Abschlussbericht

KMU-innovativ- Verbundprojekt: Erforschung einer optischen Messmethode für die automatisierte Messung von molekularen Strukturveränderungen in der Wirkstoffforschung (quantumFRET)

–

Teilvorhaben: Erforschung und Realisierung eines Labormusters für die automatisierte Messung von molekularen Strukturveränderungen

Zuwendungsempfänger: NanoTemper Technologies GmbH

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2020 – 31.12.2024

Förderkennzeichen: 13N15316

Contents

I. Kurzbericht 3
1. Ursprüngliche Aufgabenstellung 3
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand 3
3. Ablauf des Vorhabens 3
4. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit 4
II. Eingehende Darstellung 5
1. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen Planung und wissenschaftlich-technische Ergebnisse 5
2. Proteinmarkierungsmethoden 5
2.1. His-Tag Labeling 5
2.2. Avi-Tag Labeling 9
2.3. Streptavidin Labeling 10
2.4. Sortase Labeling 11
3. qFRET Messaufbau 11
4. qFRET Vergleichsmessungen 12
5. Änderungen in der Zielsetzung 13
6. Erfolgsaussichten und Verwertungsplan 14
7. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen Planung 15

I. Kurzbericht

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Das Projekt "quantumFRET" erforscht ein neues optisches Messverfahren zur Analyse biomolekularer Strukturveränderungen in der Medikamentenentwicklung. Mit "quantumFRET" können Affinitäten von Wirkstoffen und strukturelle Änderungen mit Angströmgenauigkeit sichtbar gemacht werden, was die Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Wirkstoffen erleichtert. Dies verkürzt den Zeitaufwand für die Erforschung neuer Wirkstoffe um mehrere Monate und erhöht das Umsatzpotential bei Blockbuster-Medikamenten. Das Verfahren wird in Zusammenarbeit zwischen NanoTemper Technologies GmbH, der Ludwig-Maximilians-Universität München und Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG erforscht und sollte anhand wichtiger Targets aus der Onkologie getestet werden.
Dazu sollte innerhalb des Teilvorhabens ein quantumFRET-Laboraufbau erforscht und realisiert werden, der in der Lage ist, an beliebigen Proteinen bindungsinduzierte Strukturveränderungen zu bestimmen, und zwar mit

- einer Auflösung von +/- 2 Angström
- einer Messdauer von 10 s / Probe
- einer Proteinkonzentration von 10 nM

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Wirkstoffe werden in Screeningverfahren identifiziert, indem ihre Wechselwirkung mit Krankheitsproteinen zuerst detektiert (Primärscreening) und dann quantifiziert (Sekundärscreening) wird. Affinitäten werden mit Techniken wie ITC, SPR oder Fluoreszenzverfahren bestimmt. Danach werden wenige Wirkstoffkandidaten weiter charakterisiert, wobei die Auswirkung der Wirkstoffbindung auf die Struktur des Zielproteins untersucht wird. Die Bedeutung von Strukturveränderungen zeigt sich im Nobelpreis für Kryo-Elektronenmikroskopie 2017.

Aktuell sind Strukturaufklärungsverfahren teuer, aufwändig und langsam. Das Forschungsvorhaben nutzt die smFRET-Messmethodik, die Strukturänderungen und Wechselwirkungen von Proteinen nachweist. Biomoleküle werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gemessen. Die Messung von immobilisierten Molekülen kann parallelisiert werden, hat aber Artefakte. Die Messung frei diffundierender Moleküle ist komplex und dauert lange. Daher können smFRET-Messungen nur von wenigen spezialisierten Forschungsgruppen durchgeführt werden und sind für Pharma- und Biotechnologiefirmen nicht einsetzbar. Quantitative Messungen im Molekülensemble galten vor Projektstart als prinzipiell nicht durchführbar. Während des Projekts wurde ein quantitativer FRET-Ansatz für lebende Zellen veröffentlicht[1].

3. Ablauf des Vorhabens

Arbeitspaket 1:
Der Fokus des Arbeitspakets 1 war die Erforschung einer Messanordnung für qFRET**.** Dazu wurde in den ersten Monaten in enger Abstimmung zwischen NanoTemper, der LMU/AG

[1] https://doi.org/10.1038/s41598-020-62924-w

Cordes und Boehringer ein Pflichtenheft erarbeitet, das kontinuierlich an die Anwenderwünsche und neue Marktgegebenheiten angepasst wurde (**AP1.1**). Basierend auf NanoTemper Technologie wurde eine erste Messanordnung für qFRET erforscht und realisiert. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten bedingt durch COVID wurde dieser Meilenstein erst gegen Ende 2021 anstatt ursprünglich geplant Anfang 2021 erreicht (**AP1.2**). Die Erforschung spezieller Fluoreszenz-Farbstoffe für AP1.3 konnte aufgrund einer umfassenden Literaturrecherche bereits Mitte 2021 erfolgreich abgeschlossen werden. Die Erforschung optimaler Probencontainer für **AP1.4** konnte aufgrund von Anwenderfeedback verkürzt werden und es stellte sich heraus, dass unsere kapillarbasierten Träger eine ideale Plattform für qFRET sind. Die Entwicklung selektiver Proteinmarkierungsmethoden war ursprünglich als Teil des **AP1.3** vorgesehen. Für FRET-Experimente müssen die zu untersuchenden Proteine zweifach selektiv markiert sein. Es stellte sich jedoch heraus, dass dies aufgrund des hohen Aufwands mit aktueller Methodik beim Anwender kaum realisierbar ist. Daher wurde ein hoher Aufwand für die Erforschung verschiedener bioorthogonaler Methoden verwendet. Basierend auf den Ergebnissen der ersten Messanordnung wurde ein alleinstehender Laboraufbau für FRET-Messungen entwickelt (**AP1.5**).

Arbeitspaket 2:
Der Fokus des Arbeitspakets 2 lag auf der Entwicklung einer Mess- und Auswertesoftware, der Entwicklung von Modellsystemen und der Anwendung von qFRET in pharmazeutischen Screenings. Dazu wurde eine spezielle Auswertesoftware erforscht, die Strukturveränderungen quantifizieren kann. Diese Software musste große Datenmengen schnell analysieren können und eine intuitive Benutzeroberfläche bieten (**AP2.5**). Mithilfe der in **AP2.1** entwickelten Testsysteme MalE47 und SBD2-1 wurde die Software strukturell charakterisiert (**AP2.2**). Dabei festgestellte Abweichungen zu smFRET können auf unterschiedliche Markierungsstrategien und die Komplexität der Messungen zurückgeführt werden. Aufgrund der schwierigen Forschungs- und Entwicklungssituation in der Industrie war das Engagement für das Arbeitspaket **AP2.4** gering. Daher konnten die geplanten Screens nicht durchgeführt werden. Daher sollten weitere interne Messungen und Verbesserungen fortgeführt werden, bevor Kapazitäten für Screeningprojekte an der Universität und in der pharmazeutischen Industrie angefordert werden.

4. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit

Es wurde ein quantumFRET-Laboraufbau entwickelt, der in der Lage ist, bindungsinduzierte Strukturveränderungen mit einer Messdauer von 10 Sekunden pro Probe zu bestimmen. Die allgemeine Funktionsfähigkeit des Systems wurde anhand von smFRET Vergleichsmessungen an zwei Proteinen in Zusammenarbeit mit der AG Cordes demonstriert. Die gewünschte Auflösung von +/- 2 Angström konnte bisher noch nicht realisiert werden und erfordert weitere Optimierungen. Eine wesentliche Hürde, die nicht abschließend überwunden werden konnte, ist die selektive Doppelmarkierung therapeutisch relevanter Proteine. Die dafür untersuchten orthogonalen Markierungsmethoden werden auch nach Projektabschluss fortgeführt und es ist geplant die Erkenntnisse der FRET-Optik in künftige Generationen der Monolith und Dianthus-Produktlinien zu integrieren, um zusätzliche strukturelle Informationen über Bindungsereignisse zu erhalten. Zudem werden die Erfahrungen im Aufbau der FRET-Optik für aktuell in der Entwicklung befindliche neue Optiken verwendet. Aufgrund der schwierigen Lage in der industriellen F&E konnte das geplante Engagement nicht erreicht werden und die abschließenden Screeningprojekte der AG Cordes und Boehringer Ingelheim wurden nicht durchgeführt. Die übergeordneten Ziele wurden erreicht, jedoch sind weitere Optimierungen im Bereich der Markierung und Präzision erforderlich, um die Marktreife des Geräts zu gewährleisten.

II. Eingehende Darstellung

1. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen Planung und wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Das Projekt "quantumFRET" zielte darauf ab, ein neues optisches Messverfahren zur Hochdurchsatzanalyse biomolekularer Strukturveränderungen in der Medikamentenentwicklung zu erforschen. Dieses Verfahren sollte es ermöglichen, strukturelle Änderungen mit Angströmgenauigkeit sichtbar zu machen, bevor teure und aufwändige bildgebende Methoden wie Kryo-Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallografie zum Einsatz kommen. Ursprünglich war geplant, die Anwendbarkeit des Verfahrens anhand wichtiger Targets aus dem Bereich der Onkologie zu zeigen und dabei eng mit der Ludwig-Maximilians-Universität München (AG "Physikalische und Synthetische Biologie" von Prof. Dr. Thorben Cordes) und Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG in Wien zusammenzuarbeiten.
Das erste Ziel war die die Suche nach passenden FRET-Farbstoffen für das Verfahren. Die Literaturrecherche des Projektpartners LMU hat ein eindeutiges Bild ergeben, welche Farbstoffe häufig erfolgreich im Einzelmolekül-FRET-Bereich eingesetzt werden (siehe Abbildung 1). Durch diese Recherche konnten wir z.T. auf experimentelle Arbeiten verzichten und das Vorankommen beschleunigen. Unser Vorhaben sollte sich daher vor allem auf die Farbstoffe Alexa647 und Alexa555 konzentrieren.

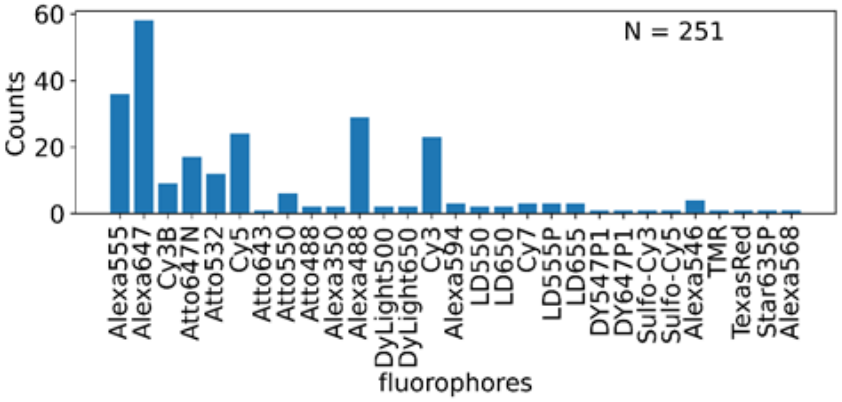

Abbildung 1: Histogramm von Fluoreszenzfarbstoffen, die in Einzelmolekül-Publikationen, hauptsächlich mit der Methode FRET, verwendet wurden. In dem für qFRET relevanten Bereich (um 550 nm, sowie um 650 nm) sind Alexa555 und Alexa647 die verbreitetsten Farbstoffe.

Allerdings wurde nach ersten Gesprächen mit möglichen Anwendern festgestellt, dass die selektive doppelte Markierung der zu testenden Proteine nicht dem Anwender überlassen werden kann. Dieser Aspekt war in der ursprünglichen Planung als Verantwortung des Anwenders betrachtet worden, musste aber unbedingt als Arbeitspaket aufgenommen werden und wurde bereits im Zwischenbericht 2021 erläutert. Ansätze, die zu diesem Zweck erforscht wurden, waren die kovalente Markierung von His-getaggten Proteinen, Avi-tag und Strep-Tag Labeling sowie die Sortase-Markierung, welche im Folgenden dargestellt sind.

2. Proteinmarkierungsmethoden

2.1. His-Tag Labeling

FRET-Messungen erfordern stehts ein Zusammenspiel zweier Fluorophore. Da diese unterschiedlichen Fluorophore möglichst spezifisch an die zu untersuchende Proteine gebunden werden sollen und außer der nachträglichen Reinigung von doppelt-gelabelten

Cystein-Mutanten (siehe Bericht AG Cordes) keine ausreichend spezifischen Markierungsmethoden existieren, wurden verschiedene Ansätze getestet.
Ein His-Tag besteht aus mehreren, typischerweise sechs, aufeinander folgenden Einheiten der Aminosäure Histidin. Es bindet reversibel an zweiwertige Metallionen, insbesondere Nickel. Ein Avi-Tag besteht aus einer spezifischen Sequenz von 15 Aminosäuren, die von dem Enzym BirA erkannt wird und unter entsprechenden Bedingungen kovalent mit Biotin modifiziert wird.
NanoTemper bietet bereits ein His-Tag-Labeling-Kit an, das mit hoher Affinität, aber dennoch reversibel an His_6-Tags bindet. Für FRET-Anwendungen ist diese Labelingmethode bedingt geeignet. Bei zu niedrigen Konzentrationen des Zielproteins oder bei widrigen Pufferbedingen kann sich das reversible Label lösen und die Messung verfälschen. Daher wäre eine kovalente Strategie zum Labeln des His-Tags besser geeignet. In der Literatur gibt es dafür mehrere Ansätze, jedoch keinen, der sich flächendeckend durchgesetzt hat. Wir haben daher mehrere dieser Ansätze parallel getestet.
(a) Der His-Tag wird kovalent über Bis-Sulfon gelabelt (dieser Ansatz wurde zur Modifizierung mit PEG von Antikörpern verwendet, weswegen man diesen Ansatz auch PEG-Sulfon Ansatz nennen kann).
(b) Ein Histidin des His-Tags wird kovalent über eine Tosylgruppe gebunden, die Spezifität für den His-Tag gegenüber anderen nukleophilen Aminosäuren wird durch eine zusätzliche Nickel-NTA-Gruppe hergestellt, die sich nach der Tosyl-Histidin-Reaktion abspaltet.

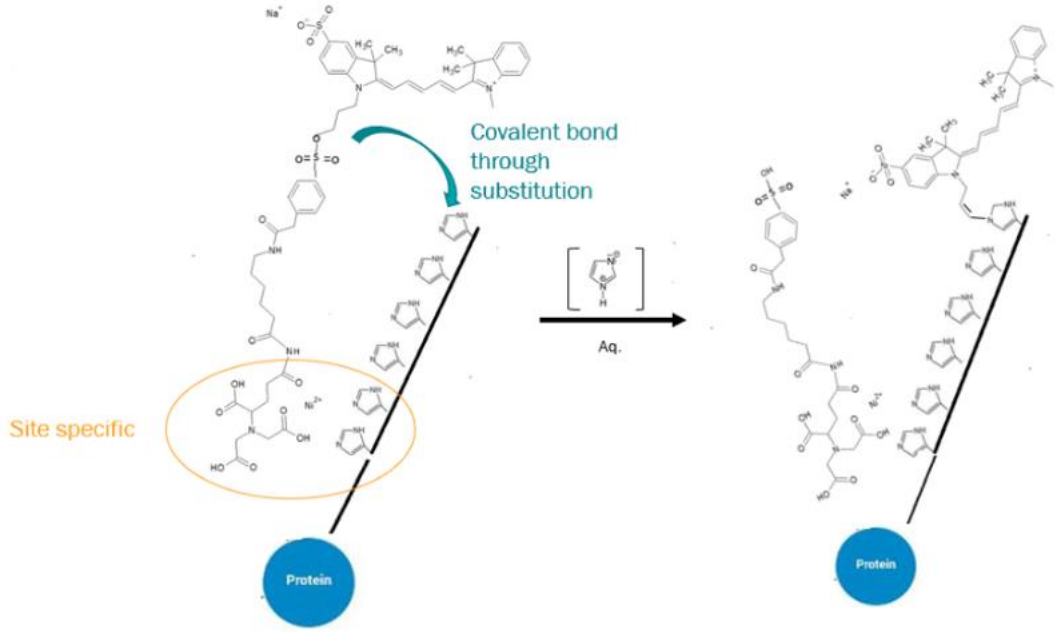

Abbildung 2: Markierung eines Proteins (blauer Kreis) mit einem Farbstoffmolekül über Mono-NTA-Tosyl. Dabei spaltet sich das Mono-NTA-Tosyl ab. Das Farbstoffmolekül ist im Anschluss über einen Linker mit dem His-Tag des Proteins verbunden (rechts).

(c) Der His-Tag wird an Cobalt-Tris-NTA (äquivalent zum Nickel-Tris-NTA der NanoTemper His-Tag-Labeling-Kits) gebunden. Diese Bindung ist reversibel. Im Anschluss wird das Cobalt durch Wasserstoffperoxid oxidiert, wodurch die Bindung quasi-irreversibel wird.

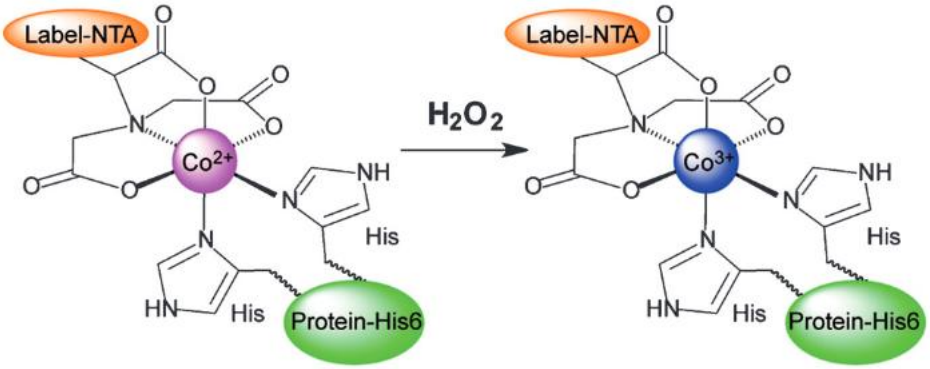

Abbildung 3: Dargestellt sind hier sowohl zwei Untereinheiten von NTA, Co^{2+} als auch zwei Histidine eines 6-His-Tags, wie sie miteinander interagieren. Durch den oxidierenden Einfluss von H_2O_2 kann Co^{2+} zu Co^{3+} oxidiert werden (Pfeil von links nach rechts), wodurch die Bindung des NTA-Komplexes an das His-Tag des Proteins eine nahezu kovalente Bindungsstärke erreicht.

Ansatz (a) wurde und wird sowohl in der Arbeitsgruppe von Prof. Cordes experimentell als auch bei NanoTemper bearbeitet. Die Bindung von Farbstoffen per Bis-Sulfon-Chemie wurde in beiden Laboren nachgewiesen. Bei NanoTemper durchgeführte Experimente ließen jedoch Zweifel aufkommen, ob die Reaktion spezifisch für das His-Tag ist oder nicht auch andere Histidine und gegebenenfalls auch Cysteine, die im Protein vorkommen, gelabelt werden können. Insbesondere die Arbeitsgruppe Cordes befasst sich weiterhin mit dieser Fragestellung und führt verschiedene Kontrollexperimente durch. Da die punktgenaue Markierung von Proteinen essenziell für FRET ist, hängt die Nützlichkeit dieses Ansatzes davon ab, ob die Reaktion wirklich spezifisch für das His-Tag ist.
Der Labelingansatz (b) wurde durch die unsaubere Synthese des Ausgangsprodukts (ausgelagert) erschwert. Jedoch haben Vorversuche keine Bindung, bzw. keine ausreichend starke Bindung des Nickel-NTAs an den His-Tag gezeigt. Dieser Ansatz wird deswegen momentan nicht aktiv verfolgt, kann aber in Zukunft wieder aufgenommen werden.

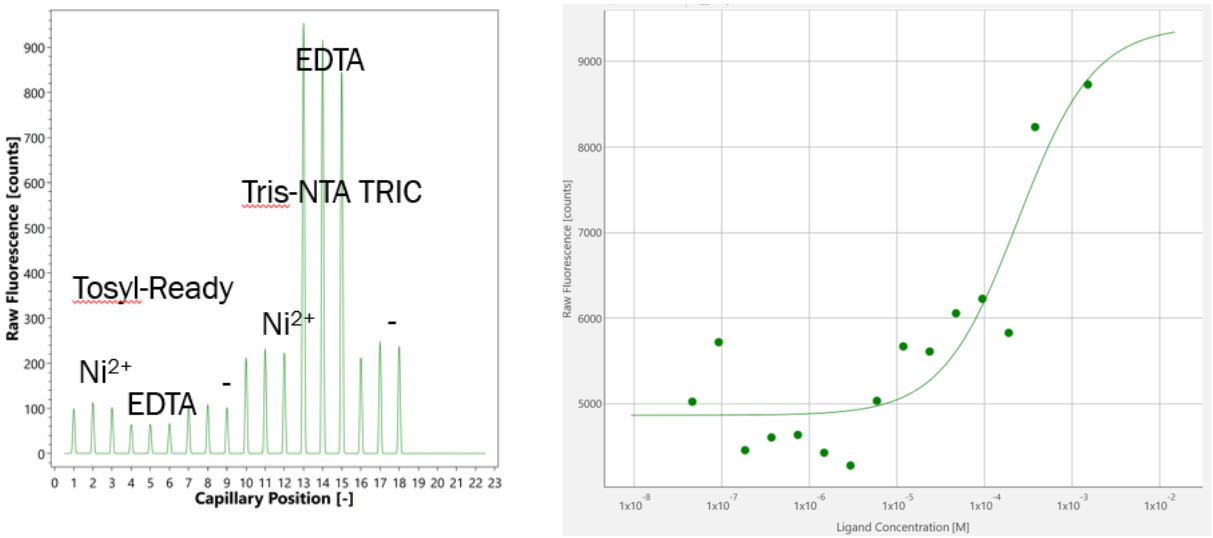

Abbildung 4: Links: Dargestellt ist der Vergleich von Mono-NTA-Tosyl-Farbstoff mit Tris-NTA-Farbstoff (einem funktionierenden NanoTemper Produkt), jeweils unter Zugabe von Nickel, EDTA und ohne Zusatz. Nickelionen „quenchen" (d.h. vermindern) die Fluoreszenz stark und EDTA entfernt Nickelionen aus dem NTA-Farbstoff-Komplex. Man sollte also, wie auf der rechten Hälfte des linken Graphen, erwarten, dass die Fluoreszenz-Counts in der Probe mit EDTA stark erhöht sind, im Vergleich zur Probe mit Nickelionen oder ohne Zugabe von EDTA. Die Tatsache, dass dies nicht der Fall ist, deutet auf Probleme hin. Der Vergleich mit und ohne Nickelionen zeigt, ob das NTA im Komplex bereits mit Nickel „beladen" ist oder ob bereits in diesem Schritt ein Fehler unterlaufen ist. Sofern das NTA funktionell im Komplex ist, ist es in beiden Fällen bereits mit Nickel beladen. Rechts:

eine Bindungskurve von Mono-NTA-Tosyl-Farbstoff an 6xHis-Peptid. Die errechnete Dissoziationskonstante K_d beträgt 240 µM, wobei der Literaturwert von Mono-NTA zu 6xHis-Tag bei etwa 10 µM liegt. Die Bindung ist also deutlich schwächer als zu erwarten wäre.

Der Ansatz (c) hat zunächst vielversprechende Resultate gezeigt. Die Proteine ließen sich mit Cobalt-Tris-NTA reversibel markieren und nach der Behandlung mit einem geringen Prozentsatz Wasserstoffperoxid war die Reversibilität markant verringert. Es zeigte sich jedoch, dass die Proteine nicht mehr funktional an Liganden binden konnten. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die stark oxidierende Wirkung des Wasserstoffperoxids zurückzuführen, die auch zur Oxidierung von Proteinteilen führen kann. Damit ist dieser Ansatz leider ungeeignet für quantumFRET-Messungen, bei denen die Funktionalität der Proteine unbedingt erhalten bleiben muss. Dieser Ansatz wurde aufgegeben.

Im weiteren Verlauf des Projekts stießen wir auf einen Ansatz, der in der Erstanmeldung EP2019180999 von einer Arbeitsgruppe bei Max-Planck beschrieben wurde. In diesem Ansatz wird u.a. Cobalt anstelle von Nickel verwendet wird um stabile Komplexe aus His-getagten Proteinen und Co(III) zu erhalten. Nach der experimentellen Optimierung stellte sich heraus, dass keine stabile Komplexe erzeugt werden können. Wir beobachteten, dass direkt nach Anregung des verwendeten Cy5-Fluorophors im MonolithX Instrument ein extremer Anstieg des Fluoreszenzsignals zu beobachten war. Dies kann u.U. darauf zurückgeführt werden, dass das angeregte Fluorophor zu einer Reduktion des verwendeten CO(III) zu Co(II) führt.

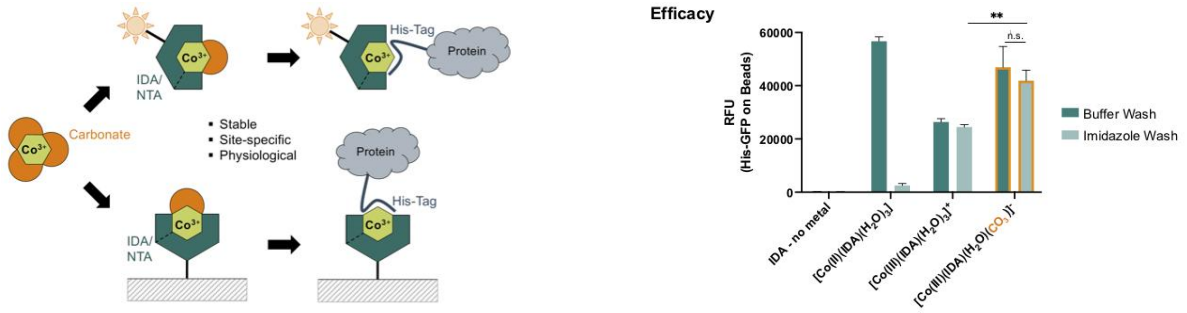

Abbildung 5: Schema des His-Tag Labeling Ansatzes basierend auf Cobalt-Carbonat

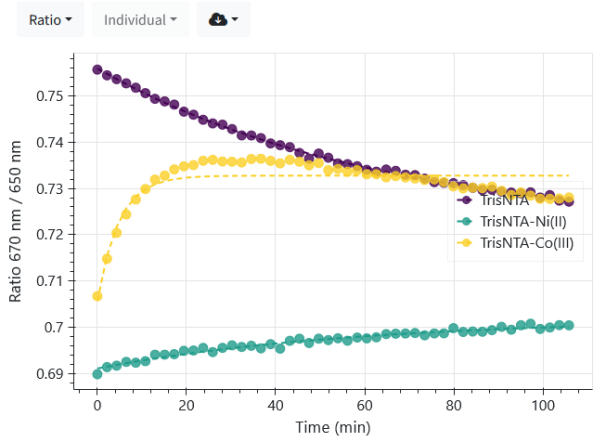

Abbildung 6: Schlüsselexperiment für die Eignung von Tris-NTA-Co(III) Komplexen zur kovalenten Markierung von His-getagten Proteinen.

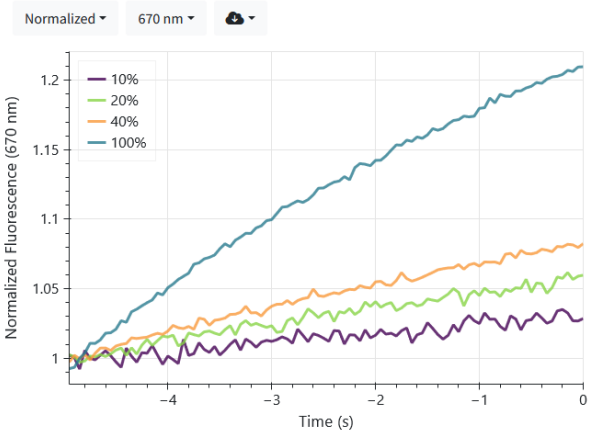

Abbildung 7 Kovalente Markierung von His-getagten Proteinen.

Der Vergleich von reinem Tris-NTA mit Tris-NTA-Ni(II) zeigt, dass das Ni(II) stark im Komplex gebunden ist und auch bei Anwesenheit von 1 µM EDTA nur sehr langsam aus dem Komplex entfernt wird. Dies ist durch den langsamen Anstieg der Fluoreszenzsignals 670/650 nm sichtbar (Abbildung 6). Die langsame Abnahme der Ratio bei reinem Tris-NTA kann durch die Einlagerung von Fremdionen aus der Lösung erklärt werden. Im Gegensatz dazu ist eine sehr rasche Auflösung des Tris-NTA-Co(III) Komplexes sichtbar (gelber Verlauf), der sich bereits

nach 30-60 min dem Verlauf ungeladenem Tris-NTA annähert. Eine mögliche Erklärung dafür finden wir in der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Abhängig von der eingetragenen Energie (10,20,40,100 %) sehen wir einen direkten Anstieg der Fluoreszenz (Abbildung 7). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Reduktion des Co(III) zu Co(II), welcher eine geringere Komplexierung als Co(III) und Ni(II) besitzen. Für alle Messungen, unabhängig von qFRET oder MST/Spectral Shift Messungen, müssen wir die Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb ihres Absorptionsspektrums anregen. Daraus Schlussfolgern wir, dass dieser Ansatz in seiner jetzigen Form, bestehend aus Co(III) in Carbonatpuffer in Komplex mit Tris-NTA nicht zur kovalenten Markierung His-getagter Proteine geeignet ist.

2.2. Avi-Tag Labeling

Ein weiterer, insbesondere in der pharmazeutischen Industrie sehr verbreiteter Protein-Tag ist der Avi-Tag. Im Normalfall wird der Avi-Tag durch die Biotin-Ligase BirA biotinyliert und das Biotin bindet dann höchstaffin an Streptavidin, NeutrAvidin oder Avidin. Diese Kopplungs- oder Markierungsstrategie wird häufig für die Bindung von Proteinen an Oberflächen, z.B. in der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie eingesetzt. Wir haben zwei Ansätze verfolgt, um einen Fluoreszenzfarbstoff an den Avi-Tag zu binden: (1) das fast direkte Binden des Farbstoffs an ein Lysin in der Avi-Tag-Sequenz, mittels eines Biotin-Analogs, das wiederum spezifisch an einen Farbstoff binden kann. (2) die Markierung eines biotinylierten Avi-Tags per fluoreszenzmarkiertem Streptavidins.
Ansatz (2) ist dabei nur für inter-Protein qFRET anwendbar, da die Markierung nicht ausreichend ortsspezifisch ist. Für solche Anwendungsfälle wäre die Methode allerdings durchaus geeignet und wir konnten zeigen, dass man biotinylierte Proteine sowohl mit einer monovalenten Streptavidinmutante markieren kann als auch mit tetramerem Streptavidin, das den Wildtyp darstellt.
Ansatz (1) hat sich als erfolgreich bewiesen und bei einem ersten Testprotein, Maltose-bindenden Proteins (MBP) mit Avi-Tag, konnten wir eine Markierungseffizienz von etwa 80% erreichen.

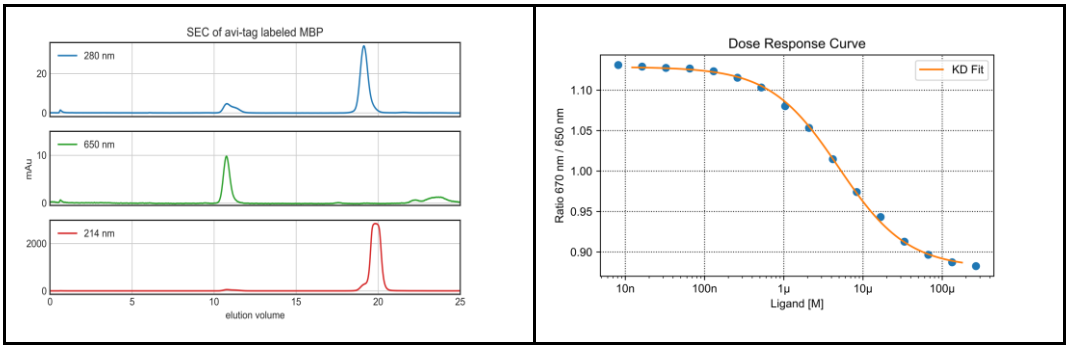

Abbildung 8: Erfolgreiche Markierung Avi-Tag MBP mittels fluoreszentem Biotin-Keton-Derivat. (links) Gezeigt ist die Trennung des gelabelten Proteins von sonstigen Reaktionskomponenten inklusive unkonjugiertem Farbstoff. (rechts) Dosis-Wirkungs-Kurve einer Titration von Maltose gegen gelabeltes MBP.

Das enzymatische Labeling von Avi-Tags mittels Keton-Derivaten zeigte positive Resultate für die Verwendung eines fluoreszenten Keton-Derivats für die enzymatische Umsetzung des Avi-Tags. Allerdings zeigte sich, dass nur für das Testsystem des MBP (Abbildung) ein vollständiger Workflow aus Labeling mit anschließender Liganden-Affinitätsmessung (Maltose) durchgeführt werden konnte. Bei anderen Avi-getaggten Proteinen wie S100B, KEAP1, cIAP1, KRAS und WDR5 traten Probleme auf, wie z.B. Komplettverlust an Protein oder Aggregation. Zudem zeigte sich durch Anwenderberichte, dass die Mehrzahl der Proteine bereits mit Biotin markiert sind, oder durch Co-Expression mit BirA biotinyliert werden. Dies bedeutet, dass Konstrukte erneut exprimiert und gereinigt werden müssten. Dadurch würde der erhoffte Mehrwert für den Anwender wegfallen und wir hofften andere orthogonale Reaktionen schneller zur Marktreife zu bringen.

2.3. Streptavidin Labeling

Da sich der Ansatz des fluoreszenten Biotin-Keton-Derivats aufgrund seiner langen Inkubationszeit oft als schädlich für das zu messende Protein herausstellte, erkundeten wir weitere Möglichkeiten. Es stellte sich heraus, dass die Biotinylierung oftmals bereits bei der Proteinexpression durchgeführt wird und wir wollen daher besonderen Fokus auf die Möglichkeit der Messung von bereits biotinylierten Targets legen. Ein weit verbreiteter Ansatz hierfür ist die Verwendung von Streptavidin, oder ähnlicher Mutanten. Diese hatten wir in vorangegangenen Experimenten aufgrund der unspezifischen Markierung als wenig relevant für unsere Ansätze betrachtet. Allerdings ergaben sich durch die Zusammenarbeit mit der Firma Lumatix GmbH neue Möglichkeiten. Deren Expertise liegt u.a. in der ortsgenauen Markierung von Proteinen mittels proprietärer Konjugationschemie. Dadurch war es uns möglich zahlreiche Mutanten des Streptavidins zu testen. Zu diesen gehörte ein a) monomeres Streptavidin und b) an verschiedenen Positionen markiertes tetrameres Streptavidin. Messungen von a) ergaben leider eine geringe Stabilität (Tm ~ 40°C) und niedrige Affinität zu Biotin und biotinylierten Targets. Mutanten von b) zeigten dagegen eine hohe Affinität zu biotinylierten Targets. Leider stellte sich heraus, dass Einzeldomänen des Streptavidins eine unzureichend hohe Affinität besitzen, um „quasi-kovalente“ Markierungen zuzulassen und sind damit nicht geeignet für die Verwendung in FRET-Experimenten.

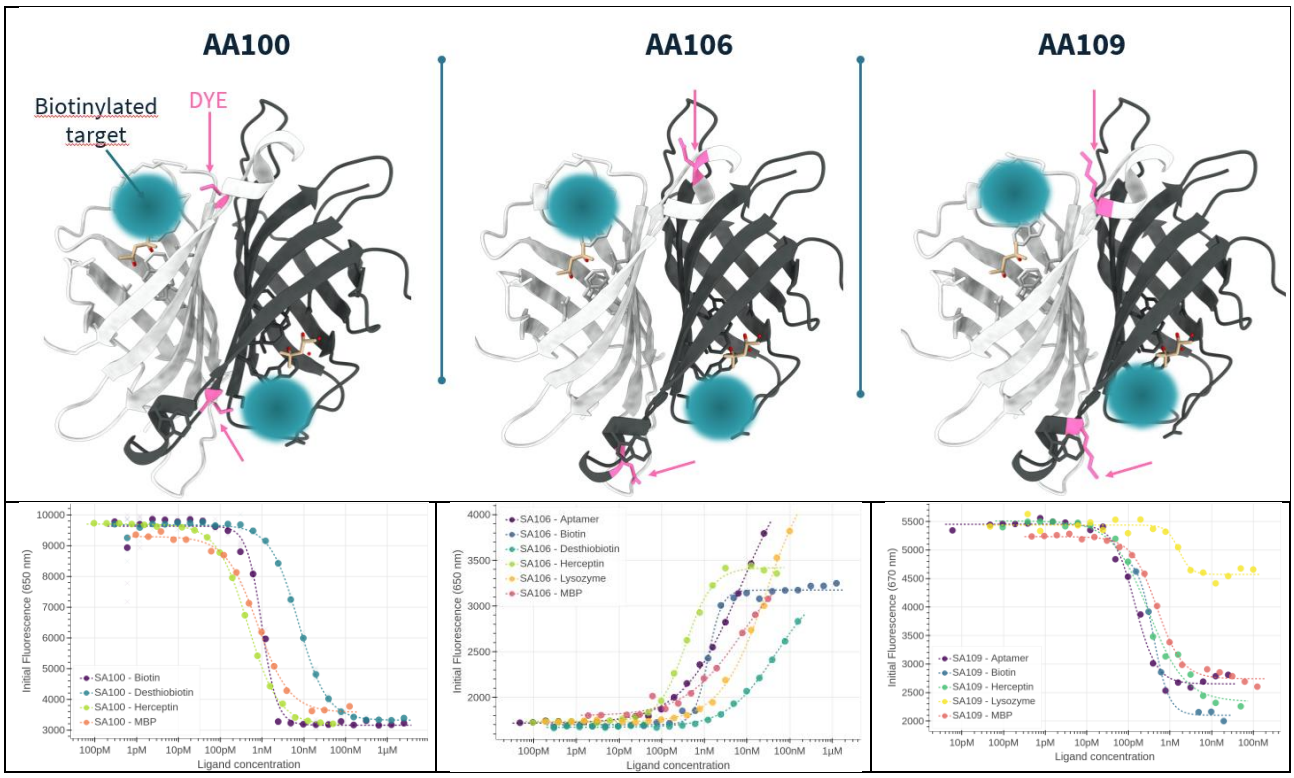

Abbildung 9: (oberes Panel) Strukturelle Informationen über die selektiven Einzeldomänen-Streptavidine und deren Fluoreszenzmarkierung. (unteres Panel) Bindungsaffinitäten verschiedener biotinylierter Targets gemessen durch Fluoreszenzänderung der drei gezeigten Streptavidin-Mutanten.

2.4. Sortase Labeling

Eine weitere Möglichkeit der Proteinmarkierung unter Zuhilfenahme von Enzymen ist die Markierung mittels Sortase. Die kurze Erkennungssequenz LPXTG auf einem Protein wird durch das Enzym Sortase erkannt und anschließend wird das terminale Glycin durch ein Substrat ersetzt, das einen Poly-Glycin Rest trägt. Dieses Substrat kann u.a. auch ein Fluoreszenzfarbstoff sein. Die notwendigen Reagenzien dafür, sowieso ein kommerziell erhältliches Testsystem wurden angeschafft. Für die weitere Erforschung des Sortase-Labelings sollten die Reaktionsbedingungen optimiert, die Umsetzung mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Substraten getestet und die so konjugierten Testproteine im qFRET Aufbau getestet werden.
Leider haben alle aktuell etablierten Methoden zur Derivatisierung mittels Sortase den Nachteil, dass keine vollständige Umsetzung zum finalen Produkt stattfindet und auch eine Rückreaktion möglich ist. Zudem wurden weitere Testproteine beim Kollaborationspartner Boehringer Ingelheim angefragt die nicht innerhalb des Projekts erhalten wurden.

Da die doppelte Markierung von Proteinen eine absolute Voraussetzung für den Erfolg des qFRET Systems darstellen arbeiten wir auch über die BMBF-Förderphase hinaus weiterhin an dieser selektiven Markierung. Wir haben eine neue Kollaboration mit der Universität Leeds etabliert, in der wir deren patentgeschützte Technologie zur Verwendung von Sortase plus einer Aminopeptidase[2] evaluieren. Diese soll eine vollständige Reaktion zum markierten Protein ohne Rückreaktion und damit eine fast stöchiometrische Umsetzung ermöglichen. Da diese Arbeiten erst kürzlich veröffentlicht wurden, konnte diese Kollaboration nicht im Rahmen des Förderprojekts abgeschlossen werden. Es wurden jedoch bereits die nötigen fluoreszenzmarkierten Proteine sowie erste Enzyme und Testsysteme aus Leeds erhalten.

3. qFRET Messaufbau

Im Verlauf des Projekts wurde ein erster qFRET-Messaufbau etabliert, um die grundlegende Funktionalität des Systems zu validieren. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Aufbau im weiteren Projektverlauf vollständig überarbeitet und technisch weiterentwickelt. Lieferkettenprobleme und die Auswirkungen der COVID-19-Pandemie führten dabei zu Verzögerungen. Die optische Messeinheit sowie der Kapillarträger wurden in ein modifiziertes Gehäuse des Typs „MonolithX“ integriert. Der finale Versuchsaufbau umfasst zwei Anregungskanäle (grün und rot) sowie zwei Detektoreinheiten. Dadurch ergeben sich vier verschiedene Messkombinationen in einem quasi-simultanen Messablauf durch stroboskopische Beleuchtung. Die beiden Anregungskanäle basieren auf LEDs, während in der Detektion hoch-sensitive Photomultipliermodule zum Einsatz kommen, um auch geringe Konzentrationen, wie sie bei hochaffinen Interaktionsmessungen vorkommen, messen zu können. Des Weiteren wird die grafische Benutzeroberfläche (GUI) angepasst damit sie auf den aktuellen Stand der Kommunikationsprotokolle für die Einzelkomponenten ist. Der optimierte Laboraufbau kann für Tests an andere Standorte verbracht werden, ohne eine Neukalibrierung der optischen Achsen. Auch die Bediensoftware wurde hinsichtlich Funktionalität und Benutzbarkeit überarbeitet und ist bereit für externe Tests.

[2] https://doi.org/10.1002/anie.202310862

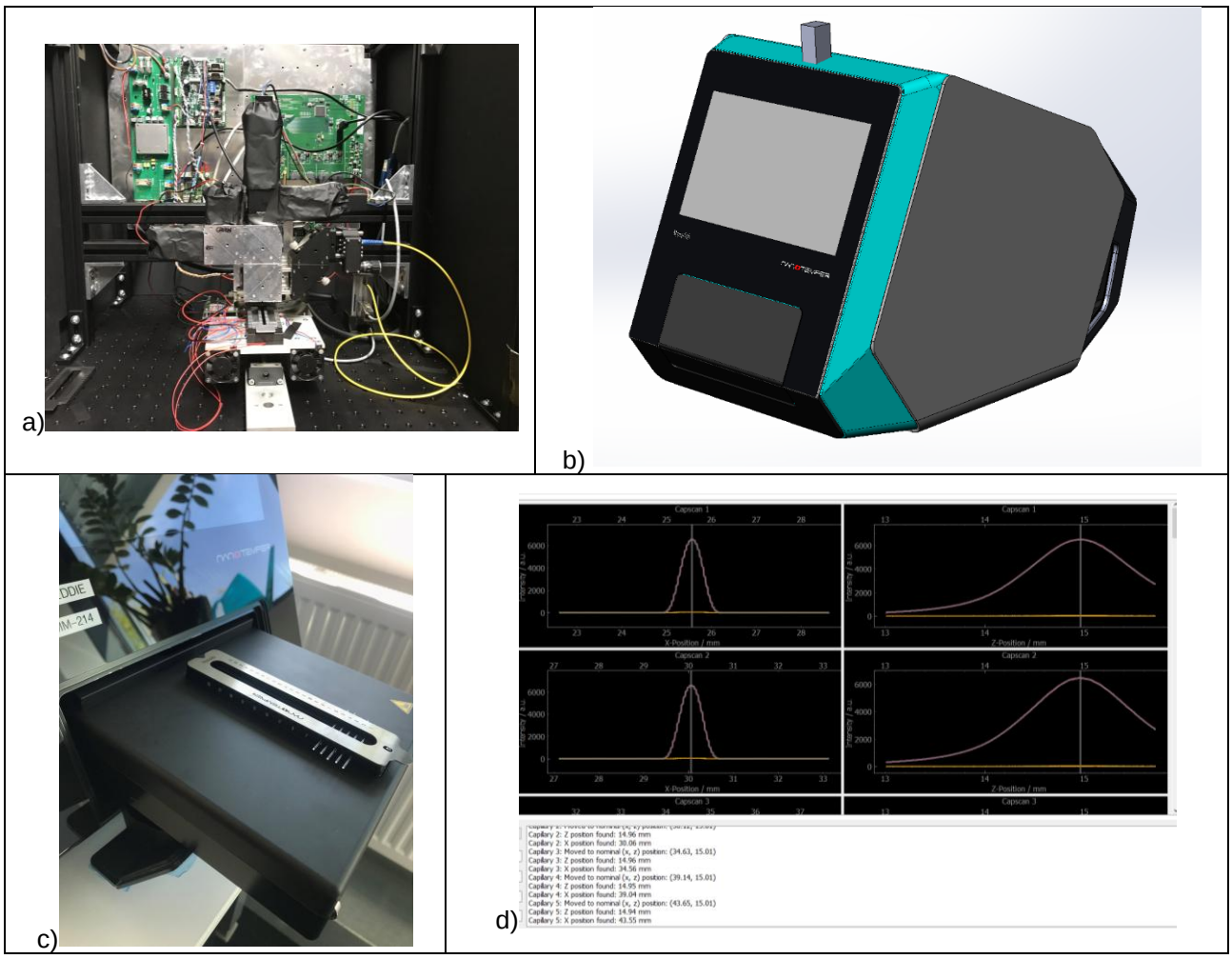

Abbildung 10: Finaler überarbeiteter qFRET Aufbau. a) Aufbau der optischen Achsen innerhalb des Geräts. b) äußere Ansicht auf das Gehäuse basierend auf der aktuellen MonolithX Generation und c) Ansicht auf die Kapillarträger. d) Ergebnisse einer qFRET Messung dargestellt in der Auswertesoftware.

4. qFRET Vergleichsmessungen

Zur Kontrolle des überarbeiteten Laboraufbaus wurden Testmessungen an den bekannten Proteinen MalE47 und SBD2-1 durchgeführt. Dabei ist MalE47 ein genetisch verändertes Maltose-bindendes Protein, bei dem die Asparaginsäure an Position 86 sowie das Alanin an Position 186 jeweils durch ein Cystein ausgetauscht wurden. An diese Cysteine wurden im Anschluss die Farbstoffe Alexa555 sowie Alexa647 gebunden. Bei SBD2-1 handelt es sich um eine Substrate Binding Domain, bei dem das Threonin an Position 369 und das Serin an Position 451 jeweils durch ein Cystein ersetzt wurden. Auch hier wurden die Cysteine im Anschluss mit den Farbstoffen Alexa555 und Alexa647 modifiziert. In früheren Versuchen wurde hingegen mit den Farbstoffen Alexa546 und Alexa647 gearbeitet. Hierdurch ergeben sich zu erwartende Abweichungen zu den FRET-Werten bzw. dem Verhältnis der FRET-Werte in früheren Zwischenberichten.

Zu den Proteinen wurde von der AG Cordes (LMU) folgende Einzelmolekül-FRET-Werte ermittelt, bei denen das Hintergrundsignal abgezogen wurde, jedoch keine Leakage, Direct Excitation oder Gamma-Faktor Korrektur durchgeführt wurde:

AG Cordes, smFRET	Apo	holo	Verhältnis apo/hole
MalE47	0.807	0.685	1.18
SBD2-1	0.563	0.749	0.75

Die Messungen am überarbeiteten Laboraufbau wurden bei verschiedenen Lichtintensitäten

der beiden Anregungswellenlängen durchgeführt. Bei erfolgreicher Korrektur unerwünschter Effekte (Leakage, Direct Excitation) und instrumentspezifischer Werte (Gamma-Faktor) sollten die berechneten FRET-Werte und insbesondere das Verhältnisse der FRET-Werte konstant bleiben.

NanoTemper, qFRET	LED grün/rot	Apo	Holo	Verhältnis apo/holo
MalE47	15 / 3	0.454	0.313	1.45
MalE47	15 / 5	0.452	0.310	1.46
MalE47	20 / 3	0.453	0.312	1.46
SBD2-1	15 / 5	0.179	0.319	0.56
SBD2-1	20 / 3	0.178	0.317	0.56

Diese Konstanz der Werte ist gegeben. Die Abweichungen der smFRET-Werte zu den qFRET-Werten sind zu erwarten, da bei qFRET auch „falsch“ markierte Proteine, also solche die nur mit Alexa555 oder nur mit Alexa647 markiert sind und nicht mit beiden Farbstoffen, mitgemessen werden. Im Einzelmolekülexperiment können diese Moleküle identifiziert und im Anschluss aus der Analyse ausgeschlossen werden, was bei der qFRET-Messung nicht möglich ist. Dadurch sind die qFRET-Werte niedriger, und zwar in Abhängigkeit der Konzentration der „falsch“ markierten Proteine. Das apo/holo Verhältnis der smFRET-Werte und das apo/holo Verhältnis der qFRET-Werte sollte jedoch identisch sein. Dies konnte bereits im Rahmen, der von Gabriel Moya durchgeführten Masterarbeit bestätigt werden. Die Abweichungen in den neueren Messungen könnten sich daraus ergeben, dass die smFRET-Werte hintergrundkorrigiert sind, jedoch die Korrekturen für Leakage und Direct Excitation fehlen.

5. Änderungen in der Zielsetzung

Innerhalb des AP1.3 „Erforschung von Farbstoffen und Makromolekülreferenzen“ wurde eine deutlich stärkere Fokussierung auf die ursprünglich nur als Unterpunkt eingeplanten Proteinmarkierungsmethoden für Makromoleküle notwendig. Dies hat sich durch Anwenderfeedback als unabdingbar ergeben und wurde deswegen verstärkt verfolgt. Dieser Mehraufwand konnte durch einen verringerten Aufwand bei der Erforschung der eigentlichen Farbstoffe und Makromolekülreferenzen kompensiert werden.

Innerhalb von AP1.4 „Erforschung von optimalen Probencontainern“ gab es ebenfalls inhaltliche Verschiebungen. Durch aktuelles Anwenderfeedback zeigte sich, dass niedriger bis mittlerer Durchsatz, der gut mit der Messung in Kapillaren zu bewerkstelligen ist, gefragter und für die nachfolgende wirtschaftliche Verwertung erfolgsversprechender ist als Hochdurchsatz-screenings in Multiwellplatten.

Durch diese Änderung im Fokus des Projektes und durch anhaltende Einschränkungen in Lieferketten -teilweise verzögern sich Lieferungen um 6 Monate und mehr - und Produktionsvorgängen durch SARS-CoV-19, hat sich die Geräteentwicklung leicht verzögert.

Für FRET-Experimente werden im Labor von Thorben Cordes – wie auch in vielen anderen akademischen Arbeitsgruppen -häufig Cystein-Mutanten zur ortsspezifischen Markierung per Maleimid-Chemie eingesetzt. Dies stellt bei potenziellen Anwendern jedoch eine Hürde aufgrund des Arbeitsaufwands dar. Zudem ist diese Strategie bei vielen humanen Proteinen nicht realisierbar, da Cysteine in diesen Proteinen wichtige Funktionen erfüllen und dementsprechend weder entfernt noch hinzugefügt werden können. Damit fällt dieser Ansatz für Anwender aus der Pharmabranche, die sich größtenteils für humane Proteine interessieren, weg.

Die Alternative, die spezifische Markierung über Protein-Tags, wird bei konkurrierenden

Methoden zwar bereits eingesetzt, allerdings häufig mit Markern, die deutlich zu groß für qFRET sind. Beispielsweise werden an Avi-Tags Streptavidin-beladene Mikrobeads gebunden. Diese Mikrobeads haben einen Durchmesser von etwa 200 nm, während qFRET Distanzänderungen bei entsprechend präziser Markierung im Subnanometerbereich auflösen kann. Daher musste, anders als ursprünglich geplant, erheblicher personeller und experimenteller Aufwand in die Erforschung alternativer Methoden unter AP1.1 - AP1.4 gesteckt werden. Dabei konnten wir zwar signifikante Fortschritte erzielen, jedoch konnte noch kein Ansatz finalisiert werden, der sich universell auf alle pharmazeutisch relevanten Proteine anwenden lässt.

Aufgrund der schwierigen Forschungs- und Entwicklungssituation in der Industrie war das Engagement für das Arbeitspaket AP2.4 gering. Daher konnten die geplanten Aktivitäten nicht durchgeführt werden und es wurden stattdessen die internen Messungen intensiviert.

6. Erfolgsaussichten und Verwertungsplan

Wissenschaftliche Erfolgsaussichten: Poster Vortrag in Rahmen des BMBF-Statusseminars „Photonik in den Lebenswissenschaften“ am 14.03.2024.

Patentanmeldungen: Wie separat ausgewiesen wurde uns erfolgreich das UPC Patent EP3995827 zugeteilt. Weitere Territorien sind kurz vor der Erteilung US20240044879.

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten: Zu Projektbeginn gab es keine vergleichbare Lösung für quantitatives reproduzierbares FRET mit Einzelmolekülpräzision. Ein alternativer quantitativer FRET-Ansatz für lebende Zellen wurde während unserer Projektarbeit veröffentlicht. Wie zuvor dargestellt halten wir jedoch umfangreiche Patentansprüche und sehen unser Verfahren ausreichend geschützt.
Während des Projekts ergab sich durch Feedback von zahlreichen potenziellen Kunden der Eindruck, dass ein Gerät, das nur diese FRET-Messung anbietet, eine hohe Markteintrittsgrenze hat. NanoTemper arbeitet aktuell daran, mehrere Messmethoden in einem Gerät zu vereinen, um den Kunden maximale Informationen über ihre Proben in einem Gerät zu bieten. Daher arbeiten wir daran mehrere Optiken in einem Gerät zu vereinen um ein „Multiplexing Optical Methods“ MOM™ zu ermöglichen. Dies kann für einen niedrigen bis mittleren Durchsatz bei in die MonolithX Gerätegeneration integriert werden. Eine Integration der qFRET-Messmethode in unsere bestehende Dianthus-Gerätegeneration würde den Durchsatz nochmals deutlich erhöhen und auch größere Screeningprojekte ermöglichen. Für MonolithX und Dianthus sind bereits Optiken zur ratiometrischen Fluoreszenzmessung eingebaut und so könnten auch analog Optiken für qFRET integriert werden.

Weiterhin planen wir Erkenntnisse des Projekts in andere Produkte zu integrieren. Unter anderem zeichnet sich ab, dass Erkenntnisse über neue Konjugationsmethoden in separate Kits entwickelt werden könnten. Hierfür sind wir aktuell in der Entwicklung und Überprüfung der Marktsituation. Unsere Erfahrungen in der Entwicklung des optischen Aufbaus des FRET-Systems ermöglicht uns eine schnellere Entwicklung neuer Gerätegenerationen die sich aktuell in der Entwicklung befinden.

7. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen Planung

Im Rahmen des Projekts konnten wir das Hauptziel erreichen und Vergleichsmessungen mit einem überarbeiteten, eigenständigen und portablen quantumFRET-Laboraufbau etablieren.

Innerhalb des Teilvorhabens sollte ein qFRET-Laboraufbau erforscht und realisiert werden, der in der Lage ist, bindungsinduzierte Strukturveränderungen an beliebigen Proteinen zu bestimmen, und zwar mit einer Messdauer von 10 Sekunden pro Probe, einer Proteinkonzentration von 10 nM und einer Auflösung von +/- 2 Angström. Diese Genauigkeit von +/- 2 Angström konnte bisher noch nicht erreicht werden, und weiterer Forschungsaufwand ist dafür nötig. Die generelle Eignung des Verfahrens konnte bisher an zwei Proteinen getestet werden, und weitere pharmazeutisch relevante Targets müssen zukünftig getestet werden. Dies konnte aufgrund des in Punkt 9 aufgeführten geringen Engagements der Projektpartner nicht final durchgeführt werden. Ursprünglich waren zwei alleinstehende qFRET-Messinstrumente geplant. Für mögliche Tests wurde allerdings ein Aufbau als ausreichend angesehen, wodurch deutliche Einsparungen in den Materialausgaben erreicht wurden.

Bei der Erforschung weiterer Labeling Methoden wurden große Fortschritte erzielt. Diesen kam im Verlauf des Projekts besondere Bedeutung zu, da die spezifische Markierung desselben Proteins mit unterschiedlichen Fluorophoren einen hohen Aufwand für den Anwender darstellt. Daher wurden bereits etablierte, als auch neue Methoden auf ihre Eignung für qFRET getestet. Dabei konnten einige Methoden aufgrund fehlender Selektivität oder Kovalenz ausgeschlossen werden. Aussichtsreiche Ansätze, wie die Umsetzung mittels modifizierter Sortase werden auch nach Projektende aus eigenen Mitteln fortgeführt und sollen künftig für qFRET und andere Messmethoden entwickelt werden.