

Projektplan

GNOME: Aufbau eines Funktionsmusters für die Goldnanopartikelbasierte Lasertransfektion im Hochdurchsatz (18129 N)

Das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen ist essentiell für molekularmedizinische Anwendungen. Mit konventionellen Methoden, wie z. B. der Elektroporation oder der Lipofektion, ist es nicht möglich eine effiziente und zellschonende Transfektion im Hochdurchsatz zu erreichen. Insbesondere die Manipulation von schwer zu transfizierenden Zellen wie Primär- und Stammzellen (z. B. Neuronen) ist momentan mit etablierten Verfahren nicht zufriedenstellend. Speziell im Bereich der Hochdurchsatztestung zur Wirkstofffindung und Diagnostik sowie bei gentherapeutischen Ansätzen besteht hoher Bedarf an neuen und alternativen Transfektionsmethoden. Dabei ist es essentiell, eine hohe Zellzahl ($> 10^6$ Zellen) für Therapien oder eine hohe Probenanzahlen für Hochdurchsatztestungen (screening assays) (≥ 10.000 Proben pro Tag) mit der Methode zu erzielen. Eine Transfektionsmethode sollte die folgenden Anforderungen erfüllen:

1. Hohe Effizienz
2. Keinen Einfluss auf die Zellvitalität
3. Keine Störung des Zellverhaltens
4. Unabhängigkeit vom Zelltyp und des einzuschleusenden Moleküls
5. Selektivität bei gleichzeitig hohem Durchsatz
6. Übertragbarkeit zu klinischen Anwendungen ohne Risiken

Schwer zu transfizierende Primär- und Stammzellen werden in gentherapeutischen Ansätzen als Vakzine genutzt. Eine Transfektion dieser Zellen erfolgt momentan hauptsächlich mittels Elektroporation. Diese besitzt aber im Hinblick auf die Zellvitalität einen deutlichen Nachteil, welcher sich insbesondere bei der Behandlung von Primär und Stammzellen bemerkbar macht, da diese sehr sensibel und nur begrenzt verfügbar sind.

Die GNOME Lasertransfektion erfüllt die Anforderungen an eine hocheffiziente und hochdurchsatzfähige Transfektionsmethode im hohen Maße. Fluoreszenzmarkierte, kurzsträngige Nukleinsäuren lassen sich in Zellen mit einer Effizienz von 88% bei einer Zellvitalität von 90% einzuschleusen. Ebenfalls kann ein Gen-Knockdown von 85% in einer *caninen* Karzinomzelllinie erzielt werden. Auch durch die Verwendung von Morpholinos kann ein effizienter Gen-Knockdown von 66% erreicht werden.

Forschungsziel

Durch eine komplette Automatisierung und Standardisierung der GNOME Lasertransfektion kann die Transfektionsmethode als Hochdurchsatzverfahren im Genlabor oder Klinik eingesetzt werden. Damit ergibt sich eine Alternative in der Hochdurchsatztestung zur momentan angewendeten Techniken wie Lipofektion oder Elektroporation. Ebenfalls können hier Zellzahlen erreicht werden, die eine hohe Effizienz zur Durchführung gentherapeutischer Ansätze zulassen.

Damit ist das Forschungsziel die Fertigstellung und Etablierung eines kompakten Funktionsmusters zur Hochdurchsatztransfektion von eukaryontischen Zellen für den Einsatz in der Pharmakokinetik und der regenerativen Medizin. Des Weiteren ist die Untersuchung der auftretenden Effekte zur Permeabilisierung der Zellmembran essentiell für die Weiterentwicklung der Methode hinsichtlich optimierter Parameter zum Erreichen höherer Effizienzen oder aber auch verbesserter Zellvitalitäten.

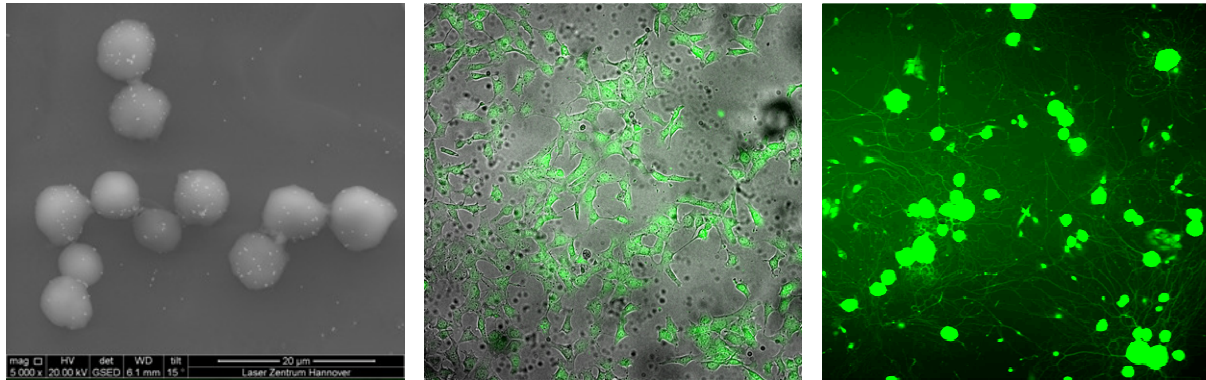


Abb. 1: ESEM Aufnahmen von Jurkat-Zellen beladen mit 200 nm Goldnanopartikeln (li.). GNOME Lasertransfektion von ZMTH3 Zellen (mi.) und von primären Spinalganglion Neuronen aus adulten, zwölf Wochen alten Albinomäusen mit einer Alexa488 markierten siRNA (re.).

Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Eine temporäre Permeabilisierung der Zellmembran erfolgt durch laserinduzierte Effekte an membranadhärierten Goldnanopartikeln. Durch die Nutzung eines schwach fokussierten Laserstrahls bzw. das automatisierte Verfahren von Well plates ein hoher Durchsatz erzielt werden. Dabei wird das Well, welches sich im Laserbereich befindet, mit dem Laser bestrahlt und die sich im Well befindlichen Zellen manipuliert. Im Anschluss wird automatisch das nächste Well durch das Verfahren des Mikroskopisches im Fokusbereich positioniert und anschließend ebenfalls mit dem Laser abgerastert. Diese Technik soll in einem mobilen, eingehausten Funktionsmuster zusammengeführt und mit einer intuitiven Software betrieben werden. Zur Manipulation werden die physikalischen Prinzipien der Wechselwirkung von Nanopartikel und Laserstrahlung genutzt. Die Auswirkungen werden in grundlegenden Experimenten untersucht, um ein Verständnis vom Mechanismus zu erhalten und damit die verwendete Methode zu optimieren.

- Aufbau eines opto-mechanischen Systems
- Entwicklung der Steuerungssoftware
- Grundlegende Untersuchungen
- Erarbeiten von Transfektionsprotokollen
- Manipulation von schwer zu transfizierenden Zellen
- Selektive Manipulation von Zellen
- Erprobung des Funktionsmusters und des Transfektionsprotokolls bei den Anwendern

Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas

Bis zum Jahr 2012 wurden 1902 gentherapeutische Studien durchgeführt. Der zentrale Punkt ist dabei das Einbringen von Nukleinsäuren in schweren bzw. mit kommerziellen Systemen nicht zu transfizierende Zellen wie beispielsweise Neuronen. Die GNOME Lasertransfektion bietet hier eine neue Alternative. Auch wenn die meisten gentherapeutischen Ansätze noch nicht routinemäßig eingesetzt werden, werden Umsätze alleine am US-Markt im dreistelligen Millionenbereich erwirtschaftet.

Die Investitionen für die Hochdurchsatztestung (Produkte und Dienstleistungen) liegen im Milliardenbereich. US-Pharmaunternehmen investieren jährlich bis zu 30 Millionen in Screening-Technologien. Daher ist die Entwicklung neuer Verfahren für den Hochdurchsatz essentiell. Ferner können hierdurch neuen Dienstleistungen angeboten werden. Gerade KMUs können durch spezielle bzw. zielgerichtete Problemlösungen ihre Wettbewerbsfähigkeit steigern.

Das Automatisieren der Methode und die Möglichkeit der Manipulationen von Primär- und Stammzellen bringt ein hohes Potential gentherapeutische Studien voranzutreiben, neue Produkte im Hochdurchsatzbereich zu entwickeln und Erkenntnisse zu gewinnen. Durch eine mögliche Implementierung der GNOME Lasertransfektion in automatisierte Abläufe eröffnen sich neue Möglichkeiten wie z. B. bei der Multiparameteranalyse (*high content screening*), die bisher nicht nutzbar waren.

Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Die erzielten Ergebnisse tragen dazu bei ein marktreifes Produkt zu entwickeln und neue Dienstleistungen im Screening-Bereich zu etablieren. Insbesondere die Herstellung eines Funktionsmusters, welche die Verwendung aller gängigen und kommerziell erhältlichen standardisierten Well-Plattenformate erlaubt, ist der erste Schritt die neue Technologie nach Projektende zeitnah einzusetzen. Ebenfalls führen die erzielten Forschungsergebnisse zur Steigerung des Know-how der beteiligten KMUs.

Projektbegleitender Ausschuss

Unternehmen
Cenix BioScience GmbH
Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN) GmbH
European ScreeningPort GmbH
IBA GmbH
LaVision BioTec GmbH
LLS Rowiak LaserLabSolutions GmbH

