



IGF-Projekt CELLPULSE:

Zellmanipulation im Hochdurchsatz mittels gepulster Laser

Rainer Wittig¹, Florian Hausladen², Thomas Stegmayer², Petra Kruse¹, Karl Stock²

¹AG Biologie, ²AG Geräteentwicklung, Abteilung Medizinische Systeme,

Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik (ILM) an der Universität Ulm

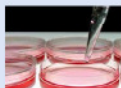
Abstract

Aktuell angewandte Techniken der Zellmanipulation sind durch einen hohen apparativen Aufwand, eine hohe Belastung der Zellen und/oder mangelnde Präzision gekennzeichnet. Eine präzise, schnelle und selektive Manipulation einzelner Zellen in komplexen Populationen bietet großes Potential für Innovation in biotechnologischen und biomedizinischen Anwendungen, beispielsweise in Stammzellforschung, Geweberegeneration, Immuntherapie oder Wirkstoffforschung. CellPulse adressiert dieses Ziel durch eine systematische Optimierung von Piko- / Nanosekunden-Laserpulsen für die photomechanisch vermittelte Poration und Elimination von Zellen. Parameter wie die Lokalisierung des Pulses in Relation zur Zelle, Fleckdurchmesser, Pulsenergie, Pulsenergie / Energiedichte und Pulsdauer werden zunächst im mikroskopischen Aufbau an adhären wachsenden Zellen optimiert und anschließend für die Anwendung in fluidischen Systemen (Organ-on-Chip, Durchflusssysteme) evaluiert.

Primäres Ziel ist die Definition technischer Rahmenbedingungen, welche für eine effiziente optisch vermittelte Zellmanipulation in statischer Anordnung sowie im Durchfluss erforderlich sind. Ein auf Basis dieser Parameter erstellter Demonstrator soll an proprietären Zellproben zweier KMU aus dem Kreis des projektbegleitenden Ausschusses evaluiert werden. Aktuelle Forschungsarbeiten adressieren die Implementierung eines gütegeschalteten frequenzverdoppelten Nd:YVO₂-Lasers mit 690 ps Pulsdauer (Coherent Helios 532-1.5-50) in einen geeigneten mikroskopischen Aufbau sowie die Testung von Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen, die eine schnelle und eindeutige Identifizierung erfolgreich permeabilisierter / eliminierter Zellen erlauben. Nach Abschluss der Etablierungs-/ Optimierungsarbeiten erfolgen erste Dosis-Wirkungstests zur photomechanischen Manipulation an der in der Biotechnologie vielfach verwendeten Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zelllinie.

Hintergrund

Aktuell angewandte Techniken der Zellmanipulation



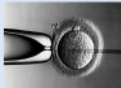
Transfektion

- ⇨ hoher Durchsatz
- ⇨ invasiv
- ⇨ nicht selektiv



Elektroporation

- ⇨ hoher Durchsatz
- ⇨ invasiv
- ⇨ nicht selektiv

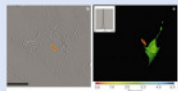


Mikroinjektion

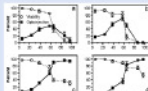
- ⇨ selektiv
- ⇨ invasiv
- ⇨ niedriger Durchsatz

⇨ keine Methode für selektive Zellmanipulation im Hochdurchsatz verfügbar!

Optisch vermittelte Zellmanipulation



Fe-Laser: Tirlapur & König, Nature 418, 290ff (2002)



Nd-Laser: Clark et al., J Biomed Opt 11, 014034 (2006)

⇨ Bsp. photomechanische Manipulation:

- transiente Membranpore f. Substanztransfer
- Präzision, Effizienz und Zellvitalität sind abhängig von Pulsenergie, Pulsdauer und Gesamt-Energieeintrag

Vorteile:

- ⇨ hohe Präzision & Effizienz
- ⇨ Unabhängigkeit von biologischen Eigenschaften der Zielzelle
- ⇨ Unabhängigkeit von physiko-chemischen Eigenschaften einzubringender Substanzen

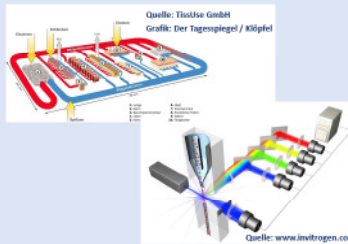
Kritische Punkte für Applikationsentwicklung:

- ⇨ Komplexität und Kosten von Lichtquelle und Optik
- ⇨ Bestrahlungsmodus / -zeit / -intensität (Kompatibilität mit Applikationsbedingungen, z.B. Durchfluss)

Projektziel

Spezifikationen und Demonstrator für standardisierbare Zellpermeabilisierung / -elimination mittels einzelner Laserpulse

- ⇨ gezielte Manipulation einzelner Zellen nach Erfassung diagnostischer Parameter in statischer Anordnung und im Durchfluss
- ⇨ zellschonende Hochdurchsatz-Applikation (~10³ Zellen/s)
- ⇨ Zytometer oder mikrofluidischen Chip-Applikationen („Organ-on-Chip“)



Bsp. Fluidik im Zytometer:

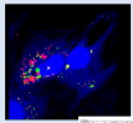
- präzise über wenige 100 µM
- Flussgeschwindigkeit: ca. 1 m/s
- ⇨ Nach „Zielerkennung ist Pulsauflösung im Sub-ms-Bereich erforderlich!“

Systemanforderungen Optik:

- extern ansteuerbarer, gütegeschalteter Nd:YAG-Laser mit Pulsrate im kHz-Bereich
- optimierte Pulscharakteristika

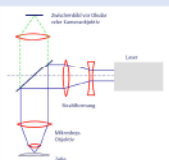
Lösungsweg

Optimierung Zellmodell und Farbstoffe:



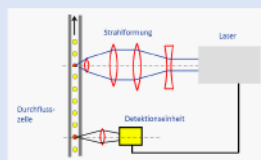
- Mischpopulationen (Fluoreszenzprotein [FP] / FP) adhären wachsender Zellen:
 - ⇨ Färbung mit Vitalfarbstoff (z.B. Neutralrot [NR], Acridinorange [AO]), Zugabe membranimpermeabler Substanz (z.B. DAPI)
 - ⇨ Zielzell-Identifizierung anhand FP-Expression
 - ⇨ Fokussierung und Emission Laserpuls
 - ⇨ Fluoreszenzbasierte Evaluation (Mikroskop oder Durchflusssysteme)
- Elimination: DAPI / Vitalfarbstoff
- Perforation: DAPI / Vitalfarbstoff

Mikroskopischer Aufbau



- Optimierung optischer Parameter für Laserpuls-vermittelte Zellelimination und -perforation in statischer Anordnung
- Transfer und Optimierung im Durchfluss (Pulscharakteristika, Ansteuerung, Fluss)

Durchfluss



Aufbau & Evaluierung Zellmodell & Hardware

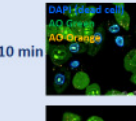
CHO: Vitalfarbstoff Acridinorange

- Ermittlung der erforderlichen Zeitspanne bis zum Verlust des Vitalfarbstoffs nach Ethanol-induzierter Zellabtötung

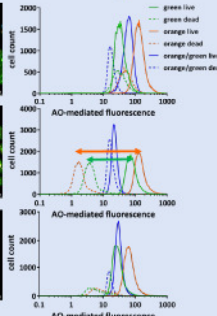
Mikroskopischer Aufbau

- Laser: Coherent Helios 532-1.5-50, λ= 532 nm, gütegeschaltet, Pulsdauer 690 ps, Trigger delay <150 ns, Pulsenergie >30 µJ, Strahldurchmesser 2 mm
- Mikroskop: Zeiss AxioVert 40 CFL (invers), 10 x Objektiv

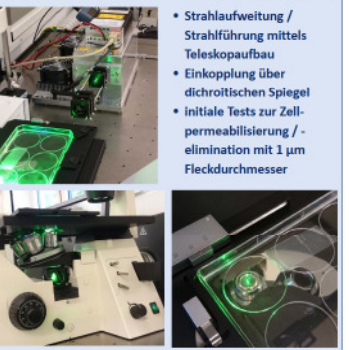
Mikroskopie



Durchflusssysteme



⇨ sichere Diskriminierung lebend/tot 30 min nach Abtötung (Verlust intrazellulärer grüner und oranger Fluoreszenz)



- Strahlaufweitung / Strahlführung mittels Teleskopaufbau
- Einkopplung über dichroitischen Spiegel
- initiale Tests zur Zellpermeabilisierung / -elimination mit 1 µm Fleckdurchmesser

Applikationen

Zellperforation

- Drug delivery: membranpermeable Substanzen
- Transfektion: „schwierige“ Zielzellen
- Tumorvaskulierung: direkter Transfer von Tumorantigenen in antigenpräsentierende Zellen
 - ⇨ hohe Targeting-Effizienz
 - ⇨ MHC-I Präsentation *ab initio*
- ...

Zellelimination

- kontaktloses Verfahren der Zellsortierung für
 - ⇨ Reinigung von Blutzellpopulationen für Transplantationen
 - ⇨ Anreicherung von Zellen für Forschungszwecke
- Zellelimination in Mikrosystemen, z.B. für Wirkstoffforschung und personalisierte Medizin
- ...

Nutzen für KMU

Projektergebnisse

- Definition technischer Rahmenbedingungen für die optisch vermittelte Zellmanipulation
- Demonstrator für vor-Ort-Testungen
- Bereitstellung von Spezifikationen für Komponentenhersteller
- Hilfestellung zur Abschätzung des wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Werts des Verfahrens
-

Zielgruppen

- biotechnologische / biomedizinische Dienstleister
- (OEM) Laserhersteller
- Mikrosystemtechnikbranche
- Hersteller optischer / fluidischer Komponenten
- Durchflusssysteme-Hersteller / Instrumentenhersteller in Life Sciences
-

IGF-Projekt 20134 N der

F.O.M.
Forschungsvereinigung Feinmechanik, Optik und Medizintechnik e.V.

DECHEMA
Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.

Gefördert über die AIF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Gestützt durch:
Bundesministerium für Wirtschaft und Energie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages



Forschungseinrichtungen

- Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik (ILM) an der Universität Ulm

Projektbegleitender Industrieausschuss

- Coherent LaserSyst. GmbH & Co. KG
- FISBA AG (KMU)
- GenID GmbH (KMU)
- Hellma GmbH & Co. KG (KMU)
- InSCREENx GmbH (KMU)
- Labor Dr. Merck & Kollegen (KMU)
- MicroMol GmbH (KMU)
- PANTEC Deutschland GmbH (KMU)
- SPECTARIS, Dt. Industrieverband
- TissUse GmbH (KMU)

Projektlaufzeit 01.04.2018 - 30.09.2020

BMWI-Fördersumme EUR 249.620

Industriemittel EUR 88.500

Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik
an der Universität Ulm
Helmholtzstr. 12, 89081 Ulm, Germany
www.ilm-ilm.de

Ansprechpartner: Dr. Rainer Wittig
E-Mail: rainer.wittig@ilm-ilm.de
Tel.: +49 731 1429-115
Fax: +49 731 1429-442