pharmakokinetisch relevante Daten zu den in großer Menge anfallenden Substanzen (Screening library) gewonnen werden, um nach mehreren Kriterien erfolgversprechende Substanzen zu identifizieren und problematische Substanzen auszuschließen. Viele biologische Effekte lassen sich zwar in löslichen Assays, also in der Untersuchung von isolierten Molekülen, nachstellen. Allerdings sind die molekularen Zusammenhänge eines pharmakodynamischen Effektes für ein Wirkstoffgebiet oftmals noch nicht oder zumindest nicht vollständig erforscht, so dass es nicht möglich ist, die biologische Situation „im Reagenzglas“ nachzustellen und in einen Screening-Assay umzusetzen. Assays an Zellen und Zellverbänden aus *in-vitro* Zellkulturen bieten die Möglichkeit, solche Notwendigkeiten zu adressieren. Die Pharmakodynamik von Substanzen kann so an einer lebenden Einheit, die alle hierfür notwendigen Signalstoffe und Stoffwechselvorgänge beinhaltet, ermittelt werden. Zudem können an Zellen mehrere Informationen gleichzeitig gewonnen werden (z. B. Untersuchung der erwünschten und einer toxischen Wirkung). Zellen aus Zellkulturen sind grundsätzlich einsetzbar für Ultra-Hochdurchsatz-Screening Verfahren, da sie in den kleinen Volumina (Mikro- bis Nanoliter-Bereich) in für eine Statistik ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden können und auch ausreichend robust sind, um reproduzierbare Screening-Anordnungen zu erlauben. In gewissem Umfang können sogar Daten zur Pharmakokinetik gewonnen werden, z. B. Transportstudien für die intestinale Absorption oder den Wirkstoffmetabolismus.

Die Beschleunigung der existierenden Screening-Verfahren sowie der umfangreiche Einsatz von Zellkulturen im Ultra-Hochdurchsatz-Screening ist nur durch neue technologische Lösungen möglich, wie sie in diesem Projekt mit „Advanced Nanotiter Technology“ umschrieben sind. Sie umfassen neue Liquid-Handling Techniken (Evotec) und neue Detektionsverfahren (MPI Göttingen). Die Liquid-Handling Techniken umfassen Systeme zur Handhabung von Proben (lösliche biologische Substanzen und Bestandteile von Zellen) im 1 µl-Bereich (Gesamtvolumen) sowie Systeme zur Verteilung, Kultivierung und Bereit-

stellung von Zellen für Ultra-Hochdurchsatz-Screening Assays. Bei den Zellen kann es sich um suspendierte Zellen handeln oder auch um Zellen, die für ihre Physiologie und für die zu untersuchende Größe adhärent sein müssen, d. h. sich auf dem Probenträger anhaften, ausbreiten und gegebenenfalls noch differenzieren. Die Detektionsverfahren müssen diesen unterschiedlichen Gegebenheiten Rechnung tragen. Insbesondere die Messung von Effekten an lebenden Zellen erfordert den Einsatz von komplexen Detektionsstrategien wie z. B. den Einsatz von Scanning-Verfahren und Mehrphotonenanregung zur Unterdrückung des zellulären Hintergrundes bei Fluoreszenzmessungen.

Im Rahmen dieses Verbundprojektes hat EVOTEC die Erprobung und Modifikation verschiedener Liquid-Handling Alternativen übernommen (Zellverteilungsgerät und Kultivierungs-System).

Stand der Technik vor dem Start des Projektes

Die Handhabung von löslichen Substanzen in wässrigen Puffern für den Bereich der Assayvolumina von ≥ 1 µl ist bei EVOTEC etabliert. Hierfür werden Dispenser und Pipetten eingesetzt, die mit der Piezo-Technik und mit einer Genauigkeit von 3% und Tröpfchengrößen von 300 pl arbeiten. Für das geplante Zielvolumen von 100 nl müssen die bestehenden Systeme angepasst und hinsichtlich ihrer Präzision überprüft werden. Die Anpassung des Liquid-Handling für die Verteilung von Zellen bedarf einer längeren Entwicklungsphase. Keiner der bisher kommerziell erhältlichen Liquid-Handling Systeme für den Nanoliter-Bereich wurde bisher erfolgreich für Zellsuspensionen eingesetzt.
Als Probenträger stehen bisher Nanotiterplatten mit 1536 Wells (4 µl Assayvolumen) und 2080 Wells (1 µl Assayvolumen) zur Verfügung. Diese bestehen aus Silizium/Glas Verbünden oder aus Kunststoff mit Glasboden oder Böden aus Kunststoff-Folien. Nanotiterplatten und Mikroarrays mit kleineren Well-Inhalten sind zu entwickeln. Diese Entwicklung bedarf vor allem intensiver Materialforschung für die Kompatibilität mit Zellen, Biomaterialien und chemischen Substanzen sowie für die Ankopplung an die Detektionsverfahren. Weiterhin sind innovative Schritte zur Lösung des Problems der Verdunstung notwendig, welches mit kleiner werdenden Probenvolumina immer größere Bedeutung gewinnt. Ein einfacher Verdunstungsschutz, wie er in der bestehenden EVOscreen-Anlage zu Einsatz kommt, wird nicht mehr ausreichen.
Einer umfangreichen Entwicklungsleistung im Bereich der Probenträger bedarf es für die Anpassung an Zellkultursysteme. Im kommerziellen Bereich existieren als zelltaugliche

Probenträger lediglich 24 bis 96-Well Platten, mit und ohne Siebeinsätzen für die Zellbereitstellung mit Probenvolumina von 100 – 200 µl. Sollen die Zellen in kleineren Volumina kultiviert werden, können Probleme bei der Versorgung mit wichtigen Gasen und Nährstoffen auftreten. Auch die Differenzierung von Zellen in sehr kleinen Welldimensionen muss überprüft werden, da sich ein Verbund aus sehr wenigen Zellen (100 – 1000) anders verhalten kann, als ein Verbund aus sehr vielen Zellen. Zellen sezernieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die das Verhalten der benachbarten Zellen beeinflussen. Auch das veränderte Volumen / Oberflächen Verhältnis kann die Zellversorgung und Zellverteilung erheblich beeinträchtigen.

II. Abschlussbericht - Wissenschaftlich-technischen Ergebnissen (Evotec OAI)

AP 1. Proben Handling

Beim automatisierten Handling von Zellen muss gewährleistet sein, dass die Zellen keinen Schaden nehmen. Um dies zu testen, konnte ein kommerziell erhältlicher Assay von Molecular Probes an die speziellen Erfordernisse der konfokalen Fluoreszensspektroskopie angepasst werden. Hiermit kann sowohl die Überlebensrate von Suspensionszellen nach Pipettier- bzw. Dispensierschritten, als aber auch der Einfluss cytotoxischer Wirkstoffe zuverlässig quantifiziert werden (Viability Test). Mit diesem Test konnte nun der Erfolg der nachfolgenden Arbeitspakete gut verfolgt werden.

AP 1.1. Evaluierung der „100.000 Proben Frage“

Damit Zellen und Beads genauso schnell dispensiert werden können, wie es schon bei den löslichen Assays (> 100.000 Proben pro 24 Stunden) der Fall ist, musste die elektromechanische Technologie durch eine rein mechanischen Methode ersetzt werden. Hierbei konnte auf eine kommerzielle Lösung der Firma Cartesian (SynQuad) zurückgegriffen werden, die an die Erfordernisse der bestehenden EVOscreen Anlage angepasst wurde. Ebenso konnte der Fluoreszenz Reader soweit optimiert werden, dass auch im Zusammenspiel sämtlicher Einzelkomponenten, inklusive Datenverarbeitung, ein Durchsatz von mehr als 100.000 Proben pro 24 Stunden unter Beibehaltung einer hohen Datenqualität erreicht werden konnte (Tab. 1, grau unterlegte Werte).

Channels	Binning	Exposure time / ms	Time per well / ms	Wells per day	Data amount per well / kB	Data amount per Day / GB
2	1	1000	1945	43144	5120	211
2	1	50	995	82082	5120	401
2	2	300	799	100797	1280	123
2	4	300	688	115847	320	35
1	4	50	396	190622	160	29

Tabelle 1: Probendurchsatz bei verschiedenen Readerkonfigurationen.

AP 1.2. Entwicklung eines HTS tauglichen Zellverteilungsmoduls

Mit Hilfe des Viability Tests konnte gezeigt werden, dass das von Evotec modifizierte Verteilungsmodul SynQuad der Firma Cartesian die hohen zellulären Anforderungen bzgl. Homogenität der Verteilung, Biokompatibilität und Ausfallsicherheit erfüllt (Abb. 1). Bei der

Modifikation des Verteilungsmoduls musste das Reservoir derart für die Verwendung von Zellen angepasst werden, dass es erlaubt, Zellen über eine gewisse, zur Verteilung benötigte Zeit, homogen in Suspension und am Leben zu erhalten. Zu erwartende Probleme wie Adhäsion der Zellen an den Oberflächen der Reservoirkomponenten galt es ebenso zu berücksichtigen, wie die Wahrung einer notwendigen Sterilität. Dies wurde durch eine rotierende Schüttelvorrichtung für das Zellreservoir erreicht.

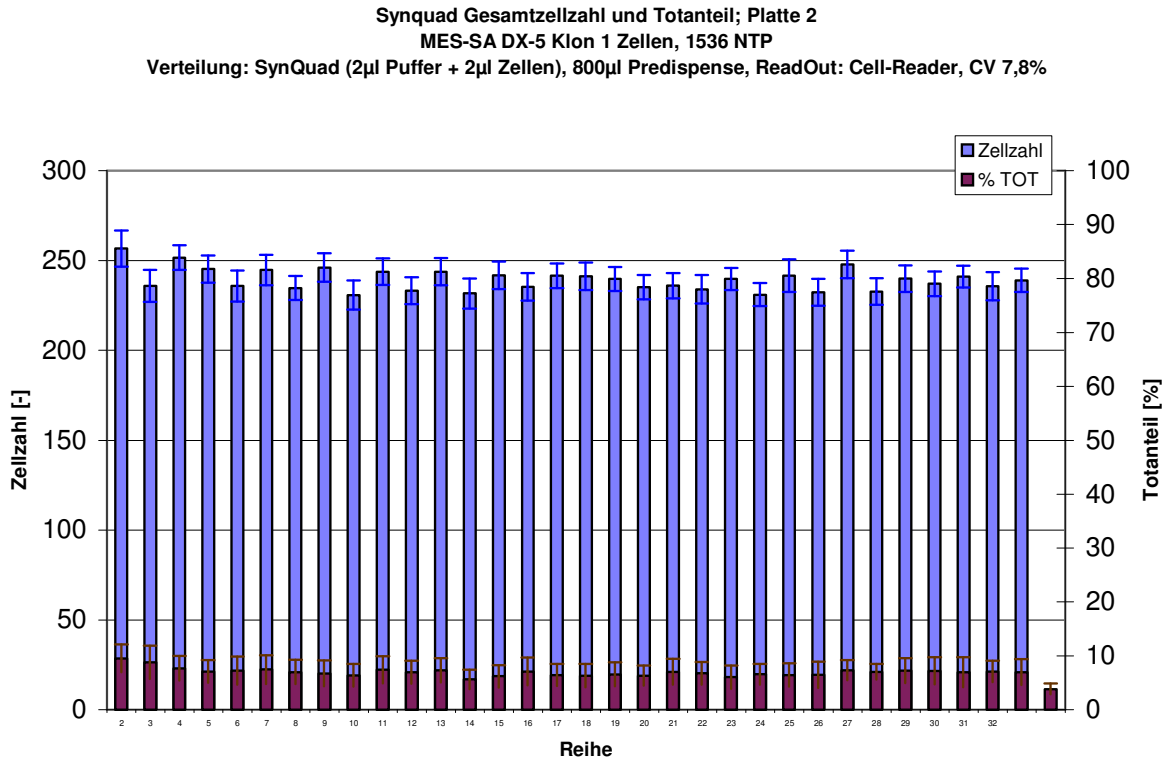

Abb. 1: SynQuad, Homogenitäts- und Viability Test.

AP 1.3. Evaluierung verschiedener Probenträger

Um zelluläre Assays im Hochdurchsatz screenen zu können, müssen die verwendeten Probenträger gewisse Kriterien erfüllen. 1. Das Material der Probenträger muss für die Zellen verträglich sein. 2. Die Probenträger müssen auch für adhärente Zellen tauglich sein, nicht nur für Zellen in Suspension. Zu 1: Es wurde festgestellt, dass die für biochemische (d.h. nicht zelluläre) Assays verwendeten Nanotiterplatten auch ein Screening von

lebenden Suspensionzellen erlauben. Eine spezielle Vorbehandlung der Platten ist sogar für manche Zelllinien nicht erforderlich. Um sicher zu gehen, kann z.B. mit Poly-L-Lysin gecoated werden. Zu 2: Hier galt es Bedingungen zu erarbeiten, die für die Langzeitkultivierung von adhärenten Zellen (bis zu 3 Tage) optimal sind, als aber auch eine homogene Ausbreitung der Zellen gewährleistet ist. Darüber hinaus musste sichergestellt werden, dass während der Kultivierung keine nennenswerte Verdunstung einsetzt, die zum austrocknen einzelner Wells führen könnte. Evaporationsstudien haben gezeigt, dass gerade in den Randbereichen der Nanotiterplatten eine erhöhte Verdunstung auftritt (Abb. 2). Um solche Effekte zu verhindern, muss man a) die Nanotiterplatten verdeckeln und b) die Randbereiche anstatt mit Zellen mit einer Pufferlösung als Verdunstungsschutz befüllen. Dies hat zu der Entwicklung eines geschlossenen Kultivierungssystems (Abb. 3) geführt, indem die Zellen steril und stetig mit Nährmedien versorgt werden können. Darüber hinaus können Waschschritte jederzeit und ohne die Sterilität zu verletzen bequem durchgeführt werden und das Austrocknen der Randwells wird ebenfalls vermieden.
Nanotiterplatten mit Volumina < 1µL (z.B. 100 nL) für Zell- als aber auch biochemische Assays wurden von unseren Kunden nicht favorisiert und deswegen nicht weiter verfolgt.

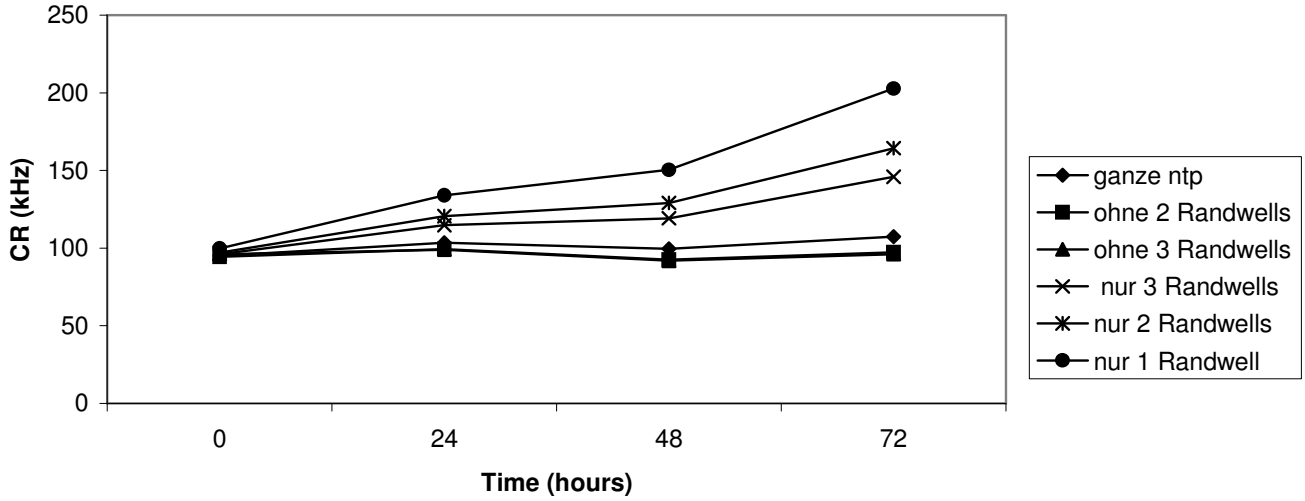

Abb. 2: Verdunstung in 1536 NTP mit Zelldeckel

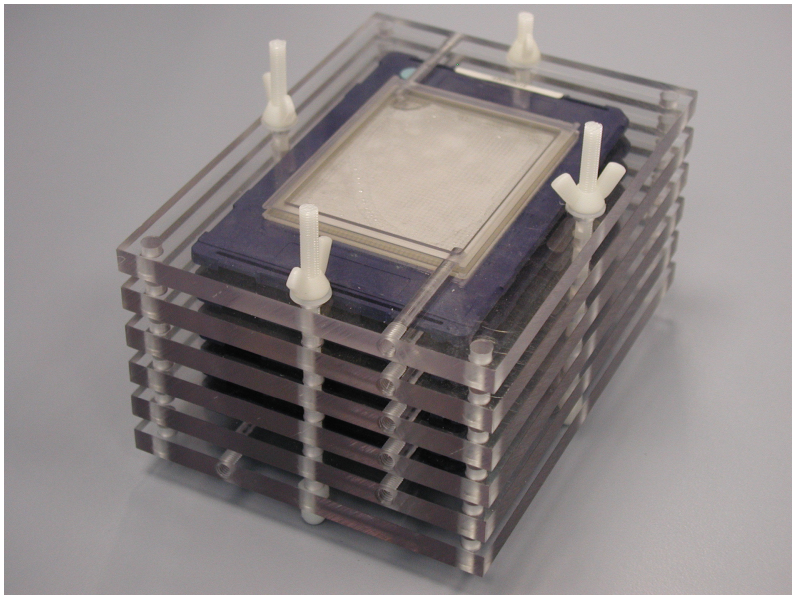

Abb. 3: Zellkultivierungssystem zur Vorbereitung von adhärenten Zellen für das Screening.

AP 2. Assay Entwicklung

AP 2.2. Modellassays

Um die Funktionalität der in den Arbeitspaketen 1.2 und 1.3 entwickelten Zellverteilungs- und Kultivierungsmodule umfassender zu evaluieren, müssen biologische Testsysteme, sog. Modellassays, entwickelt werden. Der oben genannte Viability Test alleine genügt nicht, da dieser nur eine Zelle bzw. Zelllinie auf eine bestimmte Zellantwort hin prüft. Ins Besondere muss wegen des grundsätzlich anderen Konzepts für die Zellanzucht und –Verteilung zwischen adhärenten und Suspensionszellen unterschieden werden. Während Suspensionszellen vornehmlich über das in AP 1.2 beschriebene Zellverteilungsmodul dem Screeningprozess zugeführt werden, geschieht dies bei adhärenten Zellen über das in AP 1.3 beschriebene geschlossene Kultivierungssystem. Entsprechend wurden zwei verschiedene Modellassays entwickelt:

Suspensionszellen

Als Modellsystem wurde hier aus dem Themenbereich „Multidrug Resistance“ (MDR) ein Assay ausgewählt, in dem die P-Glycoprotein Pumpe (PGP) als transmembranes Transporterprotein eine wesentliche Rolle spielt. PGP wirkt dem diffusionsgetriebenen Einstrom von (unerwünschten) Wirkstoffen in die Zelle dadurch entgegen, dass es diese aktiv wieder aus der Zelle pumpt. Um die Dosierung eines Medikaments zu testen, können die zu entwickelnden Wirkstoffe an diesem zellulären Assay-System ausprobiert werden.

Das Funktionsprinzip des entwickelten Assays ist in Abb. 4 dargestellt. Es wird der nicht-fluorogenen Farbstoff Acetoxymethyl Ester (Calcein AM) benutzt, der ungehindert die Plasmamembran normaler Zellen, hier MES-SA, passieren kann. Im Zellinneren wird der nicht-fluoreszierende Farbstoff (Calcein AM) von Esterasen in die stark fluoreszierende Form (Calcein) gespalten, die sich im Cytoplasma akkumuliert. In PGP überexprimierenden Zellen, wie z.B. MES-SA/Dx5, wird Calcein AM jedoch bevor es von den Esterasen gespalten werden kann, wieder aus der Zelle ausgeschleust, so dass eine erhöhte Fluoreszenz nicht mehr nachzuweisen ist. Hat man nun einen effektiven Inhibitor für das PGP gefunden, so wird sich dies, in einer erhöhten Fluoreszenz niederschlagen.

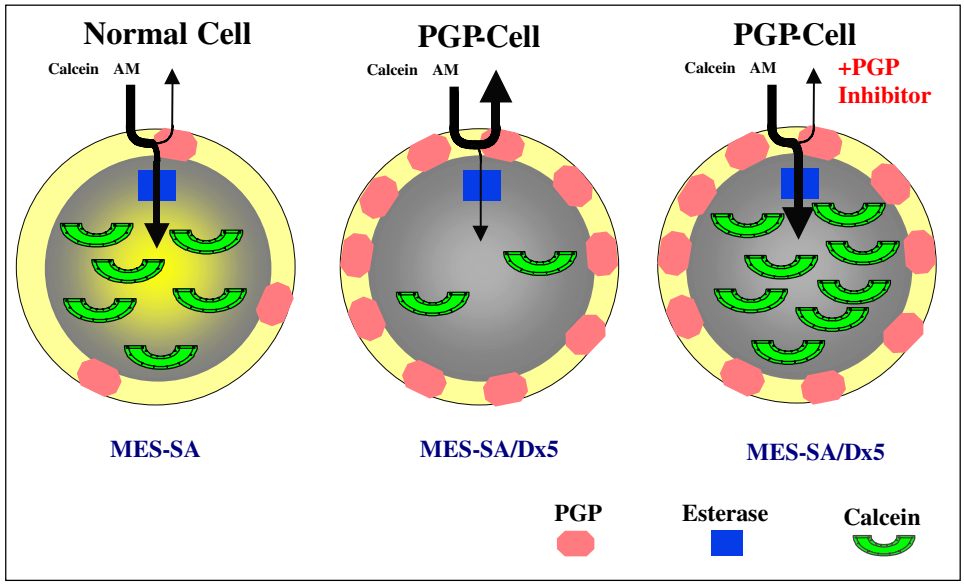

Abb. 4: Assayprinzip des PGP Assays

Adhärente Zellen

Ein entscheidender Vorteil bei der Wirkstoffsuche ist es, ob man toxisch wirkende Substanzen frühzeitig erkennt und somit aus dem sehr aufwendigen Discoveryprozess ausschließen kann. Aus diesem Grund wurde ein Test entwickelt (Cytotoxizitätsassay), der einen entscheidenden Beitrag zu dem allgemein sehr wichtigen Themengebiet des early „ADME/TOX“ (**A**bsorption, **D**istribution, **M**etabolism, and **E**xcretion/**Tox**icity) leisten kann. Den metabolischen Zustand einer Zelle misst man hierbei über die Reduktion des nicht fluoreszierenden Resazurin zu dem stark fluoreszierendem Resorufin. Resazurin (E_0 = +380 mV @ pH 7.0; 25°C) kann von allen Komponenten der mitochondrialen Elektronen Transportkette einschließlich der Cytochrome reduziert werden (Abb. 5). Speziell diese Reduktion nutzt man unter Verwendung der humanen Leberkarzinomzelllinie

Hep G2 aus, denn sollte die zu untersuchende Substanz eine toxische Wirkung auf die Zelle ausüben, so schlägt sich das darin nieder, dass die Elektronentransportkette unterbrochen ist und die Reduktion nicht mehr stattfinden kann.
Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, bei der das oben beschriebene Zellkultivierungssystem zur Anwendung kam. Nachdem die Zellen über 24 Stunden in dem System angewachsen waren, wurden die zu testenden Substanzen zugeführt und nach 48 Stunden Inkubation und anschließender Zugabe von Resazurin vermessen.

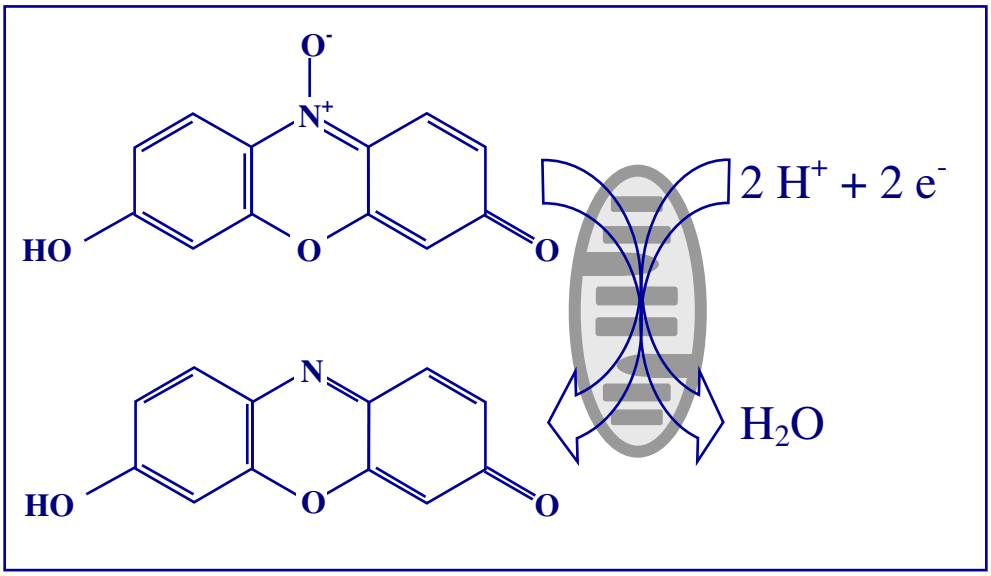

Abb. 5: Cytotoxizitätsassay : Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch die mitochondriale Elektronen Transportkette führt zu einem fluoreszierenden Produkt, das bei $\lambda = 530 – 560$ nm angeregt und bei Wellenlängen $\lambda \geq 590$ detektiert werden kann.

AP 3. Systemintegration

AP 3.1. Lab-Automation

Nach erfolgreicher Weiterentwicklung des Zellverteilungsmoduls SynQuad der Firma Cartesian mit einem zuverlässig arbeitenden Schüttelreservoir, konnten beide Teilsysteme zu einem robust arbeitenden vollautomatischen Gesamtsystem zusammengeführt und in die EVOscreen Anlage integriert werden. Hierzu musste eine Steuereinheit für das Zellverteilungsmodul programmiert werden, das sich in den globalen Scheduling-Prozess der EVOscreen Anlage integrieren ließ.

AP 3.1.1 Integration des Zellverteilungsmoduls in die EVOscreen-Anlage

Es konnte durch ausgiebige Prozessoptimierung gezeigt werden, dass das Zellkultivierungssystem zur Einsaat von adhärenten Zellen auf Evotec Nanocarriern™1536 eingesetzt werden kann. Im Gegensatz zu Dispensiertechnologien konnten mit Hilfe des Zellkultivierungssystems notwendige Waschschritte und Medienwechsel durchgeführt werden. Das gesamte System wurde im Rahmen eines umfassenden Screens an einer größeren Substanzbibliothek (4.144 Compounds) getestet.

Als biologisches Testsystem wurde der Cytotoxizitätsassay (Abb. 5) ausgewählt, der bereits im Hause im 384-Well-Maßstab gescreent und im Rahmen dieses Projektes auf das 1536iger Format adaptiert worden ist. Das Reaktionsvolumen wurde dabei von 50µl (384 Well) auf 3,3µl (1536 Well) verringert. Das entspricht einer Reduktion um mehr als 93%.

Das Plattenlayout der Nanocarrier™ 1536 sah vor, dass maximal 2 x 384 Compounds pro Nanocarrier gescreent werden (Abb. 6, grau dargestellt). Die Kontrollzeilen (R10, 23) enthalten positive und negative Kontrollwells, die als Referenz für die Datenauswertung benötigt werden (blau/rot dargestellt). Die restlichen Wells dienen als Wasserrand, um die Compound-wells vor Verdunstung zu schützen.

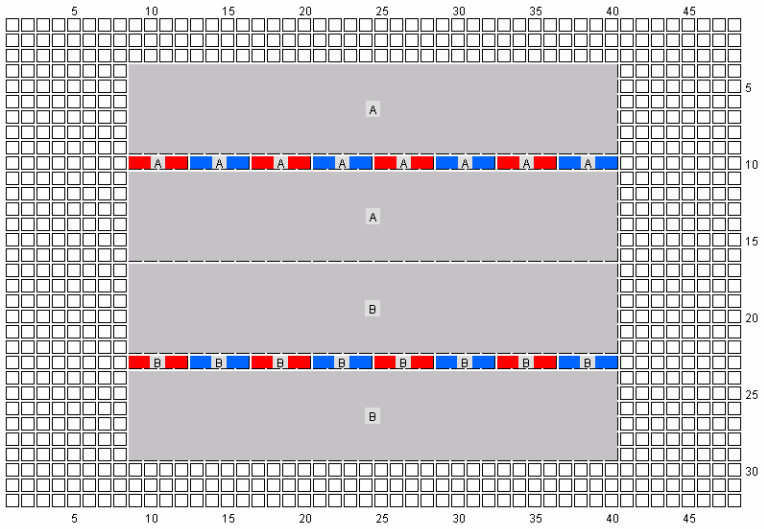

Abb. 6: Plattenlayout

Auswahl der Compounds

Im Rahmen der durchgeführten HTS-Kampagne wurden insgesamt 4.144 Compounds getestet und ca. 30.000 Datenpunkte generiert. Für 2.177 Compounds lagen valide Daten aus einem vergleichbaren Screen in einem 384-Well-Format vor. Zusätzlich wurden 1.967 Compounds ausgesucht, die in einem anderen zellbasierten Screen pharmakologisch

aufgefallen waren und nun mit Hilfe des Cytotoxizitätsassays näher charakterisiert werden sollten. Die Funktionalität des Zellkultivierungssystems sollte mit diesen bereits klassifizierten Compounds geprüft werden. Alle Compounds wurden dreifach bei zwei verschiedenen Konzentrationen getestet: 5,7µM und 40µM (Endkonzentration im Well). Um schwach- und hochpotente Hits gleichermaßen zu klassifizieren, wurde die für zelluläre Assays allgemein übliche Screeningkonzentration von 10µM ausdrücklich anders gewählt.

Ergebnis und Interpretation der Daten

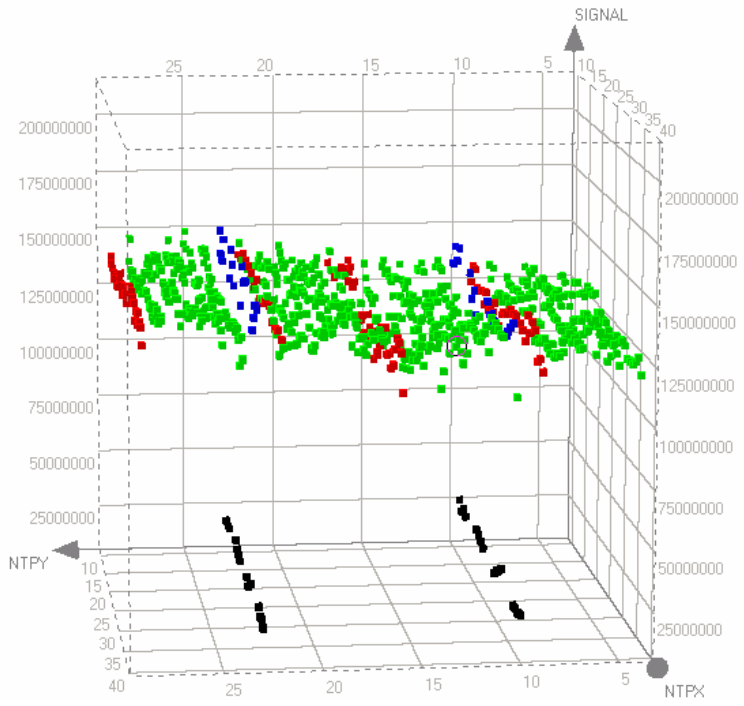

Abb. 7

Schwarz:
positive Kontrolle (toxische Substanz)

Blau:
negative Kontrolle
(normale Zellaktivität:
Umsetzung des Substrates ist erfolgt und in Form von Fluoreszenz messbar)

Rot:
DMSO-Wells (Kontrolle des compound-Lösungsmittels)

Grün:
Compound-Wells

Abb. 7 zeigt die Auswertung eines typischen Screening Nanocarriers. Aus der Abbildung ist direkt ersichtlich, dass die Streuung der Daten sehr gering ist. Der mittlere Z'-Faktor

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma(pos.Kontr.) + 3\sigma(sneg.Kontr.)}{|S(pos.Kontr.) - S(neg.Kontr.)|}$$

(mit: σ= Standardabweichung und S= Signal; Z' ist somit ein statistisches Maß für die Qualität der Daten; er sollte > 0,5 sein)

liegt bei 0,74. Platten deren Z'< 0,5 beträgt, wurden wiederholt, wobei die Wiederholungsrate bei 10% lag. Alle Substanzen, deren Inhibitionswert mehr als 50% beträgt, wurden per Definition als cytotoxisch klassifiziert.

A B

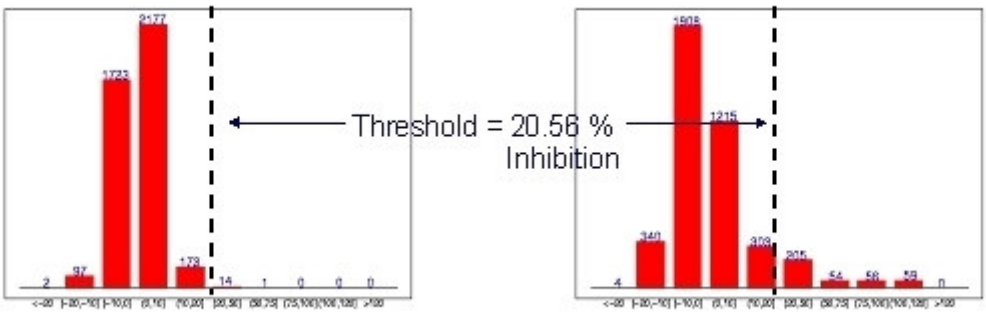

Abb. 8: Verteilung der Inhibitionswerte bei verschiedenen Compound Konzentrationen
A: Compound Konz. 5,7 µM resultierte in 0,1% der Compounds mit Inhibition > 50%
B: Compound Konz. 40 µM resultierte in 4% der Compounds mit Inhibition > 50%

Abb. 8 zeigt die Klassifizierung der als cytotoxisch aufgefallenen Compounds als Histogramm (8A: verwendete Compound Konzentration war 5,7 µM, 8B = 40 µM). Die Compounds mit mehr als 20.56% Inhibition liegen rechts von der gestrichelten Linie. Bei einer Screeningkonzentration von 5,7µM fielen nur 0,1% aller getesteten Substanzen als cytotoxisch auf. In diesem für HTS-Kampagnen üblichen Konzentrationsbereich enthielt die verwendete Substanzbibliothek somit eine geringe Anzahl cytotoxischer Substanzen. Bei einer deutlich erhöhten Konzentration von 40µM wurden dagegen signifikant höhere cytotoxische Effekte sichtbar.
Die Datenqualität der Zellkultivierungssystem-Versuchsreihe entsprach der des 384-Well-Format-Screens. Die hohe Datenqualität belegt, dass damit eine Zellaussaat mit Hilfe des Zellkultivierungssystems zu keinerlei Performanceverlusten führt. 11 der 16 (69%) im 384-Well-Screen gefunden cytotoxischen Substanzen wurden ebenfalls in dem hier beschriebenen Screen identifiziert. Alle identifizierten Hits gehörten derselben Strukturklasse an.

In der verbleibenden Projektzeit (1.1.2004 – 30.4.2004) wurde das vorhandene Zellkultivierungssystem (1536 well Maßstab mit 4 µL Assayvolumen pro well) auf unseren 2080 well Standard (1 µL Assayvolumen pro well) ausgeweitet. Hierfür wurde ein Prototyp entwickelt und getestet. Es zeigte sich, dass das 2080 System in allen Belangen vergleichbar gute Ergebnisse zeigt, wie das 1536 System. Die Verdunstung von Randwells betreffend wurden sogar bessere Ergebnisse erzielt (da hier zwei anstatt ein well als Verdunstungsschutz verwendet werden konnte).

III. Abschlußbericht - Unterauftragnehmer AG „Experimentelle Biophysik“ (MPI Göttingen)

III.1. Etablierung geeigneter Messparameter

Hier sollten fluoreszenzbasierte Messparameter bestimmt werden, die mit biochemischen und molekularbiologischen HTS-Ansätzen kompatibel sind. Zur Auswahl standen insbesondere Kreuzkorrelation, Koinzidenz und FRET-Werte.

III.1.1. Fluoreszenz-Intensität

Die wichtigsten der grundsätzlich in biochemischen Assays einsetzbaren Farbstoffe wurden auf ihre

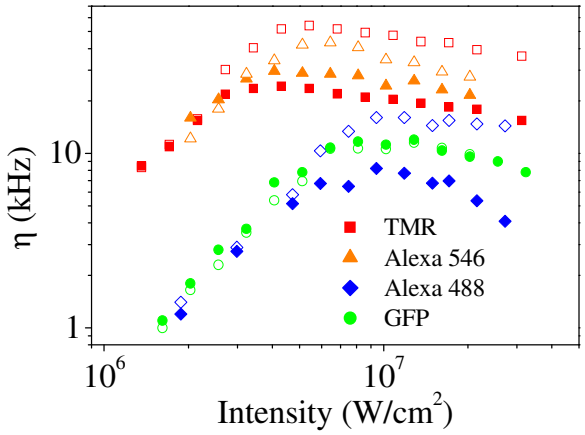

Abb. 9:

Intensitätsabhängige Photonenemissionsraten pro Molekül für verschiedene Standardfarbstoffe unter Zweiphotonenanregung am jeweiligen Absorptionsmaximum. Die geschlossenen Symbole stellen die Messung in Standard-Puffer, die offenen Symbole die Messung in 5mM Ascorbinsäurelösung dar. Die maximalen Emissionsraten sind um Faktor 2-3 erhöht. Interessanterweise ergibt sich keine Änderung für GFP.

Eignung für die Zweiphotonenanregung untersucht. Dies geschah durch Bestimmung der Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte auf Einzelmolekülebene, wie sie durch FCS möglich ist. Auf Basis der relativen Intensität konnten molekulare Mobilität, aber auch intermolekulare Dynamiken erfasst werden, sofern mit ihnen eine Änderung der Absorptionsquerschnitte oder Fluoreszenz-Quantenausbeute einhergeht. Es wurden die wichtigsten kommerziellen synthetischen Farbstoffe, aber auch klonierbare Farbstoffe (GFP und Analoga), eingehend untersucht.

In einer photophysikalischen Studie (Dittrich and Schwille, 2001) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Einphotonenexperimenten nicht die Bevölkerung der Triplettzustände für das erhöhte Photobleichen verantwortlich gemacht werden kann, da keine nennenswerten Triplettraten in den Zweiphotonen-FCS-Kurven zu erkennen sind. Auf der anderen Seite können biologisch unbedenkliche chemische Stabilisatoren wie Ascorbinsäure oder MEA bei vielen Farbstoffen eine deutliche (2-3 fache) Erhöhung der maximalen Zweiphotonen-Emissionsrate bewirken (Abb. 9).

Grund hierfür könnte sein, dass die verstärkte Ausbildung von Radikalen in der Farbstofflösung für die erhöhte Photozerstörung bei der Zweiphotonenanregung verantwortlich ist, wie in der Literatur schon mehrfach vermutet wurde. Bei sämtlichen Stabilisatoren handelt es ich auch um so genannte „Radikalfänger“. Für zukünftige Anwendungen der Zweiphotonenanregung *in vitro* ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung, da unter Zugabe harmloser Chemikalien zu den Pufferlösungen dramatische Verbesserungen des Fluoreszenzsignals erreicht werden können.

III.1.2. Mehrfarbige Korrelations-Spektroskopie

Die Korrelationsanalyse mittels FCS stellt eine der wesentlichen Methoden dar, möglichst viele molekularen Parameter gleichzeitig zu erfassen. Im Hinblick auf das angestrebte Messziel von 100.000 Proben/Tag sollte getestet werden, welche Datenaufnahmezeiten für die statistisch relevante Erfassung eines bestimmten Parameters mittels FCS-Algorithmen erforderlich sind.

Photophysikalische Arbeiten zur Zweiphotonenanregung (TPE): simultane 3-Farben-Anregung
Wir konnten zeigen (Heinze et al. 2003, 2004), dass es mittels Kreuzkorrelations- oder Koinzidenzanalyse in Kombination mit TPE prinzipiell möglich ist, die Wechselwirkungen dreikomponentiger biomolekularer Systeme auf Einzelmolekülebene zu untersuchen. Dies motiviert für die Entwicklung weitaus komplexerer biochemischer Assays für die *in vitro* und *in vivo* Analyse.
Methodische Grundidee ist die simultane monochromatische TPE dreier Farbstoffe, die sich bezüglich ihrer Emission spektral separieren lassen (Abb. 10). Das jeweils konfokal auf einen hochempfindlichen Detektor abgebildete Fluoreszenzlicht wird zur Analyse einem rechnergesteuerten multiple-tau-Korrelator oder einer entsprechenden schnellen Prozessor-Karte zugeführt. Die mathematische Vorschrift der Kreuzkorrelation oder der vereinfachte Algorithmus der Koinzidenzanalyse ermöglicht dann das Identifizieren von Zweier- und Dreierkomplexen, sowie der Einzelkomponenten.

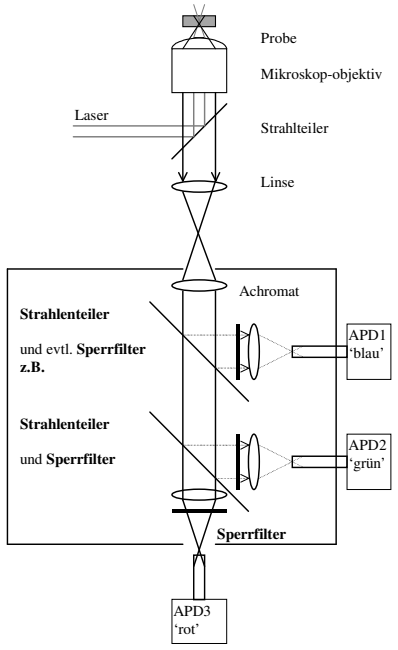

Abb. 10: Der optische Aufbau der 3-Farben Koinzidenzanalyse TPCA ist in einem inversen Mikroskop-Aufbau (Olympus IX50) realisiert. Eine einfache Laserlinie eines spektral durchstimmbaren Ti:Sa Lasers wird zur simultanen Anregung der drei beteiligten Fluorophore des Farbstoffsystems verwendet. Das Fluoreszenzlicht wird durch 2 dichroitische Spiegel spektral zerlegt und schließlich auf drei voneinander unabhängige fasergekoppelte Detektoren abgebildet. Optional können die Fasern auch in ein Spektrometer eingekoppelt werden.

Die Auswahl eines geeigneten Farbstofftripels erfordert höchste Sorgfalt: Einerseits sollte der spektrale Überlapp der Emissionscharakteristika minimal sein, andererseits müssen alle drei Farbstoffe durch eine gemeinsame IR-Laserlinie effizient anregbar sein. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass alle ebenfalls dieselbe Anregungsintensität ohne signifikantes Photobleichen tolerieren müssen. Letzteres stellt häufig ein Ausschlusskriterium für ein ansonsten geeignetes Farbstoffpaar dar, da viele für den roten Spektralbereich entwickelten Farbstoffe gewöhnlich mit erheblich geringeren Intensitäten angeregt werden als entsprechende grün oder blau emittierende. Es ist also entsprechend dem potenziellen Farbstoffpaar eine umfangreiche Optimierungsprozedur hinsichtlich Anregungswellenlänge und -intensität erforderlich. Es wurden u.a. auch verschiedene für die Standardmessungen bereits etablierte Farbstoffproben der Firma Evotec OAI auf ihre Eignung für diese Art der Anwendung getestet.

III.1.3. Apparative Neuentwicklungen: Fokus-Scanning

Bei der Mehrphotonenanregung sind neue oder modifizierte Analysesysteme erforderlich, die auf die spezifischen Anforderungen zugeschnitten sind. Beispielsweise ist bekannt, dass die Photobleaching-Raten von vielen Farbstoffen deutlich verändert sind. Um hierdurch entstehende Probleme wie z.B. Signalreduktion zu unterbinden, sollte zur Verbesserung des Signal-Hintergrunds-Verhältnisses ein „Scanning“ des Fokus durch die Probe mithilfe eines so genannten piezogesteuerten “Fokus-Scanners” erfolgen. Wie erwartet, ergab das Fokus-Scanning eine deutliche Steigerung der Signal-Hintergrundsverhältnisse und dadurch eine Reduktion der Messzeiten um den Faktor 10. Die jeweils zu wählenden Parameter in bestimmten Assaysituationen sind in (Heinze et al., 2002) ausführlich dokumentiert und dienen als Anhaltspunkt für zukünftige Messprotokolle.

III.1.4. Evaluierung von geeigneten Farbstoffsystemen für zelluläre Assays

Ziel war es, Farbstoffsysteme zu etablieren, bei deren Einsatz in funktionalen Assays keine Beeinträchtigung durch die zelluläre Umgebung gegeben ist. Hier stand insbesondere eine Testung verschiedenster Mutanten und Homologen des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) hinsichtlich Photostabilität bei der Zweiphotonenanregung und Kombinierbarkeit für mehrfarbige Messungen im Vordergrund. Aber auch die Cytotoxizität verschiedener Kandidaten musste intensiv untersucht werden, um farbstoffinduzierte Artefakte auszuschließen.

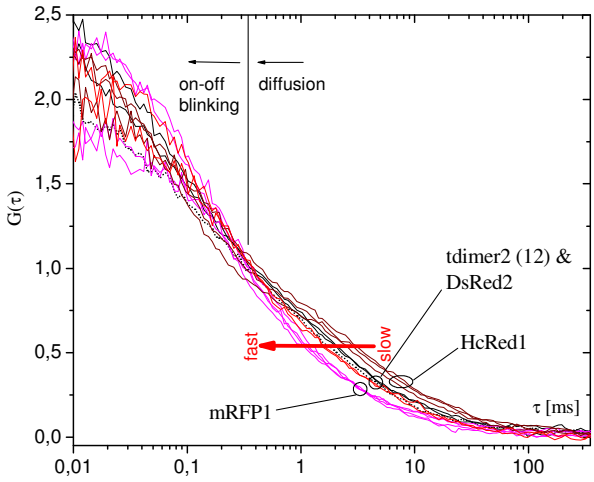

Abb. 11:
Normierte Autokorrelationskurven verschiedener rot fluoreszierender Proteine, gemessen in HEK Zellen bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten. Die Form der Autokorrelationskurven ist bestimmt durch das Diffusionsverhalten der Proteine sowie dem von der Anregungsintensität abhängigen "Blinking" der Chromophore.

Die Entwicklung einer neuen Generation rot fluoreszierender Proteine durch Campbell et al. lieferte zwei neue DsRed-Mutanten, mRFP und tdim2(12), die sich durch eine wesentlich schnellere Reifung (≤ 2h) und geringere Aggregationstendenz auszeichnen. Dennoch sind rot fluoreszierende Proteine bisher nicht so effizient optimiert worden wie beispielsweise EGFP. Ihre Verwendung stellt daher immer einen Kompromiss zwischen verschiedenartigen Einschränkungen in Hinblick auf ihre Helligkeit, Photostabilität und ihr Aggregationsverhalten dar. Diese Faktoren beeinflussen das intrazelluläre Diffusionsverhalten sowie die maximal detektierbare Helligkeit – beide Aspekte haben großen Einfluss auf die Qualität und Zuverlässigkeit intrazellulärer FCS Messungen. Aus diesem Grunde wurden verschiedene rot fluoreszierende Proteine in Zellen exprimiert und ihr intrazellulares Verhalten mit Hilfe der Autokorrelationsanalyse analysiert (vgl. Abbildung 11).

- „Tdimer2(12)" war erwartungsgemäß das mit Abstand hellste Protein (ca. doppelt so hell wie das Maximum der anderen Kandidaten)
- „mRFP1" verhielt sich wie ein echtes Monomer, mit deutlich schnellerem Diffusionsverhalten.
- „Tdimer2(12)" und „DsRed2" zeigten ein ähnliches Diffusionsverhalten.

III.1.5. Scanning/Imaging von ganzen Zellen

Parallel zu der Detektion einzelner oder weniger Moleküle sollte die spektrale und Intensitätscharakteristik ganzer Zellen erfasst werden. Die Instrumentierung des Scanningmoduls wurde durch Kooperationspartner (Piezo Jena, Till) entwickelt, und sollte zur quantitativen Erfassung potentiell relevanter Parameter in den eigenen Labors gestestet werden. Leider konnte aufgrund verschiedener technischer Probleme im Berichtszeitraum keine abschließende Bewertung dieser Module durch unsere Arbeitsgruppe vorgenommen werden. Die Arbeiten werden gegenwärtig ohne Finanzierung, und daher erheblich verlangsamt, fortgeführt.

III.2. Arbeiten zur intrinsischen Fluoreszenz

III.2.1. Dreiphotonen-Anregung der Tryptophanfluoreszenz

Der Arbeitsgruppe stand ein Titan-Saphir Laser mit dem Wellenlängenbereich von 700-1000 nm für die Mehrphotonenanregung zur Verfügung. Tryptophan kann allerdings innerhalb dieses Wellenlängenbereichs nur über einen Dreiphotonenprozeß angeregt werden, und es zeigte sich, dass die Effizienz dieser Anregung bei weitem nicht für Einzelmolekülbasierende Arbeiten ausreichte. Daher wurde dieser Arbeitsschritt an den Kooperationspartner LLG delegiert, denen ein weitaus größerer Wellenlängenbereich auch für Zweiphotonenanregung zur Verfügung stand.

III.2.2. Charakterisierung der zellulären Autofluoreszenz

Sämtliche Prozesse, die mit einer charakteristischen Änderung der zellulären Autofluoreszenz einhergehen, können prinzipiell in Autofluoreszenzassays quantifiziert werden. Die durch Mehrphotonenanregung zugänglichen Stoffe (Tryptophan in Proteinen, NAD/H, FAD/H, Flavine) sollten hierzu identifiziert und ihre Abhängigkeit von spezifisch interessanten intrazellulären Prozessen charakterisiert werden. Da diese Studien prinzipiell sehr umfangreich sind, war für diesen Arbeitsschritt ein sorgfältiges vorheriges Abwägen der Erfolgsaussichten in den jeweiligen Assays angepassten Testmessungen erforderlich. Es zeigte sich allerdings, dass in keiner der eingesetzten Zelllinien bei angemessener Behandlung der Zellen (insbesondere Verwendung von Phenolrotfreiem Nährmedium) die Autofluoreszenz ein nennenswertes Problem darstellte, so dass auf eine weiterführende Charakterisierung dieses Parameters, der nicht Gegenstand des Forschungsantrags war, verzichtet werden konnte.

III.2.3. GFP und andere fluoreszierende Proteine als Reportersystem

Als stark autofluoreszierendes Protein mit Fluoreszenzcharakteristiken vergleichbar denen eines Laserfarbstoffs nimmt GFP quasi eine Sonderstellung in der Behandlung der intrinsischen Fluoreszenz ein. Als Markerfarbstoff für zelluläre Assays besteht seine hohe Attraktivität darin, dass Fusionsproteine zwischen prinzipiell beliebigen zellulären Proteinen kloniert und in der Zelle exprimiert werden können. Intrazelluläre Messungen an GFP-markierten Molekülen sind ohne Eingriff in das System möglich. Von großem Interesse sind hierbei funktionale Mutanten, die als Indikatoren der molekularen Mikroumgebung fungieren.

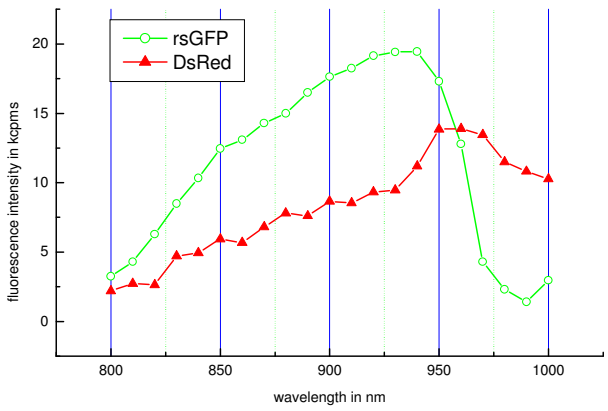

Abb. 12:
Zweiphotonen-Exitationsspektren für den relevanten Messparameter η in kHz pro Molekül (kcpms) für GFP und DsRed. Der interessante Bereich ist dadurch gekennzeichnet, dass beide Emissionsraten über ca. 10 liegen. Nur hier ist mit genügend Signal für die Einzelmolekülmessungen zu rechnen.

In unseren Arbeiten (Heinze et al. 2000, Schwille and Heinze 2001) konnte gezeigt werden, dass es auf Basis synthetischer Farbstoffe der Rhodaminfamilie möglich ist, eine simultane Zweiphotonen-Exitation spektral verschiedener Spezies mit einer einzigen IR-Laserlinie zu gewährleisten. Bei geeigneter Wahl der Farbstoffe, insbesondere unter den spektralen Kriterien der Absorptionseffizienzen und der Photostabilität, kann diese Ko-Exitation sogar effizient genug für Einzelmolekülbasierende Verfahren wie die FCS sein.

Ziel war vorrangig, die Eignung der für molekular- und zellbiologische Arbeiten so wichtigen klonierbaren Farbstoffe wie GFP (green fluorescent protein) oder dessen Mutanten, sowie die verschiedenen Formen des GFP-Homologs DsRed für die simultane Zweiphotonenanregung zu testen. In weiterführenden Arbeiten (Kohl et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass DsRed sich in Kombination mit GFP hervorragend für die Zweiphotonenanregung eignet. Ein Proteasesubstrat wurde auf Basis von GFP/DsRed kloniert, die entsprechende Enzymkinetik mit TEV-Protease konnte in vitro auf Einzelmolekülebene aufgenommen werden. Dieser Assay ist nun ein hervorragender Ausgangspunkt für weitere Assayentwicklungen in vivo.

Um die Eignung von GFP und DsRed für die zweifarbige Zweiphotonen-Kreuzkorrelationsanalyse (TPCCS) zu testen, mussten zunächst deren Exitationsspektren verglichen werden, die durch Messung des relevanten Parameters η (detektierte Photonen pro Molekül und Sekunde) bei sukzessivem Durchstimmen des Anregungslasers über den gesamten verfügbaren Bereich von 700 bis 1000 nm ermittelt werden können. Abb. 12 zeigt die Resultate. Erwartungsgemäß findet sich eine Verschiebung der Maxima, die aber bei weitem nicht so dramatisch ist wie bei der Einphotonenanregung. Simultane Anregung beider Farbstoffe mittels TPE ist also über einen relativ breiten Bereich (930-960 nm) sehr gut möglich.

III.4. Entwicklung und Evaluierung geeigneter Fluoreszenzassays

Die Assayentwicklung geschah in Wechselwirkung mit Evotec, wobei die eigenen Arbeiten insbesondere in Vorstudien zur Wahl des geeigneten Messparameters und Farbstoffsystems (Punkte III.1. bis III.3), aber auch in der Validierung der von Evotec bereitgestellten Assays unter den experimentellen Bedingungen der Mehrphotonenanregung, bestanden. Hierbei war zu beachten, dass die von Evotec entwickelten Probenträger bzw. Liquid-Handling-Systeme (Nanotiterplatten und Mikroarrays) optisch mit der Mehrphotonenanregung kompatibel sind.

III.4.1 In-vitro Systeme

Erfolgreich entwickelte Proteaseassays sind bereits unter III.2. diskutiert und in Kohl et al. 2002 veröffentlicht.

III.4.2. Assays auf Basis von adhärenten Zellen

Adhärente Zellen (z.B. CHO, A431) stellten zunächst ein gutes Untersuchungsobjekt dar, da die Detektion stabil lokalisiert erfolgen kann. Wir unterscheiden hierbei zwischen Assaysystemen auf Basis membranständiger Proteine (Rezeptor-Ligand/Inhibitor) oder intrazellulären Assays (Enzym-Substrat/Inhibitor). Für beide Ansätze sollten Modellsysteme getestet werden, wobei der Schwerpunkt auf der Bestimmung kinetischer Parameter (Bindungskonstanten, Prozessivitäten) liegt.

Eine neue Gruppe von Fusionsproteinen, bestehend aus rsGFP, DsRed2 und verschiedenen Linkern mit einer Schnittstelle für die Protease Casp-3 wurde nach der erfolgreichen Klonierung im bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA 3 aufgereinigt und via SDS- und Nativer Page erfolgreich auf ihre Funktion hin überprüft. Dabei wurde u.a. gezeigt, dass die Casp-3 Schnittstelle auf den gewählten Linkern für die Protease zugänglich ist und die Fluorophore selber nicht von Casp-3 abgebaut werden.

Sequenz der Linker:

CaspI : SG-Linker (soll FRET ermöglichen)

Q D P ***G S S G G S G D E V D G S S G G S G*** L P V (24AS)

CaspII: Alpha-Helix-Linker

Q D P G ***W E A A A R E A A A R A D E V D E A A A R E A A A R E A A A A*** L P V (33AS)

CaspII': Alpha-Helix-Linker

Q D P G ***W E A A A R A D E V D E A A A R E A A A R E A A A A*** L P V (38AS)

Casp III: Optimierter Linker (Elastizität)

Q D P ***G G T A A A G A G D E V D A A G G A A A G A A G G S G S S G S G S G G S G S G G G G*** L P V (48 AS)

Auf der Grundlage dieser Befunde wurde mit der Arbeit an einem Expressionssystem für diese Proteine in eukaryotischen Zellen begonnen, zunächst mit der Zelllinie „HeLa“. In Hinblick auf das zelluläre Meßsystem bestehen 2 Prioritäten:

1. Beweis der Exprimierbarkeit der Fusionsproteine in Zellen und Beschreibung ihres Verhaltens
2. Etablierung stabiler Zellinien zur regulierten Induktion von Reporterkonstrukten/ Fusionsproteinen

Die intrazelluläre Produktion der Fusionsproteine erfolgt mit Hilfe des „Complete Control™ Inducible Mammalian Expression System“ (Stratagene), da dieses Expressionssystem eine besonders gute Regulierbarkeit der intrazellulären Expressionslevel ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die hergestellten Fusionsgene in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGSH kloniert. Ein zweites Plasmid, pERV, ist für die Regulation/ Induktion der intrazellulären Expression verantwortlich. Um das Expressionssystem zu etablieren, wurde versucht, diese beiden Plasmide in zwei sequentiellen Transformationsschritten in Hela Zellen zu klonieren. Besondere Aufmerksamkeit galt einer Expressionsstudie, in der über transiente Expression Fusionsproteine in Zellen exprimiert werden sollten. Dieser Test sollte klären, ob die klonierten/hergestellten Proteinkonstrukte in der Zelle exprimierbar und stabil sind, die Zeit bis zur Reifung der Fluorophore intakt überstehen, sowie Diffusion in Zellen zeigen.

Darüberhinaus wurden als alternative Strategien folgende Maßnahmen ergriffen:

- Klonierung eines N-terminalen His-Tags (zusätzlich zum C-terminatlen Strep-Tag): Die Aufreinigung der Fusionsproteine muss dabei stark verbessert werden, um auch Elektroporationsexperimente an Zellen vorzunehmen.
- Eine Auswahl alternativer roter Fluorophore (DsRed Mutanten, ein neues rotes fluoreszentes Protein „eqFP611“, ReAsh-System) wurde auf seine Eignung zum DsRed2-Ersatz getestet.

Die prinzipielle Durchführbarkeit von intrazellulären Kreuzkorrelationsanalysen unter ausschließlicher Verwendung fluoreszierender Proteine wurde in einem heterologen Modellsystem bewiesen. Aus *E.coli* Kulturen aufgereinigte Fusionsproteine wurden nach vollständiger Reifung der Fluorophore in menschliche Zellen (ER 293, eine HEK Mutante) eingebracht. Hierzu wurde das „Pinocytose Influx Assay“(Molecular Probes) eingesetzt und hoch konzentriertes Fusionsprotein (200-400µM) verwendet.

Die erfolgten Messungen (zusammengefasst in Abb.13) demonstrierten,

- dass die Fusionsproteine frei im Cytoplasma diffundieren.
- dass mindestens 75% der *in „vitro“* für die relative Kreuzkorrelation erhaltenen Werte auch in Zellen gemessen werden können.
- dass weder das „Pinocytose Influx“ Protokoll noch die intrazellulare Umgebung die Messung mit signifikanter artifizieller Kreuzkorrelation belasten. Für Negativkontrollen (GFP-

DsRed Gemisch) beträgt der Offset der durchgeführten *in „vivo“* Messungen ≤15% (zum Vergleich: 5% *in „vitro“*).

- dass eine breite Verteilung der aus verschiedenen Zellen gewonnenen Kreuzkorrelations-amplituden vorliegt (Abb. 13a).

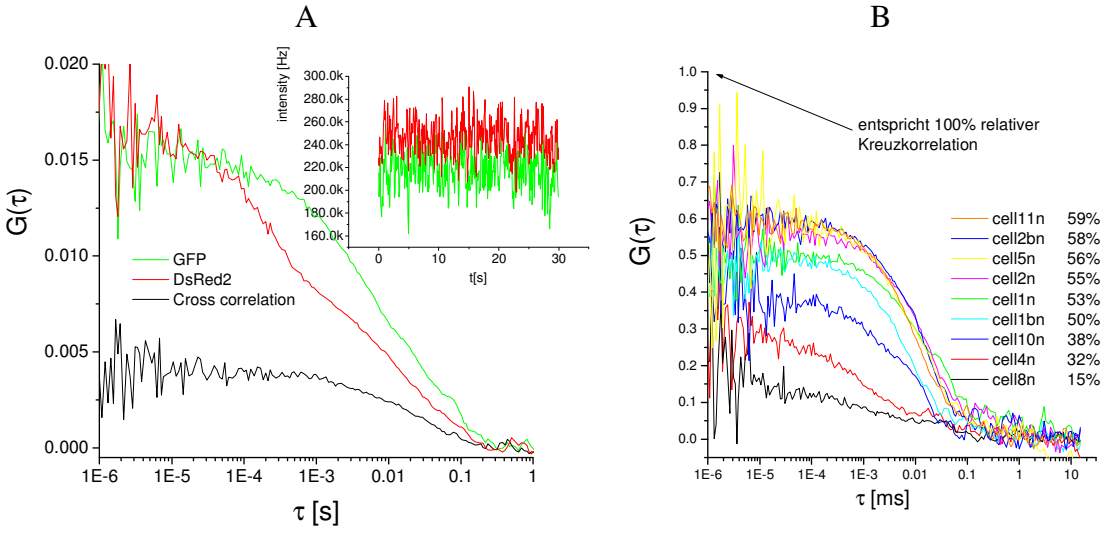

Abb 13:

A: repräsentative Messung nach exogener Bestückung der Zellen mit Fusionsprotein
B: normalisierte Kreuzkorrelationsfunktionen nach Messung mehrerer beladener Zellen

Für intrazelluläre Expressionsversuche wurden vorzugsweise Fusionsproteine mit mRFP1 und tdimer2(12) verwendet, die über verschiedene Linker-Sequenzen an GFP gebunden sind. Die Messungen erfolgten nach „Über-Nacht“ Expression (>12h) oder nach kurzen Induktionszeiten (3-4h).

- Bestimmte Fusionsproteine zeigten hohe relative Kreuzkorrelationen, typischer Weise zwischen 30% und 50%. Diese Ergebnisse stellen ausreichend hohe Ausgangswerte für online-Messungen von proteolytischen Reaktionen oder Anfangs-/Endpunkt-Analysen dar.
- Die eingesetzten Fusionsproteine zeigten große Unterschiede in ihrer intrazellulären Stabilität, was auf ihre unterschiedliche Zusammensetzung vor allem im Hinblick auf die verwendeten Linker-Sequenzen zurückzuführen ist.
- Das intrazelluläre Expressions-System ermöglichte ebenfalls sehr elegante und überzeugende Negativkontrollen.

Insgesamt können die Ergebnisse wie folgt strukturiert und zusammengefasst werden:

1. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Zweiphotonenanregung von bis zu drei spektral verschiedenen Farbstoffen mit einer Anregungswellenlänge möglich ist (Heinze et al. 2000, Heinze and Schwille 2001)
2. Durch die Zweiphotonen-Koinzidenzanalyse konnten die Messzeiten gegenüber der Kreuzkorrelationsanalyse erheblich reduziert werden (Heinze et al. 2002)
3. Die Kombinierbarkeit spektral verschiedener klonierbarer Farbstoffe (DsRed, GFP) konnte gezeigt werden (Kohl et al. 2002)
4. Verschiedene Rotfarbstoffe als Varianten zu DsRed mit geringerer Reifungszeit, geringerer Cytotoxizität und besserer Photostabilität wurden getestet (Kohl et al., in press)

5. Intrazelluläre Zweiphotonen-Assays, z.B. auf Kaspaseaktivität, wurden auf Basis der biophysikalischen Studien entwickelt, ein generelles Konzept für intrazelluläre Zweiphotonenassays an adhärenten Zellen steht damit zur Verfügung (Kohl et al., in preparation).

Im Rahmen des Projekts entstandene Publikationen:

Kohl T. and Schwille P. (in preparation) Development of a novel protease assay exclusively based on fluorescent proteins for dual-color cross-correlation analysis in vivo

Kohl T. and Schwille P. (2004) Fluorescence Correlation Spectroscopy with autofluorescent proteins. Advances in Biochem. Biotechnol., Microscopic Techniques

Heinze K.G., Jahnz M., and Schwille P. (2004) Triple-Color Coincidence Analysis: One Step Further in Following Higher Order Molecular Complex Formation
Biophys. J. 86:506-516

Heinze K.G., Rarbach M., Jahnz M., and Schwille P. (2002) Two-photon fluorescence coincidence analysis: Rapid measurements of enzyme kinetics, *Biophys. J.* 83:1671-1681

Kohl T., Heinze K.G., Kuhlemann R., Koltermann A., and Schwille P. (2002) A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12161-12

Dittrich P.S., and Schwille P. (2001) Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single molecule analysis with one- and two-photon excitation, *Appl. Phys. B* 73:829-837

Schwille P., and Heinze K.G. (2001) Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy, *ChemPhysChem* 2:269-272

Heinze K.G., Koltermann A. and Schwille P. (2000) Simultaneous Two-Photon Excitation of Distinct Labels For Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97:10377-10382

III. Bilanz

III. 1. Projektplan, Zeitplan

Die Projektarbeiten konnten, bis auf die Arbeiten im Zusammenhang mit dem Scanningmodul (TILL), erfolgreich und innerhalb des gesetzten Zeitplans bearbeitet werden. Eine Ausnahme ist die Integration des Mehrphotonenreaders in unsere HTS Umgebung. Dieser Arbeitsschritt ist zum heutigen Zeitpunkt noch verfrüht, da die Lasersysteme nicht in dem Umfang stabiler und preiswerter geworden sind, wie das vor dem Start des Projektes gehofft wurde.

III. 2. Voraussichtlicher Nutzen, fortgeschriebener Verwertungsplan

Die Ziele dieses Projektes: Entwicklung eines Zellverteilungsmoduls, eines Kultivierungssystems, geeignete Assays für Zellen in Suspension sowie für adhärente Zellen, Integration in unsere HTS Umgebung, geeignete Assayplatten, hohe Screengeschwindigkeit, Reduktion der Messzeit für Zweifarbenanregung, Intrazelluläre Zweiphotonenassays über GFP Klone, wurden vollständig erreicht.

Das Zellverteilungsmodul wird im Rahmen unserer Mark III Screening Anlage angeboten und ist bei einigen Kunden erfolgreich im Einsatz. Das Kultivierungssytem ist als Prototyp verfügbar, da aber die meisten Kunden gerade erst begonnen haben Zellen im HTS Betrieb einzusetzen, ist damit zu rechnen, dass kundenspezifische Anpassungen noch erfolgen müssen.

Der Mehrphotonen-Scanner steht noch nicht zur Verfügung. Sobald Zweiphotonen-Lasersysteme stabil und preiswert am Markt existieren, können solche Systeme in die Evotec HTS Umgebung integriert werden.

Insgesamt wurde durch die Zelltauglichkeit unserer Screening Systeme und unserer Benchtop Geräte eine zusätzliche Qualität geschaffen, die dazu geführt hat, dass unsere Firma sehr konkurrenzfähige Produkte am Markt platzieren konnte. Dies ist auch dem BMBF und dem Engagement aller Verbundpartner zu verdanken!