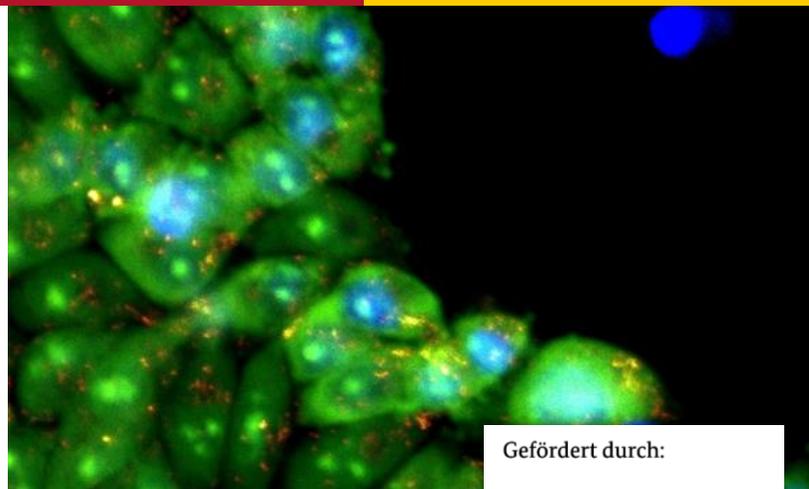
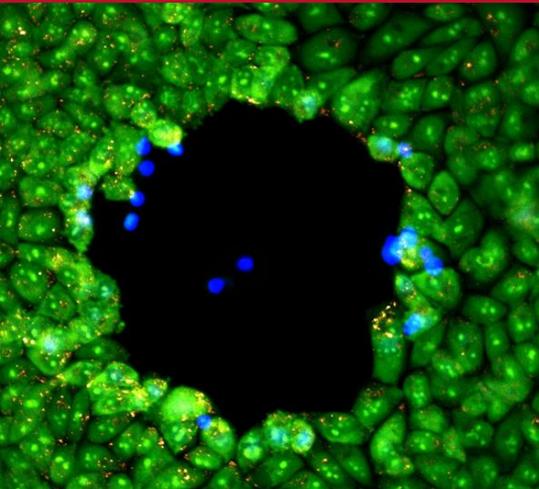


# Industrielle Gemeinschaftsforschung

F.O.M.

018



Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## Projektinformationen

IGF-Nr.:	20134 N
Laufzeit:	04/2018 – 11/2020
Fördersumme:	249.620 EUR
Industrieleistungen:	81.200 EUR

## Forschungseinrichtungen

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

## Projektbegleitender Ausschuss

- Coherent LaserSyst. GmbH & Co. KG
- FISBA AG <sup>KMU</sup>
- GenID GmbH <sup>KMU</sup>
- Hellma GmbH & Co. KG <sup>KMU</sup>
- InSCREENeX GmbH <sup>KMU</sup>
- Labor Dr. Merk & Kollegen <sup>KMU</sup>
- MicroMol GmbH <sup>KMU</sup>
- PANTEC Deutschland GmbH <sup>KMU</sup>
- SPECTARIS e. V. <sup>Verband</sup>
- TissUse GmbH <sup>KMU</sup>

## Durchführung in Kooperation mit

- DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e. V.

- Laseroptische Medizintechnik
- Detektion/Analytik, Diagnostik

## Zellmanipulation im Hochdurchsatz mittels gepulster Laser (CellPulse)

### Die Herausforderung

Eine präzise Zellmanipulation bietet für biomedizinische Applikationen vielfältiges Einsatzpotenzial. Neben der Zellaufreinigung ist vor allem eine Einbringung von Fremdsubstanzen (z. B. Xenobiotika, Nukleinsäuren, Peptide) in das Zytoplasma von Zielzellen von Interesse. Zudem könnte eine zellschonende, hochpräzise und insbesondere standardisierbare Methode der Zellmanipulation grundlegend zu zahlreichen neuartigen Anwendungen in der Biotechnologie und in der klinischen Praxis (hier vor allem in immunologischen Verfahren, Krebs-Immuntherapie und Stammzelltherapien) beitragen. Die gegenwärtig genutzten Techniken der Zellmanipulation beruhen allerdings meist auf mechanischen oder chemischen Prinzipien und sind oft durch einen hohen apparativen Aufwand, keine konstant hohe Effizienz, eine hohe Belastung der Zellen und/oder mangelnde Zellelektivität gekennzeichnet. Ein Verfahren, das bei hohem Durchsatz gleichzeitig hochspezifisch, standardisierbar und Substanzunabhängig für die Zellmanipulation verwendet werden kann, war bislang nicht in greifbarer Nähe.

### Die Innovationsidee

Ziel des IGF-Vorhabens CellPulse war die transiente Permeabilisierung von Säugerzellen im Hochdurchsatz mithilfe von einzelnen Sub-Nanosekunden-Laserpulsen ohne Applikation exogener Absorber.

In einem experimentellen Aufbau am Lichtmikroskop sollten unter Verwendung eines Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers die Parameter Pulsenergie, Energiedichte, Rayleighlänge (Abstand zum Fokus, in dem sich die Strahlquerschnittsfläche verdoppelt) und Fokusslage (in Relation zur Zelle) variiert und hinsichtlich ihrer Effekte auf adhärent (auf Oberflächen) wachsenden Zielzellen bewertet werden. Das Ausmaß der transienten Zellpermeabilisierung unter Erhalt der Zellvitalität als Reaktion auf die Auslösung photophysikalischer Prozesse sollte durch den Substanztransfer in die Zellen bewertet werden.

Basierend auf den optimierten Parametern für die transiente Manipulation immobilisierter Zellen sollte anschließend die flächige Zellpermeabilisierung erforscht werden.

## Projektbegleitende akademische Abschlussarbeiten

[Master] Felicia Hessenberger (2020):

Grundlegende Untersuchungen zur lasergestützten Manipulation von Zellen im Hochdurchsatz

## Das Programm „Industrielle Gemeinschaftsforschung“ (IGF) ...

... fördert Studien zur industriellen Machbarkeit von Innovationsideen und beschleunigt so Technologietrends. Dazu arbeiten Wissenschaft, Industrie und Politik zusammen:

0 Das **BMW**i fördert vorwettbewerbliche, innovationsorientierte Forschung mit dem IGF-Programm.

1 **Industrie** und **Wissenschaftler** entwickeln Innovationsideen und geben Projekimpulse.

2 **AiF-Forschungsvereinigungen**, wie die F.O.M., finden Forschungspartner.

3 **Wissenschaftler** von je 1-3 Forschungseinrichtungen schreiben Förderanträge.

4 **Industrieunternehmen** beraten bei der Entwicklung der Anträge.

5 Die **Forschungsvereinigungen** optimieren die Qualität der Vorhaben und der Anträge und reichen die Anträge ein.

6 Die **Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen** (AiF) lässt die Anträge durch **Experten aus Industrie und Wissenschaft** begutachten.

7 Das **BMW**i finanziert die Forschungskosten bis max. 275/525/750 T EUR.

8 Die **Industrie** teilt sich die Administrationskosten.

9 Die **Wissenschaftler** der Forschungseinrichtungen führen die Forschung durch.

10 Die **Forschungsvereinigungen** stellen mithilfe von je 10-20 Unternehmen projektbegleitender **Industrieausschüsse** mit mindestens 50 % KMU einen regen Technologietransfer bis hinein in die Branchen sicher.

11 Die **Industrie** sorgt durch Bekundung ihrer Interessen für die Praxisrelevanz der Forschung, steuert Industrieexpertise bei und validiert die Ergebnisse.

**Gemeinsam stärken wir die Innovationskraft des Mittelstands und den Fachkräftenachwuchs in Deutschland.**

Für eine ausführlichere Fassung des Abschlussberichts wenden Sie sich bitte an:

## Kontakt / Impressum

Forschungsvereinigung F.O.M.  
Werderscher Markt 15, 10117 Berlin  
030 4140 21-39

info@forschung-fom.de  
www.forschung-fom.de

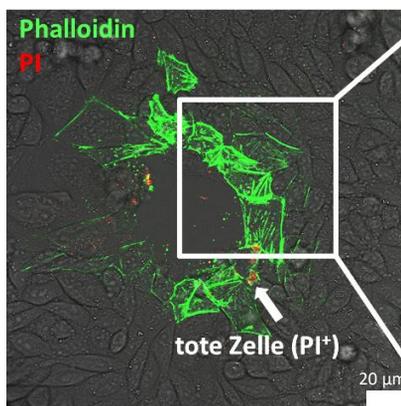


## Die Ergebnisse

Die verwendete Laserstrahlquelle, ein gütegeschalteter Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser (die Pulse werden verkürzt und die Laserleistung während des Pulses erhöht), wurde in ein inverses Fluoreszenzmikroskop eingekoppelt. Die Fokussierung auf die Proben erfolgte mit dem Mikroskopobjektiv, das gleichzeitig zur visuellen Probenbetrachtung verwendet wurde. Entsprechend möglicher Zielanwendungen (Biotechnologie und Medizin) wurden die Säugerzelllinien CHO und THP-1 beschossen und die Parameter Pulsenergie, Energiedichte, Rayleighlänge und Fokusslage variiert. Als Nachweis der transienten Permeabilisierung vitaler Zellen wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin und als Totfarbstoff Propidiumiodid verwendet.

Während stark fokussierte Pulse mit hoher Energiedichte neben der Permeabilisierung einen starken Abtrag und die Elimination von Zellen bewirkten, konnten durch einen weniger stark fokussierten und gegenüber dem Zellrasen axial verschobenen Puls Abtrag und Elimination stark reduziert werden. Die Prozessierungsgeschwindigkeit zeigte sich als kritisch für den Permeabilisierungserfolg. Die Effizienz des Substanztransfers war dagegen weitgehend unempfindlich gegenüber geringfügigen axialen Fokusvariationen.

Eine flächige Zellpermeabilisierung war also reproduzierbar unter weitgehender Vermeidung laserpulsinduziertem Zellausterbens bei Fokussierung in den Zellkulturüberstand möglich. Dies ermöglicht einen zeitlich und räumlich kontrollierten Transport von Substanzen aus dem umgebenden Medium in die Zellen. Dabei ist eine zelllinienspezifische Optimierung der Bestrahlungsparameter empfehlenswert.



## Die Verwertung

### KMU-Nutzen

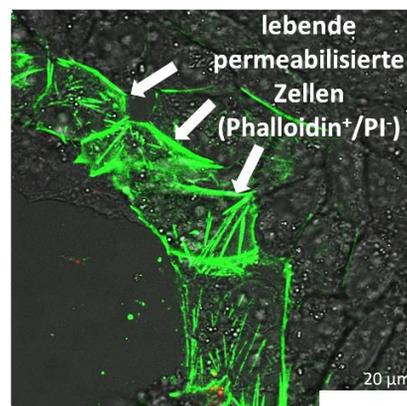
Die entwickelte Technologie kann in den Life Sciences, der in vitro Diagnostik, Wirkstoffforschung und in therapeutischen Verfahren in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden. KMU, mit meist geringen Forschungsetats, können das Verfahren in bestehende Geräte zur Hochdurchsatz-Zellbeobachtung und vergleichbare automatisierte Mikroskope oder High Content Screening Systeme implementieren. Dadurch erfahren die Systeme eine substanzielle Applikationserweiterung und stärken die Wettbewerbsfähigkeit der Unternehmen.

In zukunftsweisenden Technologien wie Organ-on-Chip eröffnet die Technologie die Möglichkeit, Zellen in ihrem Gewebeverband zielgerichtet zu manipulieren. Dadurch werden sowohl in der in vitro Diagnostik als auch in der Wirkstoffforschung neue Verfahren möglich, von denen KMU profitieren können. Applikationsbegleitend ist zu erwarten, dass neue diagnostische Tests für den Erfolg der Zellmanipulationen entwickelt und vertrieben werden können.

Bei der Manipulation von Immunzellen im Rahmen von therapeutischen Verfahren, wie der (Tumor)vakzinierung, könnte das Verfahren für den reproduzierbaren Transfer von Molekülen in das Zytoplasma antigenpräsentierender Zellen ex vivo verwendet werden, was die Standardisierung und damit die Zulassungschancen erheblich verbessern kann.

### Umsetzung

Mit mehreren PA-Unternehmen werden seit Projektende bilaterale Gespräche zu Weiterentwicklungen der Technologie geführt. Gegebenenfalls sollen ZIM-Förderungen beantragt werden.



CHO-Zellen nach Laserpuls-Exposition in Gegenwart der Farbstoffe Phalloidin (grün) und Propidiumiodid (PI, rot; Totfarbstoff): Die Färbung des Actin-Zytoskeletts mit Phalloidin ist ein unmittelbar quantifizierbarer Parameter der Substanzaufnahme lebender Zellen, die transient permeabilisiert wurden.