Abschlussbericht
zum
Forschungsvorhaben
03Z2DI1

Strategische Geräteinvestitionen für das Zentrum für Innovationskompetenz *plasmatis*

Ausführende Stelle: **Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald)**
Felix-Hausdorff-Str. 2
17489 Greifswald

Projektleiter: **Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann**

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03Z2DI1 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhalt:

Zusammenfassung

I Kurze Darstellung zu

I.1 Aufgabenstellung

I.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

II Eingehende Darstellung zu

II.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses

II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Zusammenfassung

Mit „*plasmatis* – Plasma plus Zelle“ wurde in Greifswald ein Zentrum für Innovationskompetenz etabliert, in dem wissenschaftliche Kompetenzen aus Plasmaforschung und Lebenswissenschaften kombiniert werden, um interdisziplinäre Grundlagenforschung zu Wechselwirkungen physikalischer Plasmen mit lebenden Zellen und Geweben auf höchstem internationalen Niveau zu betreiben. Die Strategie von *plasmatis* wird durch zwei Nachwuchsforschergruppen in zwei Forschungsfeldern umgesetzt, den Nachwuchsforschergruppen „Zelluläre Effekte“ sowie „Extrazelluläre Effekte“.

Die Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ untersucht die Beeinflussung des Wachstums und der Vitalität von unterschiedlichen Zellen unter Anwendung verschiedener Plasmaquellen. Die Nachwuchsforschergruppe „Extrazelluläre Effekte“ befasst sich mit der Wirkung von Plasmen auf den extrazellulären (Flüssigkeits-)raum und ist zusätzlich zur plasmaphysikalischen Kompetenz biochemisch-analytisch orientiert. Die für eine effektive und intensive Forschungstätigkeit auf höchstem Niveau notwendige Kombination plasmadiagnostischer mit zellbiologischen und labordiagnostischen Analysenmethoden ist gewährleistet. Für die Nachwuchsforschergruppen Zelluläre Effekte“ und „Extrazelluläre Effekte“ wurden im Rahmen der „Strategischen Geräteinvestitionen“ folgende Anschaffungen realisiert:

1. Konfokales Laserscanning-Mikroskop
2. Rasterkraftmikroskop
3. Multifunktions-Plattenreader
4. Durchflußzytometer
5. Molekularbiologischer Arbeitsplatz
6. Chromatograph und Massenspektrometer zur Proteomanalyse (= MS-System zur Identifizierung von Proteinen)
7. xCELLigence – Zellanalysegerät
8. FT-IR Spektrometer inkl. Mikroskop
9. LC-MS-System (zur Quantifizierung von Proteinen)
10. Echelle-Spektrenanalysator
11. RAMAN Spektrometer mit konfokalem Mikroskop
12. Streak-Kamerasystem

Die Gesamtinvestitionssumme betrug 2.502.047,32 EUR.

Die strategische Geräteinvestition wurde entsprechend dem Förderantrag und den zugestimmten Umwidmungen durchgeführt.
Umgewidmet wurde das Lasermikrotom LMT-F 14-Navigate in einen Chromatographen und ein Massenspektrometer zur Proteomanalyse. Zudem wurden die ursprünglich beantragten Geräte: Netzwerkanalysator, ESR-Spektrometer, Kamerasystem sensicam em 680KX und Kamerasystem hsf-pro 4-Kanal in ein FT-IR Spektrometer inkl. Mikroskop und in ein RAMAN Spektrometer mit konfokalem Mikroskop umgewidmet.
Alle Geräte wurden gemäß der VOL/A ausgeschrieben.
Die Interdisziplinarität des Forschungsvorhabens und die zur Verfügung stehenden Geräte und Methoden des ZIK *plasmatis* machen dieses zu einem der weltweit bedeutendsten Zentren im Bereich der Plasmamedizin / Plasmabiologie. Somit wurde das Ziel des Vorhabens „Strategische Geräteinvestition“ vollständig erreicht.

I.1 Aufgabenstellung

Die Erforschung der Wechselwirkungen von kalten physikalischen Plasmen mit lebenden Zellen und Geweben ist mit dem Zentrum für Innovationskompetenz „*plasmatis* – Plasma plus Zelle“ in Greifswald etabliert. Das Zentrum nutzt den Wissenschaftsstandort Greifswald mit seinen vorhandenen wissenschaftlichen Kompetenzen in den Bereichen Plasmaforschung und Lebenswissenschaften für eine interdisziplinäre wissenschaftliche Zusammenarbeit. *plasmatis* betreibt in zwei Nachwuchsforschergruppen Grundlagenforschung mit dem Ziel, Wirkungsmechanismen und Zusammenhänge der Wechselwirkung physikalischer Plasmen mit lebender Materie auf zellbiologischer Grundlage zu verstehen. Es werden vor allem nichtletale, gezielt stimulierende Wirkungen von kalten physikalischen Plasmen auf lebende Zellen untersucht. In dem Forschungskonzept dient die Wundheilung sowohl wegen des modellhaften Charakters der dabei ablaufenden Prozesse als auch wegen der immensen gesundheitspolitischen Relevanz als Beispiel für die Wechselwirkung von Plasmen mit biologischer Materie.
Durch die detaillierte Untersuchung von Wechselwirkungen der Plasmaspezies mit einzelnen Zellbestandteilen sowie Komponenten in der physiologischen Umgebung der Zellen werden eine Kontrolle und eine gezielte Steuerung biologischer Effekte der Plasmabehandlung und deren kontrollierte therapeutische Nutzung möglich. Die Grundlagenforschung von *plasmatis* liefert mittel- und langfristig wichtige Impulse – nicht nur für neue Therapiemöglichkeiten im Wundmanagement, sondern auch für eine Vielzahl anderer biologischer und medizinischer Anwendungen.

Derzeit gibt es nur sehr begrenzte Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von kalten physikalischen Plasmen mit lebenden Zellen. Die Nachwuchsforschergruppe „Extrazelluläre Effekte“ untersucht die Erzeugung und den Transport der reaktiven und energetischen Plasmaspezies, die zu den Wirkungen einer Plasmabehandlung beitragen. Fokus hierbei liegt auf den von Plasmaquellen erzeugten reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies (RNS/ROS) und dem sich gegenseitig verstärkenden Zusammenwirken dieser Spezies mit plasmagenerierten Feldern und den emittierten Photonen. Solche reaktiven Spezies wie sie der menschliche Körper im Übrigen auch selbst erzeugt, haben eine biologische Signalfunktion. Eine Steuerung der Zusammensetzung reaktiver Plasmakomponenten bildet die Grundlage für das Forschungskonzept der Forschergruppe „Extrazelluläre Effekte“. Ein detaillierter Einblick in die Plasmawirkung soll durch quantitative orts- und zeitaufgelöste Diagnostik gewonnen werden: Es werden Dichten und Verteilungen relevanter reaktiver Komponenten sowohl im Plasma als auch in der Zellumgebung bestimmt und ihre synergetischen Effekte untersucht.

Der innovative Ansatz der Nachwuchsforschergruppe „Extrazelluläre Effekte“ ist es,

- optische Plasmadiagnostik auf höchstem Stand der Wissenschaft sowohl auf das Plasma als auch auf Flüssigkeiten (physiologische Flüssigkeiten und Zellumgebung, Pufferlösungen) anzuwenden. So kann umfassend Einblick in die zugrunde liegenden Prozesse bei der Plasmabehandlung von biologischem Gewebe gewonnen werden. Ein einzigartiger Vorteil des Projekts ist, dass diese Untersuchungen in ein und derselben Gruppe von Wissenschaftlern interdisziplinär durchgeführt werden.
- das Plasma kontrolliert zu beeinflussen, um mittels einer gezielten Zusammensetzung der reaktiven Komponenten die chemische Zusammensetzung des Flüssigkeits-/Zell-Umfelds maßgeschneidert verändern zu können. Die externe Kontrolle über die Komponentenzusammensetzung wird durch die Auswertung und Anwendung der Ergebnisse von Plasmadiagnostik und numerischen Simulationen erreicht. Ziel ist es, die jeweiligen reaktiven Komponenten separat zu kontrollieren.
- die für die Wundbehandlung wesentlichen Prozesse abzuleiten aus den Ergebnissen der Plasma- und Zellumgebungsdiagnostik in Verbindung mit der Untersuchung der Behandlungseffekte auf physiologische Flüssigkeiten und Zellumgebung und schließlich auf die Zelle:

Die Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ soll durch experimentelle Grundlagenforschung Antworten liefern, inwiefern eukaryotische Zellen mithilfe von Plasma stimuliert werden können. Basierend auf dem Modell der Heilung chronischer Wunden wird der Einfluss kalten Plasmas auf die Zellwanderung, die Adhäsion, die Sekretion sowie auf das Zellwachstum bzw. den Zelltod untersucht.

Während der Wundheilung kommt es mehrfach zu Umstrukturierungen der Matrix, was jeweils die In-/ Aktivierung unterschiedlicher Gene notwendig macht. Auch die Zellmigration erfordert das gezielte An- und Ausschalten unterschiedlicher Gene, um beispielsweise auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können (z.B. das Erreichen der Wundstelle). Um diese Genaktivierungen bzw. das Stilllegen verschiedener Gene zu detektieren, sind Methoden zur Aufarbeitung des Erbmaterials, sowie Anlagen zur Analyse der Genaktivitäten (quantitative Real-Time-PCR) unabkömmlich.

Die Genaktivierungen bzw. Inaktivierungen haben zur Folge, dass die Zellen in ihrer Aktivität verändert werden. Dies betrifft besonders den Bereich der Signaltransduktion – also wie Zellen auf externe (und interne) Reize reagieren. Die Untersuchung dieser Signalkaskaden - die Wechselwirkung der einzelnen daran beteiligten Moleküle – und wie dieses Netzwerk mithilfe von verschiedenen Plasmakomponenten beeinflusst werden kann, steht im Zentrum der Untersuchungen der Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“. Hierfür wurden alle notwendigen Geräte und Apparaturen angeschafft, um detailliert die Genom- (RT-PCR, DNA-Mikroarray) sowie Proteomveränderungen (Durchflußzytometer, HPLC-MS, 2D-Gelelktrophorese, etc.) detektieren und anschließend analysieren zu können.

Anhand dieser Schlüsselergebnisse aus biologischer und physikalischer Diagnostik wird es möglich sein, Experimente zur Zellmigration, Zelladhäsion bzw. zur Apoptose zu planen und die Zellfunktionen mithilfe einer maßgeschneiderten Zusammensetzung der von den Plasmaquellen erzeugten reaktiven Komponenten gezielt zu beeinflussen.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Voraussetzung für die Auszahlung der Mittel und somit der Realisierung des Vorhabens war die Fertigstellung des Erweiterungsneubaus mit den Labor- und Büroräumen für das ZIK *plasmatis*. In diesem Gebäude wurden speziell für diese Art von Grundlagenforschung konzipierte S2-Labore und Büroräume geschaffen, mit denen die Voraussetzungen für exzellente Forschung gelegt wurden. Insgesamt nutzt das Team etwa 150 m² Bürofläche und 220 m² Laborfläche, die im August 2010 bezogen wurden, und anschließend mit den entsprechenden High-end Geräten und Methoden ausgestattet wurden.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Komplexität der möglichen Wechselwirkungen bei der Anwendung von Plasmen auf Zell- und Gewebeverbände und die darüber hinaus im Zusammenhang mit der Behandlung schlecht heilender Wunden erforderliche Selektivität zwischen letaler (antimikrobieller) und nichtletaler Aktivität (Geweberegeneration) erfordert eine differenzierte Herangehensweise. Aus der sich damit ergebenden inhaltlichen Vielfalt der Thematik resultiert ein breites Spektrum von Forschungsaufgaben. Das Zentrum für Innovationskompetenz „plasmatis – Plasma plus Zelle“ kombiniert die Expertise in physikalischen Plasmen mit der biomedizinischen Expertise in Zellumgebung und der lebenden Zelle.

Die beantragten strategischen Geräteinvestitionen wurden auf die initiale Phase der Arbeitspläne für die Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ und „Extrazelluläre Effekte“ abgestimmt. Ausgerichtet auf das Methodenspektrum der Gruppen wurden die zu beschaffenden Geräte und deren Spezifikationen in dieser Projektphase festgelegt. Die benötigten Geräte wurden zu Beginn der Arbeiten ausgeschrieben und verschiedene Angebote wurden miteinander verglichen, so dass mit dem Einzug in die neuen Labore, die ersten Geräte geliefert bzw. bestellt werden konnten, wodurch ein schneller Arbeitsbeginn sichergestellt wurde. So konnten die notwendigen Standards festgelegt und früh erste Ergebnisse erzielt werden.
In Kombination mit den Geräteinvestitionen der Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ und „Extrazelluläre Effekte“ gelang die Ausstattung von hochmodernen Laboren mit einem weltweit einzigartigen Methodenspektrum. Dies fand bereits hohe internationale Anerkennung beim im Rahmen der „Internationalen Conference for Plasma Medicin 3“ in Greifswald veranstalteten Workshop „Influence of plasma treatment on cell contacts“.

Die Nachwuchsforschergruppe „Extrazelluläre Effekte“ untersucht die Erzeugung reaktiver Komponenten mit den für die Plasmamedizin geeigneten Plasmaquellen, sowie ihren Transport in die Extrazelluläre Umgebung bis hin zur Zelle.
Schlüssel für eine effektive Wundbehandlung ist die gezielte Plasmabehandlung der Zellumgebung, da diese als Interface zwischen physikalischem Plasma und lebender Zelle fungiert. Es ist daher wichtig, im Teilprojekt „Extrazelluläre Effekte“ die Sekundäreffekte der Plasmaeinwirkung grundlegend zu untersuchen: Dafür wird zunächst die flüssige Zellumgebung behandelt und untersucht. Durch die Korrelation der Ergebnisse mit den Messungen der Dichteverteilungen der reaktiven Spezies in der Flüssigkeit können dann die relevanten Prozesse identifiziert werden. Für die Analyse der plasmainduzierten

Veränderungen sind die Bestimmung der Ortsverteilung und des zeitlichen Verhaltens der reaktiven Komponenten (z.B. OH, NO) essentiell. Durch die molekülbandenspektroskopischen Systeme FTIR und Raman Spektroskopie lassen sich diese Spezies und ihre Wirkung auf biologische Materie untersuchen in gasförmiger fester und flüssiger Form. Dies lässt sich mit den angeschlossenen Mikroskopen auch ortsaufgelöst durchführen.
Für die Plasmadiagnostik ermöglichen die angeschafften Geräte die Detektion angeregter Spezies über einen extrem breiten Spektralbereich mit höchster räumlicher, spektraler oder zeitlicher Auflösung.

Die Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ untersucht die Beeinflussung der Zellwanderung, des Wachstums und der Vitalität von unterschiedlichen Zellen unter Anwendung verschiedener Plasmaquellen.
Speziell die Wanderung verschiedener Zellarten spielt eine zentrale Rolle in der Wundheilung. Kurz nach dem Wundverschluss durch das Blutgerinnsel wandern die ersten Immunzellen ein, um mögliche Pathogene und Mikroorganismen zu eliminieren. Bereits während dieser Immunologischen Phase kommt es auch zum Einwandern von Fibroblasten. Diese Fibroblasten wiederum produzieren die extrazelluläre Matrix (ECM = Bindegewebe), welche einerseits die Wunde weiter verschließt, andererseits die Grundlage für die Wanderung weiterer Zellen darstellt. Um das Wanderungsverhalten all dieser unterschiedlichen Zelltypen analysieren zu können, müssen die Aktivitäten der Zellen per Zeitraffer-Videomikroskopie aufgezeichnet, digitalisiert und anschließend computergestützt ausgewertet werden. Da hierbei speziell der Einfluss physikalischer Plasmen auf lebende Zellen untersucht wird, ist es von Vorteil, wenn auch sehr kurzfristige Effekte aufgezeichnet werden können.
Hierfür bietet sich die Digitalmikroskopie in Verbindung mit der Aufnahme in variablen Zeitskalen und Software zur Bewegungsanalyse an (Zeitraffer für Zellwanderung – Hochgeschwindigkeitsaufnahmen für Plasmaeffekte).
Um strukturelle Unterschiede der von den Fibroblasten sezernierten Matrix zu untersuchen, werden hochauflösende Mikroskope wie das Rasterkraftmikroskop und das Konfokale Laserscanning-Mikroskop eingesetzt.

Alle Vorbereitungen für die Migrationsanalyse, Zelladhäsion, Untersuchungen zur Apoptose, wie auch zur Genanalyse müssen unter definierten, kontrolliert sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Für diese Arbeiten sind die unter dem Punkt „Zellbiologischer Arbeitsplatz“ zusammengefassten Geräte und Materialen unbedingt notwendig.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zum Zeitpunkt der Antragstellung gab es nur sehr begrenzte Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von kalten physikalischen Plasmen und lebenden Zellen. Konzeptionell konnte an die folgenden Ergebnisse angeknüpft werden, die den Stand der Forschung zum Zeitpunkt der Antragstellung im Wesentlichen zusammenfassen (die nachfolgenden Absätze des Kapitels I.4 sind dem Antrag zur Strategischen Geräteinvestition entnommen):

Seit Ende der 1960er Jahre wird die Anwendung von Plasma zur mikrobiologischen Dekontamination/Sterilisation untersucht [Moisan et al. 2001]. Sowohl mit Atmosphären- als auch mit Niederdruck-Plasmaquellen wurden signifikante Wirkungen gegen ein breites Erregerspektrum bei Behandlungszeiten von einigen Sekunden bis Minuten nachgewiesen [Laroussi 2005, Laroussi et al. 2005]. In diesem Zusammenhang gibt es auch erste Untersuchungen und Hypothesen zu diesen antimikrobiellen Effekten zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen. Generell wird der Behandlungserfolg durch die Zusammensetzung und die Betriebsparameter des Plasmas, aber auch durch die Wechselwirkung mit dem Sterilisiergut bestimmt, wobei die antimikrobielle Wirkung einzelner Komponenten oder evtl. auftretender synergistischer Effekte auch von der spezifischen Resistenz der Erreger abhängt [Lerouge et al. 2001, Laroussi 2002, Gaunt et al. 2006, Brandenburg et al. 2007, Boudam et al. 2007].

Im Falle der mikrobiologischen Dekontamination/Sterilisation erfolgt der medizinische Plasmaeinsatz indirekt, d.h. zur Vorbereitung und Optimierung von Produkten zur medizinischen Anwendung. Demgegenüber befasst sich das gegenwärtig international neu entstehende Forschungsgebiet der Plasmamedizin mit direkten therapeutischen Anwendungen von physikalischen Plasmen, d.h. mit Plasmaanwendungen unmittelbar am oder im menschlichen Körper. Von derartigen Anwendungen werden bedeutende Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Praxis erwartet [Stoffels et al. 2006, Satawa 2007, Kramer et al. 2008].

Die einzige bisher praktizierte therapeutische Plasmaanwendung ist die Argon-Plasma-Koagulation zur Abtragung bzw. Verödung von Gewebe und zur Stillung starker Blutungen. Dabei werden im Wesentlichen thermische Plasmaeffekte in biologischem Gewebe ausgenutzt [Raiser u. Zenker 2006, Zenker 2008]. Aus ersten experimentellen Untersuchungen ergeben sich Hinweise auf Möglichkeiten der Beeinflussung apoptotischer Prozesse in Zellen, die u.a. für die Krebsbehandlung genutzt werden könnten [Stoffels et al. 2004, Laroussi u. Lu 2005, Stoffels et al. 2006, Fridman et al. 2007, Stoffels 2007].

Besonders interessant für therapeutische Anwendungen sind sub-letale bzw. nicht-letale Plasmaeffekte, d.h. Beeinflussungen von Zellen, die nicht zu deren Untergang führen. So konnte in *in-vitro*-Zellkulturen gezeigt werden, dass die Adhärenz von Zellen durch Plasmabehandlung reversibel beeinflusst werden kann, ohne nekrotische Prozesse zu induzieren [Stoffels et al. 2003, Kieft et al. 2004, Stoffels et al. 2004 a u. b, Kieft et al. 2005, Yonson et al. 2005, Stoffels et al. 2006, Stoffels 2007]. Solche Effekte lassen sich beispielsweise für eine selektive *in-vivo*-Antiseptik ausnutzen, d.h. die Inaktivierung von Infektionserregern an bzw. auf lebendem Gewebe ohne die Körperzellen nachhaltig zu schädigen. Als praktische therapeutische Anwendung und somit als erstes Anwendungsfeld für die Plasmamedizin stand die Wundheilung, insbesondere die Wundantiseptik im Mittelpunkt des Interesses. Eine Vorreiterrolle spielt hier bisher die Arbeitsgruppe um Alexander Fridman an der Drexel University in Philadelphia, USA, die bereits von ersten erfolgreichen Plasmaanwendungen mit Wundheilungserfolgen berichten [Fridman et al. 2008; siehe auch http://plasma.mem.drexel.edu/icpm-1/). Dabei handelt es sich bisher jedoch nur um Einzelfallberichte von Versuchen an ausgewählten Patienten. Normale therapeutische Behandlungen wurde noch nicht durchgeführt.

Eine erste klinische Studie (Phase II) zur Wundantiseptik mit einen mikrowellenangeregten Plasmabrenner (Microwave Plasma Torch; ADTEC Plasma Technology Co. Ltd, Hiroshima, Japan) wurde von Prof. Dr. med. Wilhelm Stolz in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin am Klinikum Schwabing gemeinsam mit die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Gregor Morfill vom Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, München-Garching durchgeführt. Ziel war die Behandlung bakterieller Superinfektionen in chronischen Wunden. Es wurden 888 Einzelbehandlungen an 105 Patienten ausgewertet, die durchschnittliche Behandlungsdauer betrug 8,5 Tage und variierte zwischen einem und 64 Tagen. Die Plasmabehandlung wurde zusätzlich zur konventionellen Wundtherapie durchgeführt und ergab Hinweise auf eine Verstärkung der antiseptischen Effektivität durch das Plasma [Stolz et al. 2007].

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Bei der Beantragung und Realisierung des Forschungsvorhabens „Zentrum für Innovationskompetenz plasmatis: Strategische Geräteinvestitionen für das ZIK plasmatis „Plasma plus Zelle“ erfolgte eine intensive Zusammenarbeit mit der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, speziell mit dem Institut für Pharmazie/ FB Pharmazeutische Biologie, dem Institut für Mikrobiologie, sowie dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin .

II.1 Eingehende Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

Mit Hilfe der Strategischen Geräteinvestition konnte ein umfangreiches und in dieser Kombination einzigartiges Methodenspektrum für die Forschungsarbeit im ZIK plasmatis aufgebaut werden. Sowohl die Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ als auch die Gruppe „Extrazelluläre Effekte“ haben Geräte über dieses Vorhaben beschafft, die in Ihrer Methodik eng aufeinander abgestimmt sind. Es werden weltweit einzigartige Ergebnisse erwartet, die ihm Rahmen der Arbeit innerhalb der Vorhaben „Zelluläre Effekte“ und „Extrazelluläre Effekte“ des ZIK *plasmatis* publiziert werden. Erste Ergebnisse wurden bereits auf folgenden Konferenzen im Rahmen von Posterpräsentationen und Vorträgen veröffentlicht.

- 3rd International Conference on Plasma Medicine, Greifswald, 19. bis 24. September 2010
  VORTRAG: “Characterization of atmospheric pressure plasmas and their relevance for plasma medicine”, S. Reuter
  POSTER: “Reaction Chemistry in the Effluent of an Atmospheric Pressure Plasma Jet”, S. Reuter, K. Niemi, V. Schulz-von der Gathen, T. Gans, K.-D. Weltmann
  VORTRAG: “Non-thermal atmospheric-pressure plasma as new strategy in wound healing: interaction of atmospheric pressure plasma in HaCaT human keratinocytes”, Wende, K.; Blackert, S.; Haertel, B.; Holtz, S.; Harms, M.; von Woedtke, Th.; Lindequist, U.:
  POSTER: “HaCaT proliferation and DNA interference of non thermal atmospheric pressure plasma under different culture conditions”, M. Harms, S. Blackert, B. Haertel, M. Hähnel, Th. von Woedtke, U. Lindequist, K. Wende:
  POSTER: “DNA interaction of atmospheric pressure plasma in HaCaT human keratinocytes”, Wende, K.; Blackert, S.; Haertel, B.; Holtz, S.; Harms, M.; von Woedtke, Th.; Lindequist, U.:
  POSTER: “Has non-thermal atmospheric pressure plasma an effect on the pharmaceutical quality of herbal drugs?”, Wende, K.; Banaschik, R.; Brandenburg, R.; v. Woedtke, Th.; Wurster, M.; Lindequist, U.:
- 63rd Gaseous Electronics Conference, Paris, 4. bis 8.10.2010
  VORTRAG: Diagnostics on atmospheric pressure plasmas and their relevance for plasma medicine, S. Reuter, K. Wende, K. Masur, S. Blackert, M. Harms, S. Holtz
  POSTER: Diagnostics on atmospheric pressure plasmas and their relevance for plasma medicine, S. Reuter, K. Wende, K. Masur, S. Blackert, M. Harms, S. Holtz
- Seminarvortrag zur Plasmadiagnostik Ruhr-Universität Bochum, 11.11.2010
  EINGELADENER VORTRAG: „The Research Cluster for Plasma Medicine in Northern Germany”, S. Reuter

- Treffen Norddeutscher Biophysiker, 21.01.2011
  VORTRAG: “Forces between asymmetric bilayers mimicking the outer membrane of Gram-negative bacteria - Surface Force Apparatus studies”, Dr. Malte Hammer
- „Extracellular Matrix and Cardiovascular Remodeling“ in Lake Tahoe (Kalifornien), 23.01. bis 28.01.2011
  POSTER: “Impact of non thermal atmospheric pressure plasma on human HaCaT karyokinesis and DNA alterations”, Wende, K.; Blackert, S; Holtz, S.; Harms, M.;, von Woedtke, Th.; Lindequist, U.; Masur, K.
- „Genomic instability and repair“ in Keystone (Colorado), 30.01. bis zum 04.02.11
  POSTER: “Impact of non thermal atmospheric pressure plasma on human HaCaT karyokinesis and DNA alterations”, Wende, K.; Blackert, S; Holtz, S.; Harms, M.;, von Woedtke, Th.; Lindequist, U.; Masur, K.
- 15. Plasmatechnologietagung PT15 Stuttgart, 01.03.2011
  POSTER: „Formierung Reaktiver Sauerstoffspezies in Atmosphärendruckplasmen und Ihre Wirkung auf DNA“, Reuter, S.; Wende, K.; Blackert, S.; Harms, M.; Masur, K.; Schulz-von der Gathen, V.; v.Woedtke, T.; Weltmann, K.D.
- Arbeitsguppentreffen MPI-Garching/ZIK plasmatis, 03.03.2011
  EINGELADENER VORTRAG: „Grundlagenforschung der Plasmamedizin aus physikalischer und zellbiologischer Sicht im ZIK plasmatis in Greifswald”, Masur, K.; Reuter,S.
  → Kooperation
- DPG-Frühjahrstagung Plasmaphysik, Kiel, 03.03.2011
  VORTRAG: “Innovative plasma generation in flexible biopsy channels for inner tube decontamination“, Winter, J.; Polak, M.; Schnabel, U.; Ehlbeck, J.; Weltmann, K.-D.; Schneider, R.
- DPG-Frühjahrstagung Plasmaphysik, Kiel, 03.03.2011
  EINGELADENER VORTRAG: „Effects of reactive oxygen species (ROS) from cold plasmas on cellular activities”, Masur, K.; Wende, K.; Blackert, S.; Harms, M.; Reuter, S.; Barton, A.; Bundscherer, L.; Hasse, S.; Weltmann K.-D.
- IX. Workshop on Frontiers in Low Temperature Plasma Diagnostiks, Zinnowitz, 09.05.2011
  VORTRAG: “Detection of Reactive Oxygen Species in Atmospheric Pressure Plasmajets and their Role in Plasma Liquid Interaction”, S. Reuter, J. Winter, M. Hammer, D. Schroeder, N. Knake, V. Schulz-v.d.Gathen, K.-D. Weltmann
  POSTER: “Detection of Reactive Oxygen Species in Atmospheric Pressure Plasmajets and their Role in Plasma Liquid Interaction”, S. Reuter, J. Winter, M. Hammer, D. Schroeder, N. Knake, V. Schulz-v.d.Gathen, K.-D. Weltmann
- The Infected Wound (DGKH), Berlin, 04.06.2011
  EINGELADENER VORTRAG: “Basic research for wound treatment by TTP within the Center for Innovation Competence „plasmatis”, Masur, K.; Reuter, S.:
- “38th International Conference on Plasma Science - ICOPS”, Chicago, 26. - 30. 06.2011

VORTRAG: „Application Of A Bifilar Helix Discharge In Endoscope Biopsy Channels for Plasma Decontamination And Biomedical Aspects", J. Winter, M. Polak, J. Ehlbeck, S. Hasse, U. Schnabel, S. Reuter, K. Masur, R. Schneider and K.-D. Weltmann

POSTER: "A bacterial model to characterize the antimicrobial effects of low temperature plasma", Winter, T.; Winter, J.; Polak, M.; Mäder, U.; Bernhardt, J.; Sietmann, R.; Ehlbeck, J.; Weltmann, K.-D.; Hecker, M.; Kusch, H.:

- "International Symposium on Plasma Chemistry - ISPC", Philadelphia, 24. - 29.07.2011
  VORTRAG: „Formation of Reactive Oxygen Species (ROS) and Their Effect on DNA", Reuter, S.; Wende, K.; Blackert, S.; Harms, M.; Masur, K.; Schulz-von der Gathen, V.; Woedtke, T.v.; Weltmann, K.-D.

Folgende Geräteinvestitionen wurden im Einzelnen realisiert:

Konfokales Laserscanning-Mikroskop

Die Mikroskopie bietet seit langer Zeit die Möglichkeit, kleine Veränderungen an pro- und eukaryotischen Zellen beobachten zu können. Die Beobachtung von lebenden Zellen in den dazu notwenigen Kulturgefäßen ist durch den Einsatz von Umkehrmikroskopen möglich. Um Aussagen über den Zustand oder die Leistung der beobachteten Zellen machen zu können, ist eine Anfärbung verschiedener Strukturen (etwa Zellorganellen, Zellkerne, Zytoskelett) oder Prozesse (Zellteilung, Membranveränderungen) notwendig. Um diese Objekte adäquat beobachten zu können und Aussagen über räumliche Zusammenhänge machen zu können, muss das Mikroskop eine sehr hohe Auflösung gekoppelt mit einer schnellen Dokumentationsmöglichkeit bieten. Diese Anforderungen werden von konfokalen Mikroskopen erfüllt. Hierbei wird das Licht, das der Beobachtung des Objektes dient, in dieses hinein fokussiert und das ausfallende Licht erneut über Schlitze und andere optische oder elektro-optische Mechanismen derart gefiltert, dass nur ein kleiner Ausschnitt aus dem Objekt erfasst wird – dieser aber mit sehr hoher Schärfe. Das gesamte Objekt wird abgescannt (daher oft auch als Scanning-Mikroskope bezeichnet) und am Computer zusammengesetzt. Dadurch kann jede Ebene des Objektes zugleich scharf dargestellt werden. Klassische Mikroskope sind demgegenüber nur in der Lage, eine Ebene des Objektes scharf darzustellen. Alle anderen Ebenen verbleiben unscharf und tragen zum im Okular beobachtbaren Surrogat-Bild bei. Die dabei erreichbaren Auflösungen sind dabei um ein vielfaches Geringer als bei den konfokalen Mikroskopen. Deren hohe Schärfe(ntiefe) wird durch die Verwendung von hoch kohärentem Licht (Laser) noch weiter verbessert.

Zusätzlich zur hohen Auflösung sind konfokale Laserscanning-Mikroskope in der Lage, Fluoreszenzen quantitativ zu erfassen. So können Aussagen über den exakten Zustand (z.B. Zellzyklus) von Einzelzellen gemacht werden. Durch Anfärbung mittels markierter Antikörper kann die Position von Proteinen und deren Aktivität sichtbar gemacht werden. Anders als bei dem technisch verwandten Verfahren der Durchflußzytometrie (siehe unten) können mit diesem System weniger gut Zellpopulationen erfasst werden. Die Stärke liegt viel mehr auf der Möglichkeit, einzelne Zellen sehr genau untersuchen zu können. Durch eine optionale Kultivierungseinheit (Wärme- und CO_2-Regulation) können die Zellen auch über einen langen Zeitraum beobachtet werden, wenn sie mit geeigneten (untoxischen) Tracker-Farbstoffen markiert werden.
Im Rahmen des ZIK *plasmatis* war diese Anschaffung unerlässlich, da ein wesentliches Arbeitsfeld sich mit der Wechselwirkung von physikalischen Plasmen mit lebenden (pro- und eukaryotischen) Zellen beschäftigt. Die dabei auftretenden Effekte können nur so mit hinreichender Genauigkeit räumlich erfasst werden.
Das „Konfokale Laserscanningmikroskop“ wurde bei der Firma Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH erworben.

Rasterkraftmikroskop BioScope II

Die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy – AFM) ist ein modernes Verfahren zur Charakterisierung von Oberflächentopografien mit Auflösungen im unteren Nanometer-Bereich. Wesentlicher Vorteil dieses hochempfindlichen Visualisierungsverfahrens ist, dass die Untersuchungen keiner Probenvorbereitung bedürfen und die Untersuchungen unter Normalatmosphäre durchführbar sind. Damit können biologische Proben praktisch im nativen Zustand untersucht werden. Mit entsprechenden, speziell für zellbiologische Untersuchungen geeigneten Zusatzausrüstungen können Zellreaktionen auf externe Einflussfaktoren praktisch in Echtzeit sichtbar gemacht werden. Mit diesen Vorteilen z.B. im Vergleich zur Elektronenmikroskopie wird die Rasterkraftmikroskopie immer mehr zu einem unverzichtbaren Instrument für moderne zellbiologische und mikrobiologische Forschungen auf höchstem Niveau.
Dieses Gerät, das speziell an die Bedürfnisse der Forschungstätigkeit im ZIK plasmatis angepasst ist, wurde von der Firma JPK Instruments GmbH geliefert.

Multifunktions-Plattenreader Varioskan Flash

Viele In-vitro-Tests werden heute in Multiwellschalen (6 bis1536 well) mit einem Volumen von mehreren Mikrolitern bis Millilitern durchgeführt. Sehr oft werden dazu Zellen oder

Zelllysat in eine solche Platte eingebracht und mittels geeigneten Reaktionsbedingungen (Anfärben, enzymatische Reaktionen etc.) wird ein optisch lesbares Signal erstellt.

Um Multiwell-Platten vermessen zu können, wird ein System benötigt, das die jeweiligen Platten selbsttätig einzieht und mit der gewünschten, vom jeweiligen Testsystem abhängigen Methode vermisst. Moderne Multifunktionsgeräte verfügen über mehrere Messmethoden und gehen weit über einen klassischen Elisa-Reader hinaus. Eingesetzt werden diese Geräte für die schnelle Erfassung von Zytotoxizität (Neutralrot) oder Stoffwechsel (ATP) von Zellpopulationen, für die Messung von Enzymaktivitäten und Quantifizierung von extrazellulären oder interzellulären Proteinen (z. B. Interleukine). Der Probendurchsatz kann hierbei sehr hoch sein – ein wesentlicher Unterschied zu den Durchflußzytometern. Zudem eignen sich diese Geräte für die Vermessung von in (wässriger) Lösung befindlichen Proben.

Typische Messtechniken, die in diese Geräte eingebaut werden bedienen sich der Photometrie, der Luminometrie und der Fluorimetrie. Alle Methoden haben ihren eigenen Anwendungshorizont und zeichnen sich durch bestimmte Vorteile aus. Durch die klassische Photometrie kann die Absorption von UV-Licht und visuellem Licht durch z. B. Farbstoffe erfasst werden, moderne Geräte haben Monochromatoren und die Wellenlänge kann stufenlos verstellt werden. Genutzt wird dieses Prinzip etwa zur Proteinquantifizierung oder bei der Bestimmung von Zytotoxizität. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen kann die Empfindlichkeit klassischer Methoden gesteigert werden (z. B. Resazurin für die Toxizitätsmessung) oder das Methodenspektrum erweitert werden. Über Fluoreszenzfarbstoffe können Zellanalysen hinsichtlich Zelldifferenzierung, Stoffwechsel und Stress (z. B. freie Radikale, Sauerstoffstress etc.) durchgeführt werden. Spezielle Techniken (FRET, TRF) bieten Zugang zu Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien und ermöglichen so auch die Beobachtung der Zellanheftung auf einem Substrat. Die Messung erfolgt nach Einstrahlung von energiereichem Licht (Xenon-Blitz, Laser etc.) bestimmter Wellenlänge (Monochromator oder Filter) und wellenlängenspezifische Aufnahme des von der Probe emittierten Lichts. Die Luminometrie bedient sich der Zählung der von der Probe ausgesendeten Photonen. Dieses Verfahren ist extrem empfindlich und wird z. B. für die Erfassung der zellulären Stoffwechsellage (ATP-Messung) eingesetzt.

Im Gegensatz zum Durchflußzytometer kann der Multiplattenreader sehr viele Proben zugleich vermessen und gibt Aussagen über den Zustand einer Zellpopulation. Die Leistung von Einzelzellen kann mit diesem System jedoch nicht erfasst werden. Eine Anschaffung war unerlässlich, da die oben beschriebenen Standardmethoden zum Grundrepertoire der Zellbiologie gehören. Um darüber hinaus auch leistungsfähigere Assays durchführen zu können, muss das System eine hohe Sensitivität besitzen. Insbesondere für die Erfassung

von toxischen Effekten oder Enyzmkinetiken ist ein Multifunktionsplattenreader für das ZIK *plasmatis* notwendig. Entschieden wurde sich für ein Gerät der Firma Tecan Deutschland GmbH.

Durchflußzytometer

Als Methode zur Charakterisierung von Zellsuspensionen (Blutzellen, abgelöste adhärente Zellen) wird die Durchflußzytometrie etabliert, die sich zur Erfassung von einfachen (z.B. Zellschäden) und komplexen Parametern (Differenzierungsmarker, z.B. Membranproteine) eignet.

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von intra- sowie extrazellulären Vorgängen. Diese können für jede einzelne Zelle sowohl qualitativ als auch quantitativ erfasst werden. Dazu werden die zu vermessenden Objekte (= Zellen) dem Gerät als Suspension zur Verfügung gestellt. Durch eine geeignete Anordnung (hydrodynamische Fokussierung) werden die Zellen innerhalb eines schützenden Flüssigkeitsstrom (biologischer Puffer) einzeln an einem Analysator vorbei geführt. Anschließend können die Zellen optional nach Eigenschaften sortiert oder aber verworfen werden.

Grundprinzip ist die Markierung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff und anschließender Quantifizierung der Farbstoffmenge im Analysator. Dazu werden die Einzelzellen mit energiereichem Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge (typisch: 488nm, luftgekühlter Argonlaser, optional auch mehrere Laser gleichzeitig) bestrahlt. Das vom Farbstoff (oder: den Farbstoffen) emittierte Licht wird von Detektoren analysiert und die Messwerte für jede Zelle innerhalb eines Koordinatensystems dargestellt. Typischerweise werden die Zellen mit einem einfachen Farbstoff gefärbt (z. B. Propidiumiodid oder FITC). Neben deren reinen Zellzählungen liefert die Verteilung dieses Farbstoffes bereits Aussagen zum Zustand der Zelle oder ihrer Position im Zellzyklus. Zusätzlich werden die Zellen zumeist mittels farbstofftragender Antikörper durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion markiert. Dieses sehr breit einsetzbare und variable Verfahren liefert dann spezifische Information für jede einzelne Zellen, je nach experimentellem Design z. B. Aussagen über Art und Menge von Oberflächenproteinen oder intrazellulären Proteinen. Andere Farbstoffe ermöglichen die Messung von Stoffwechselvorgängen (z. B. intrazellulärer pH-Wert), Ionenverteilung (intrazelluläres Calcium) oder die Erfassung von terminalen Vorgängen (Apoptose etc.).

Durch Erfassung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kann eine Vielzahl an Eigenschaften von Zellen bzw. Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu einem Zeitpunkt gleichzeitig dokumentiert werden. Diese Leistung kann kein anderes System für sich beanspruchen und macht diese Geräte zum unabdingbaren Bestandteil für die innovative

Zellbiologie. Die im ZIK plasmatis zu untersuchende Wechselwirkung von eukaryotischen Zellen mit physikalischen Plasmen macht den Einsatz von Systemen, die eine gesamte Zellpopulation charakterisieren können, unumgänglich.
Für das Durchflußzytometer erhielt die Beckman Coulter GmbH den Zuschlag erhalten.

Molekularbiologischer Arbeitsplatz

Neben zellbiologischen Analysemethoden ist ein breites Spektrum an molekularbiologischen Analyseverfahren erforderlich, um Effekte auf die Gen- und Proteinexpression der behandelten Zellen erfassen zu können (PCR, Elektrophorese von Proteinen und DNA, Blotting-Verfahren, DNA-Array-Techniken).
Die Einrichtung eines kompletten molekularbiologischen Arbeitsplatzes, der als Ergänzung zu den in den Nachwuchsforschergruppe zellbiologischen Analysetechniken für eine umfassende Charakterisierung von Plasma-Zell-Wechselwirkungen unerlässlich ist, wurde von der Analytik Jena AG bezogen. Nach intensiver Auswertung der eingegangenen Angebote und unter Berücksichtigung der in der Ausschreibung genannten Parameter (Preis, technische Spezifikationen, Erweiterungen/upgrades und Service) hatte sich das Angebot der Firma Analytik Jena AG als das Angebot mit dem besten Preis-Leistungs-Verhältnis herauskristallisiert.
Der molekularbiologische Arbeitsplatz bietet folgende Einzelkomponenten:

- Thermocycler (Silberblock, Gradientenfähig, Block soll austauschbar sein)
- Elektrophoresekammer für Agarosegele
- Vacu-Blot (bis zu einer Gelgröße 20 x20 cm)
- 2x horizontales Agarose-Gelelektrophoresegerät (1 klein, 1 groß); (auch einsetzbar für Fertiggele)
  - Dazu passende Form zum Gelgießen
- 2x Standard Power Pack mit Timerfunktion für Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotting (400 V, 1.000 mA, mindestens 300 W)
- 2x Vertikales PAGE Elektrophoresegerät (für zwei bis vier Gele) (1 Mini, 1 Midi)
- Blot Transfer Apparat
  Fastblot mit Durchflusskühlung (16x20 cm)/ Blotting-Apparatur mit Kühlung (für Northern- und Western-Blot)
- Blockthermostat zum Temperieren von versch. Probengefäßen (Temperaturbereich +5°C bis 130°C), mit Timer (tauschbare Blöcke, gute Temperiergenauigkeit)
  - Single Block für Reaktionsgefäße 24 x 1,5 ml
  - Single Block für Reaktionsgefäße 24 x 2,0 ml
- Taumel-Wipptisch 35 x 40 cm

xCELLigence – Real-Time Cell Analyzer

Das xCELLigence-System ist ein hochmodernes Gerät, das die Beobachtung von Zellen in Echtzeit ohne Einsatz von Farbstoffen oder anderen Zellmarkern über längere Zeiträume hinweg ermöglicht. Das System basiert auf der Messung von Impedanzsignalen mit Hilfe von in den Boden der Zell- bzw. Gewebekulturplatten integrierten Mikroelektroden. Die Impedanzmessung ermöglicht quantitative Aussagen über den Zustand der Zellen einschließlich Zellzahl, Vitalität und Morphologie.

Die Roche Diagnostics GmbH ist die einzige Firma, die dieses Gerät mit den für das ZIK *plasmatis* notwendigen Spezifikationen anbietet. Aus diesem Grund ist das Gerät über diese Firma bezogen worden.

Chromatograph und Massenspektrometer zur Proteomanalyse & LC-MS-System

Diese beiden Geräte wurden zusammen – aufgeteilt in zwei Lose (Los 1 = Chromatograph und Massenspektrometer zur Proteomanalyse; Los 2 = LC-MS-System) – ausgeschrieben.

Um ein möglichst vollständiges Bild von den intrazellulären Vorgängen nach einer Plasmabehandlung zu erhalten, sind neben Information zum Genom auch Daten zum Proteom der Zelle sehr wertvoll. Aus diesem Grund wurden Systeme angeschafft, die in der Lage sind, Veränderungen von Qualität und Quantität zellulärer Proteine zu erfassen. Die Fokussierung auf Effekte im subzellulären Niveau passt sehr gut in die Projektausrichtungen beider NWG – Zelluläre Effekte und Extrazelluläre Effekte -, die zugrundeliegende Mechanismen der Interaktion von physikalischen Plasmen mit Zellen bzw. der sie umgebenden (Protein-) Matrix untersuchen. Anhand von Daten zum Proteom (und Genom) lassen sich anschließend Aussagen über Effekte des Plasmas auf die Zellen generieren bzw. beobachtete Veränderungen an den Zellen erklären. Die Geräte ermöglichen sowohl die Identifizierung/Quantifizierung von einzelnen Proteinen nach Plasmaeinwirkung als auch die Erfassung von etwaigen Veränderungen am Proteinmolekül durch indirekte Wirkungen der Plasmen (z.B. sekundär/ tertiär Reaktionen der Radikale) und trägt so erheblich zur erfolgreichen Arbeit des ZIK bei.

Angeschafft wurden Geräte der neuesten Generation, die überragende Werkzeuge für Untersuchungen im Proteom-Bereich darstellen und das ZIK plasmatis zeitgemäß nach modernsten Gesichtspunkten ausstatten. Durch harte Verhandlung konnten die zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel optimal eingesetzt werden, und so sowohl für die Proteinidentifizierung als auch für die Proteinquantifizierung aktuelle Geräte beschafft werden deren Listenpreise deutlich über dem Budget lagen. Durch Anschaffung dieser

Geräte konnte die Wettbewerbsfähigkeit des ZIK *plasmatis* auch internationalen Vergleichen stand halten.

1. *LC-MS System zur Quantifizierung von Proteinen*

Angeschafft wurde ein QTrap 5500 der Fa. ABSciex. Das Gerät ist ein Elekrospray-TripleQuadrupol Massenspektrometer mit eingebauter Ionenfalle. Es wird von einer Nano-LC mit Analyten versorgt. Das Interface ist eine Elektrospray-Ionisationsquelle. Durch diesen Aufbau können Peptide (die aus den Proteinen gewonnen werden) sehr empfindlich nachgewiesen werden.

Der entscheidende Vorteil des Gerätes ist, dass verschiedene Aufgaben mit dieser Gerätekombination bearbeitet werden können. Durch geringe Modifikationen (z.B. der chromatographischen Trennung) kann das Untersuchungsspektrum erweitert werden. LC-MS-Techniken sind Methoden der Wahl bei der Untersuchung komplizierter biochemischer Fragestellungen wie Generierung von Zellsekretionsmustern, Untersuchungen zum Proteom oder Metabolom. Damit bietet sich das Gerät für aufklärende Messungen bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität und des Stoffwechsels in Biofilmen an.

Die Kombination mit profiling technologies (z.B. bei Untersuchungen des Sekretoms von plasmabehandelten Zellen) ermöglicht die Identifikation von Biomarkern und die Aufklärung von Stoffwechselvorgängen.

2. *LC-MS System zur Identifizierung von Proteinen*

Angeschafft wurde ein TripleTOF 5600 der Fa. ABSciex. Das Gerät ist ein Elekrospray-DualQuadrupol-Time of flight Massenspektrometer. Es wird von einer Nano-LC mit Analyten versorgt. Das Interface ist eine Elektrospray-Ionisationsquelle, identisch mit der des anderen Gerätes. Durch diesen Aufbau können die Massen von Molekülen (hier: der Peptide) sehr genau bestimmt werden und so die Zahl der aktiven Proteine einer Zelle bestimmt werden.

Wie bereits für das Los1 (QTrap 5500) beschrieben gelten auch für dieses Gerät, dass verschiedene Aufgaben mit diesem System bearbeitet werden können. Durch geringe Modifikationen (z.B. der chromatographischen Trennung) kann das Untersuchungsspektrum erweitert werden. LC-MS-Techniken sind Methoden der Wahl bei der Untersuchung komplizierter biochemischer Fragestellungen wie Generierung von Zellsekretionsmustern, Untersuchungen zum Proteom oder Metabolom. Damit bietet sich das Gerät für aufklärende Messungen bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität und des Stoffwechsels in Biofilmen an.

Die Kombination mit profiling technologies (z.B. bei Untersuchungen des Sekretoms von plasmabehandelten Zellen) ermöglicht die Identifikation von Biomarkern und die Aufklärung von Stoffwechselvorgängen.

Verdikt

Insgesamt bieten alle auf Los 2 angebotenen Systeme eine extrem fortschrittliche Performance auf dem Gebiet der Proteomics und stellen die Spitze des derzeit machbaren dar. Es handelt sich um HighEnd-Geräte, die dem Anwender ein sehr breites Spektrum an Methoden an die Hand geben. Eine Unterscheidung (im Sinne der Abwägung) kann nur bedingt unternommen werden. Drei der angebotenen Systeme nutzen die ESI-Ionisierung und sind direkt mit der LC gekoppelt (WATERS Synapt, THERMO Orbitrap und ABSCIEX TripleTOF). Da diese Methode zukunftsweisend ist wurde diese vor der MALDI Variante präferiert. Alle ESI-Geräte hätten per se einen vergleichbaren Nutzen für das ZIK plasmatis. In LOS 1 ergab sich eine deutliche praktische Überlegenheit des qTrap5500-Systems von ABSCIEX vor den Mitbewerbern. Zusammen mit der Modernität und der hohen Geschwindigkeit des TripleTOF5600 gab dies Hinweise auf die technische Überlegenheit des ABSCIEX-Duos. Preis, Upgrade-Fähigkeit und Service sind in einem vergleichbaren Rahmen so dass dieser technische Part ausschlaggebend für den Zuschlag von Los 2 für ABSCIEX ist.

Eine Trennung der Lose (etwa Los 1 ABSCIEX und Los 2 THERMO) ist aufgrund der Rabatt-Situation nicht möglich. Dass beide Geräte vom selben Hersteller geliefert werden, beherbergt mehrere Vorteile, was sich speziell in der Auftrennung, Ionisierung und anschließender Detektion der Proteinbestandteile angeht. Außerdem kann somit auf dieselbe Software zur Auswertung zurückgegriffen werden, was die Analyse der untersuchten Proteinveränderung zusätzlich vereinfacht. Zudem kämen höhere Aufwände für Wartung, Einarbeitung und Verbrauchsmittel dazu.

FT-IR Spektrometer inkl. Mikroskop

Das FT-IR Spektrometer mit angeschlossenem FT-IR Mikroskop erlaubt aufgrund seiner hohen spektralen Auflösung eine eindeutige und empfindliche Konzentrationsbestimmung von infrarot-aktiven Substanzen in Gasen, dünnen Flüssigkeitsfilmen und Feststoffen. Dazu zählen anorganische reaktive Spezies (z.B. NO, NO_2, O_3), in der Gasphase aber auch organische Verbindungen, wie Lipide und Proteine als Bestandteile von biologischen Proben. Das FT-IR Spektrometer erweitert zum einen die zur Verfügung stehenden plasmadiagnostischen Methoden, indem geringste Konzentrationen von plasmaerzeugten

reaktiven Spezies vermessen werden. Zum anderen erlaubt das angeschlossene FT-IR Mikroskop die Analyse der Zusammensetzung von biologischen Proben. Dies kann die extrazelluläre Matrix aber auch die Zellwand einzelner vitaler eukaryotischer Zellen sein. Mit der eingebauten mapping-Funktion lassen sich darüber hinaus ortsaufgelöste Verteilungen der IR-aktiven Spezies innerhalb eines Zell-Assays bestimmen. Ausgehend von diesen Analysen werden mit diesem Gerät plasmainduzierte Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der biologischen Proben detektiert und damit wertvolle Erkenntnisse in dem Zusammenspiel von Plasma und biologischem Material gewonnen.
Die BRUKER Optik GmbH hat das beste Preis-Leistungs-Verhältnis angeboten.

Echelle-Spektrenanalysator

Optische Emissionsspektroskopie ist ein nicht-intrusives Diagnostikverfahren, welches eine direkte Aussage zu elektronisch angeregten Spezies im Plasma liefert. In Kombination mit den anderen Diagnostikmethoden kann die Methode ein umfassendes Bild der Vorgänge und Parameter im Plasma liefern. Der Echelle-Spektrograph ist für spektral hochauflösende Messungen komplexer Spektren entwickelt und ermöglicht es, den kompletten sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich simultan mit einer sehr hohen Auflösung (einige pm) zu erfassen. Dies macht die genaue Identifikation sämtlicher optisch angeregten Plasmakomponenten in einer Messung möglich. In Kopplung mit einem Bildverstärker können wir sogar zeitlich korrelierte Messungen wie z.B. beim Abklingverhalten der Plasmen oder die zeitabhängige Anregung von Spezies durchführen.

RAMAN Spektrometer mit konfokalem Mikroskop

Mithilfe des Raman-Spektrometers mit konfokalem Mikroskop werden chemische Bindungen, wie z.B. C-H_3, quantitativ und mit hoher räumlicher Auflösung bestimmt. Im Gegensatz zur Infrarot-Spektroskopie kann jedoch in wässriger Umgebung und bei veränderlicher Temperatur gemessen werden. Desweiteren sind einige Bindungen bzw. deren Schwingungen stark IR-, aber schwach Raman-aktiv (z.B. O-O); und umgekehrt (z.B. C-O-C, asymmetrisch). Da es eine proben- und markerfreie Messtechnik ist, bei der die Information durch inelastisch gestreute Lichtquanten erzielt wird, ist die Probenbeeinflussung und die daraus resultierenden Artefakte bzw. Messverfälschungen minimal. Es wird eine hohe laterale und durch Kombination mit dem konfokalen Prinzip auch eine hohe vertikale Auflösung erreicht. Durch Abrasterung der Probe ist die Raman-Spektroskopie auch als ein bildgebendes Verfahren einsetzbar und erlaubt damit chemical mapping. Das Raman-Mikroskop wird außerdem als konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet, um ergänzend

zur Fluoreszenz-Spektroskopie (die ebenfalls für das ZIK *plasmatis* angeschafft wurde) ortsaufgelöste Informationen (bei eingeschränkter Sensitivität) zu liefern.
Damit ermöglicht das Raman-Mikroskop eine einzigartige Charakterisierung der Änderungen von chemischen Bindungen, die durch plasma-induzierten Radikale bzw. deren Folgeprodukten, hervorgerufen worden sind. Ein Beispiel ist hierbei die Peroxidation der Kohlenstoff-Doppelbindungen von ungesättigten Phospholipiden sein, welche durch eine starke Abnahme der Absorptionsbanden zwischen 1500 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} gekennzeichnet ist.
Den Zuschlag für die Lieferung dieses Gerätes hat die Renishaw GmbH erhalten.

Streak-Kameras

Die zeitaufgelöste Messung an individuellen und kurzlebigen Plasmen erfordert eine spezielle Form von Kameras, sog. Streak- oder Schmierbild-Kameras. Heutige elektronische Streak-Kameras liefern zeitliche Auflösungen im Bereich weniger Pikosekunden. Neben ihrer hohen zeitlichen Auflösung sind diese Kameras die einzigen Instrumente, die es ermöglichen das zeitlichen Verhalten von multiplen optischen Vorgängen wie sie auch in Plasma auftreten können, simultan zu messen. In Verbindung mit einem Spektrometer sind die Kameras auch in der Lage, zeitlich aufgelöste Spektroskopie durchzuführen. Ihre hohe Empfindlichkeit erlaubt die Detektion auch schwacher Signale bis zu einzelnen Photonen. Hier ist die Kombination mit biologischen Diagnostikverfahren (Chemo- oder Bio-Lumineszenz) möglich. Im ZIK *plasmatis* Extrazelluläre Effekte wird die Kamera zudem als Detektionseinheit für die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Geliefert wurde dieses Kamerasystem von der Hamamatsu GmbH.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamthöhe des Zuwendungsbescheides betrug 2.497.462,38 EUR,
Zur Realisierung des Vorhabens wurden Mittel in Höhe von insgesamt 2.502.047,32 EUR eingesetzt. Die Differenz in Höhe von 4.584,94 EUR trägt das INP Greifswald.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Mit der strategischen Geräteinvestition war es möglich, dass ab September 2010, d.h. in den ersten Monaten nach Einzug in die neuen Labore des ZIK *plasmatis*, die ersten Geräte geliefert werden konnten. Durch diese Investitionen und die bereits angeschafften Geräte aus der spezifischen Geräteinvestition wurde eine langwierige Anlaufphase des auf fünf

Jahre angelegten Vorhabens ZIK „*plasmatis* – Plasma plus Zelle“ vermieden, so dass bereits in den ersten Monaten wissenschaftliche Ergebnisse erarbeitet werden konnten. Darüber hinaus konnten so auf dem Workshop „Influence of plasma treatment on cell contacts“, den das ZIK *plasmatis* im Rahmen der „International Conference on Plasma Medicine“ (ICPM3) durchgeführt hat, die Methoden des Vorhabens vorgestellt werden und erste Kooperationen konkretisiert werden.

II.4 Voraussichtlicher, Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses

Mit *plasmatis* wurde der Wissenschaftsstandort Greifswald mit Unterstützung durch das BMBF-Programm "Zentren für Innovationskompetenz" zu einem international renommierten Zentrum für Grundlagenforschung zu Plasma-Zell-Wechselwirkungen ausgebaut.
Im Zentrum für Innovationskompetenz *plasmatis* verwirklichen Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftler in zwei multidisziplinär zusammengesetzten Nachwuchsgruppen ihre interdisziplinären Forschungsprojekte.
Durch die Realisierung der „Strategischen Geräteinvestition“ wurde ein einmaliges Methodenspektrum installiert, das von Wissenschaftlern aus den Bereichen der Plasmaforschung und Lebenswissenschaften genutzt wird, was die Alleinstellung des ZIK *plasmatis* nachhaltig manifestiert. Dadurch wird in den kommenden Jahren eine große Sogwirkung auf Wissenschaftler und somit eine internationale Ausstrahlung erwartet. Erste Veranstaltungen zeigten bereits die internationale Sichtbarkeit des ZIK *plasmatis*. Zudem wurde durch die Realisierung der Geräteinvestition eine exzellente und internationale wettbewerbsfähige Forschung ermöglicht. Es wird erwartet, dass die Forschungsergebnisse, die durch das breite Methodenspektrum entstehen, in die Wirtschaft transferiert werden können. Damit wird mit dieser strategischen Geräteinvestition ein wichtiger Beitrag zur Nachhaltigkeit der *plasmatis*-Förderung insgesamt geleistet.

Die unmittelbare Verwertung der Ergebnisse des Vorhabens „Zentrum für Innovationskompetenz plasmatis: Strategische Geräteinvestitionen für das ZIK plasmatis ‚Plasma plus Zelle‘“ erfolgt im Rahmen der Arbeit der Nachwuchsforschergruppen „Zelluläre Effekte“ und „Extrazelluläre Effekte“ des ZIK *plasmatis*.

II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ebenfalls starke Forschungsgruppen im internationalen Umfeld sind die Drexel University Philadelphia, USA, die Université d'Orléans, Frankreich sowie das Max-Planck-Institut (MPI) für extraterrestrische Physik in Garching, Deutschland. In diesen Einrichtungen werden einzelne Aspekte der Aufklärung von Mechanismen von Plasma-Zell-Wechselwirkungen bearbeitet.

Es ist jedoch nach wie vor festzustellen, dass das solide auf eine umfassende Grundlagenforschung ausgerichtete ZIK *plasmatis* hinsichtlich seiner Forschungskonzeption und Ausstattung bisher weitestgehend konkurrenzlos ist. Diese Alleinstellung wurde durch das Vorhaben „Zentrum für Innovationskompetenz plasmatis: Strategische Geräteinvestitionen" weiter gestärkt.

II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Erste Ergebnisse konnten bereits erzielt werden. Veröffentlichungen der Ergebnisse des Vorhabens „Zentrum für Innovationskompetenz *plasmatis*: Strategische Geräteinvestitionen für das ZIK plasmatis ‚Plasma plus Zelle'" erfolgen im Rahmen der Forschungstätigkeiten der Nachwuchsgruppen „Zelluläre Effekte" und „Extrazelluläre Effekte" (FKZ: 03Z2DN11 und 03Z2DN12).

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht

3. Titel
Zentrum für Innovationskompetenz plasmatis: Strategische Geräteinvestitionen für das ZIK *plasmatis* „Plasma plus Zelle“

4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]	5. Abschlussdatum des Vorhabens
Prof. Dr. Weltmann, Klaus-Dieter	28.02.2011
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald) Felix-Hausdorff-Str. 2 17489 Greifswald	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen ***)** 03Z2DI1
	11. Seitenzahl 24
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Hannoversche Straße 28-30 10115 Berlin	12. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen

16. Zusätzliche Angaben

17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)
Projektträger Jülich, Forschungszentrum Jülich GmbH, Zimmerstr. 26-27, 10969 Berlin
Technische Informationsbibliothek, Deutsche Forschungsberichte, Welfengarten 1B, 30167 Hannover

18. Kurzfassung

Das Greifswalder ZIK *plasmatis* untersucht die Beeinflussung des Wachstums und der Vitalität von unterschiedlichen Zellen unter Anwendung verschiedener Plasmaquellen. Um eine innovative Forschung auf hohem Niveau zu gewährleisten, war neben bereits etablierten Verfahren und Grundausstattungen eine hochleistungsfähige Spezialausrüstung erforderlich, die durch die strategische Geräteinvestition realisiert wurde. Folgende Geräte, die über dieses Vorhaben angeschafft wurden, führen mit dem Gerätepark der Nachwuchsforschergruppe „Zelluläre Effekte“ und der Nachwuchsforschergruppe „Extrazelluläre Effekte“ zu einem weltweit einzigartigen Methodenspektrum: Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Nr. 1), Rasterkraftmikroskop (Nr. 2), Multifunktions-Platten-Photometer (Nr. 3), Durchflußzytometer (Nr. 4), Molekularbiologischer Arbeitsplatz (Nr. 5), Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometer zur Proteomanalyse (MS-System zur Identifizierung von Proteinen) (Nr. 6), xCELLigence – Real-Time Cell Analyzer (Nr. 7), FT-IR Spektrometer inkl. Mikroskop (Nr. 8), LC-MS-System (LC-MS-System zur Quantifizierung von Proteinen) (Nr. 9), Echelle-Spektrenanalysator (Nr. 10), RAMAN Spektrometer mit konfokalem Mikroskop (Nr. 11), Streak-Kameras (Nr. 12). Insgesamt wurden 2.502.047,32 EUR investiert. Die strategische Geräteinvestition wurde entsprechend dem Förderantrag und den zugestimmten Umwidmungen durchgeführt. Somit konnten mit Fertigstellung der Labore, die für die Forschungsarbeit dringend benötigten Geräte angeschafft und etabliert werden. Das ermöglichte dem ZIK *plasmatis* bereits im ersten Jahr wichtige Standards festzulegen, erste innovative Forschungsergebnisse zu erzielen und darüber hinaus erste Kooperationen zu konkretisieren.

19. Schlagwörter
Plasmatechnologie, Plasmamedizin, Plasma-Zell-Wechselwirkungen, Wundheilung

20. Verlag	21. Preis

***)** Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report

3. title
Strategic equipment investment for ZIK *plasmatis* “plasma plus cell”

4. author(s) (family name, first name(s))	5.end of project
Prof. Dr. Weltmann, Klaus-Dieter	28.02.2011
	6. publication date
	7. form of publication Final report

8. performing organization(s) (name, address)	9. originator’s report no.
Leibniz Institute for Plasma Science and Technology e.V. (INP Greifswald) Felix-Hausdorff-Str. 2 17489 Greifswald Germany	10. reference no. 03Z2DI1
	11. no. of pages 24

13. sponsoring agency (name, address)	12. no. of references
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Hannoversche Straße 28-30 10115 Berlin	14. no. of tables
	15. no. of figures

16. supplementary notes

17. presented at (title, place, date)
Projektträger Jülich, Forschungszentrum Jülich GmbH, Zimmerstr. 26-27, 10969 Berlin
Technische Informationsbibliothek, Deutsche Forschungsberichte, Welfengarten 1B, 30167 Hannover

18. abstract
The ZIK *plasmatis* investigates the influence of different plasma sources on cell growth and cell vitality. In addition to well-established methods and basic equipment it was essential to purchase high performance equipment in order to ensure innovative research at a high level. This was realized by “strategic equipment investment”. The combination of the “strategic equipment investments” and the equipment of the junior research group „cellular effects“ and the junior research group “extracellular effects” allowed to establish a worldwide unique spectrum of methods. The following strategic equipment was purchased: confocal laser scanning microscope (no 1), atomic force microscope (no 2), multifunctional plate reader (no 3), flow cytometer (no 4), molecular biological systems (no 5), liquid chromatography and mass spectrometer for proteome analysis (ms system for identifying proteins) (no 6), xCELLigence real time analyzer (no 7), FT-IR spectrometer incl. microscope (no 8), lc-ms system (lc-ms system for quantifying proteins) (no 9), echelle spectrometer (no 10), raman spectrometer with confocal microscope (no 11) and streak cameras (no 12). The capital expenditure amounts to a total of € 2,502,047.32. The strategic equipment investments were realized according to the funding application and agreed rededications. Therefore it was possible to purchase and establish the urgently needed equipment for research with the completion of the labs. This allowed the ZIK *plasmatis* to set necessary important standards and to achieve innovative results of research. Furthermore first co-operations have been substantiated.

19. keywords
Plasma technology, plasma medicine, plasma-cell interactions, wound healing

20. publisher	21. price