

## **Projektplan**

### **CellPulse: Zellmanipulation im Hochdurchsatz mittels gepulster Laser (19664 N)**

Derzeit angewendete Techniken zur Manipulation einzelner Zellen in komplexen Zellpopulationen sind oft apparativ aufwändig und durch mangelnde Zellselektivität und/oder hohe Belastung der Zellen geprägt. Eine präzise photonische Zellmanipulation bietet vielfältiges Einsatzpotenzial für biotechnologische und biomedizinische Applikationen. CellPulse zielt darauf ab, Bestrahlungsparameter zu erarbeiten, die eine standardisierte photomechanische Manipulation (Perforation und Elimination) ausgewählter Zellen in komplexen Zellpopulationen durch einzelne Laserpulse ermöglicht. Die Methode soll sowohl für adhären wachsende Zellen, als auch für Zellsuspensionen im Durchfluss etabliert werden. Auf Basis der Forschungsergebnisse wird ein Demonstrator aufgebaut, der unter Nutzung proprietäre Zellmodelle aus dem Kreis der im PA engagierten Unternehmen zunächst für biotechnologische Anwendungen evaluiert werden soll.

### **Forschungsziel**

CellPulse zielt darauf ab, eine photomechanisch vermittelte Manipulation von Zielzellen unter Anwendung einzelner Piko- oder Nanosekunden-Laserpulse zu realisieren. Neben der Zellelimination ist hier vor allem eine selektive und standardisierte Einbringung von Fremdsubstanzen (z.B. Nukleinsäuren, Peptide oder Xenobiotika) in das Zytoplasma von Zielzellen von großem Interesse. Die exakten Anforderungen an den Puls sind für die jeweilige Applikation im Projekt zu definieren, wobei auf Basis der bisher publizierten Studien zu erwarten ist, dass die Elimination einfacher zu realisieren sein wird als die transiente Poration, deren Erfolgsrate wesentlich sensibler gegenüber geringfügigen Abweichungen in Pulsenergie und Pulslage in Relation zur Zelle erscheint. Gelingt es, robuste Parameter zu ermitteln, wäre das in Kombination mit der in Durchflusszytometern bereits etablierten Präzision von Fluidik und Zelldiagnostik eine Grundlage für Hochdurchsatz-Anwendungen in Biotechnologie und Medizin. Insbesondere für neue klinische Verfahren wie beispielsweise die Manipulation von Immun- oder Stammzellen ex vivo für therapeutische Zwecke ist ein hohes Maß an Standardisierbarkeit, welche durch das in CellPulse zu entwickelnde Verfahren erreicht werden soll, ein notwendiges Zulassungskriterium.

### **Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels**

Im geplanten Vorhaben soll zunächst ein experimenteller Aufbau zur laserinduzierten Zellmanipulation am Lichtmikroskop realisiert werden. Dabei werden Pulse eines gütegeschalteten Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers (wahlweise frequenzverdoppelt) über das Objektiv eines inversen Mikroskops in die Zellebene fokussiert. Nach der Etablierung geeigneter Zellmodelle und Auswerteroutinen sollen, unter Variation von Fleckdurchmesser, Pulsenergie, Energiedichte und Fokuslokalisierung (in Relation zur Zelle), das Ausmaß der

Zellpermeabilisierung (unter Erhalt der Zellvitalität) und Zellelimination als Reaktion auf die Auslösung photophysikalischer Prozesse analysiert werden. Die so ermittelten optimalen Prozessparameter für beide Anwendungen sollen anschließend in einem einfachen mikrofluidischen Aufbau auf mobile Zellen umgesetzt und getestet werden, wobei hier analog zur Technologie im Durchflusszytometer eine Detektionseinheit die Zielzelle erkennen und den für die Manipulation erforderlichen Puls mit der erforderlichen räumlichen und zeitlichen Präzision auslösen soll (Abbildung 1).

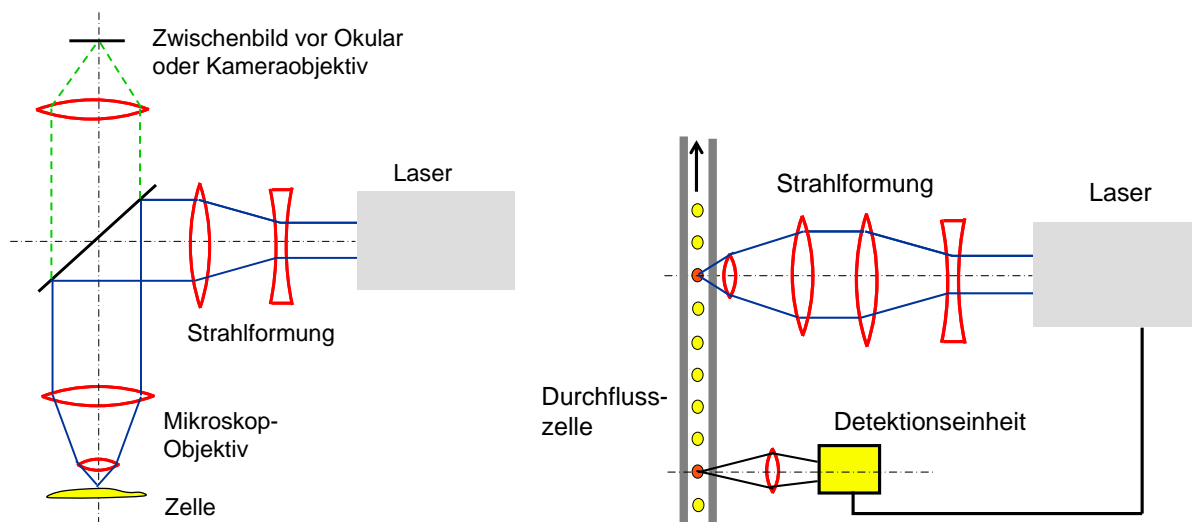


Abbildung 1: Schematische Darstellung der experimentellen Aufbauten zur Laser-vermittelten Zellmanipulation. Linkes Bild: Im **mikroskopischen Aufbau** wird der manipulierende Laser im Anschluss an die Identifizierung der Zielzelle durch das Mikroskop-Objektiv auf die Zelle fokussiert. Rechtes Bild: Im **mikrofluidischen Aufbau** erkennt eine Detektionseinheit aufgrund eines spezifischen Fluoreszenzsignals die mit definierter Geschwindigkeit bewegte Zielzelle (rot) und löst stromabwärts die Emission eines präzise gesteuerten Laserpulses aus. Diese Versuchsanordnung imitiert die Situation in gängigen Durchflusszytometern, wo eine hydrodynamisch fokussierte Zelle in der Flusszelle sukzessive mehrere Laser-Bestrahlungspunkte passiert. Während die Bestrahlung jedoch bis dato nur für „diagnostische“ Zwecke zur Erfassung der Fluoreszenzeigenschaften von Zellen genutzt und eine Sortierung oft durch nachgeschaltete Piezomechanische Prozesse realisiert wird, zielt das vorgeschlagene Projekt darauf ab, Pulseigenschaften für die Realisierung einer laservermittelten Zellmanipulation zu definieren und diese Technologie somit für die Entwicklung „präparativer“ Durchflusszytometer verfügbar zu machen.

### Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas

Im Erfolgsfall bietet das in CellPulse zu entwickelnde Verfahren für die Hersteller von Lasern, optischen Komponenten und Gesamtsystemen (z.B. Durchflusszytometer) Chancen für die Umsetzung der Technologie in innovative Produkte. Des Weiteren können Anwender wie z. B. forschende Unternehmen der Biotechnologie- und Biomedizin-Branche die Technologie zur Optimierung ihrer Produkte und Dienstleistungen sowie zur Entwicklung neuer Applikationen nutzen, oder aber als Dienstleister bei einer Nutzung der Methode in der klinischen Praxis profitieren. Insbesondere bei personalisierten Therapieansätzen wie z.B. Immun- oder Stammzelltherapien würde eine standardisierbare Methode zur Zellmanipulation eine

technologische Lücke schließen und damit signifikant zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens sowie möglicherweise des therapeutischen Erfolgs beitragen.

### **Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der KMU**

Die Ergebnisse sollen der Industrie (insbesondere KMU mit vergleichsweise niedrigen Forschungsetats) die erforderlichen Spezifikationen für die Realisierung der zu etablierenden Verfahren liefern und dadurch eine fundierte Abschätzung ihres wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Werts ermöglichen. Der auf Basis der Projektergebnisse zu realisierende Demonstrator wird zum Ende des Projekts direkt für die Evaluierung der Methode im industriellen Setting eingesetzt. Proprietäre Zellmodelle von KMU des projektbegleitenden Ausschusses werden mit dem Ziel der präzisen Zellmanipulation in mikrofluidischen Organ-on-Chip Modellen sowie der Stammzellmanipulation getestet. Im Erfolgsfall steht den Unternehmen ein Werkzeug zur Verfügung, das bestehende technologische Lücken schließt, unmittelbar die Entwicklung neuer Applikationen ermöglicht und dadurch ein Alleinstellungsmerkmal im Markt generiert. Durch den zu erwartenden Innovationsschub ist mit einer Expansion der bestehenden Unternehmen, mit Neugründungen in dem Sektor und damit einhergehend mit einer Steigerung der Mitarbeiterzahlen und Umsätze zu rechnen.

### **Projektbegleitender Ausschuss**

<b>Unternehmen</b>
Coherent LaserSyst. GmbH & Co. KG
FISBA AG <small>KMU</small>
GenID GmbH <small>KMU</small>
Hellma GmbH & Co. KG <small>KMU</small>
InSCREENeX GmbH <small>KMU</small>
Labor Dr. Merk & Kollegen <small>KMU</small>
MicroMol GmbH <small>KMU</small>
PANTEC Deutschland GmbH <small>KMU</small>
SPECTARIS, Dt. Industrieverband
TissUse GmbH <small>KMU</small>