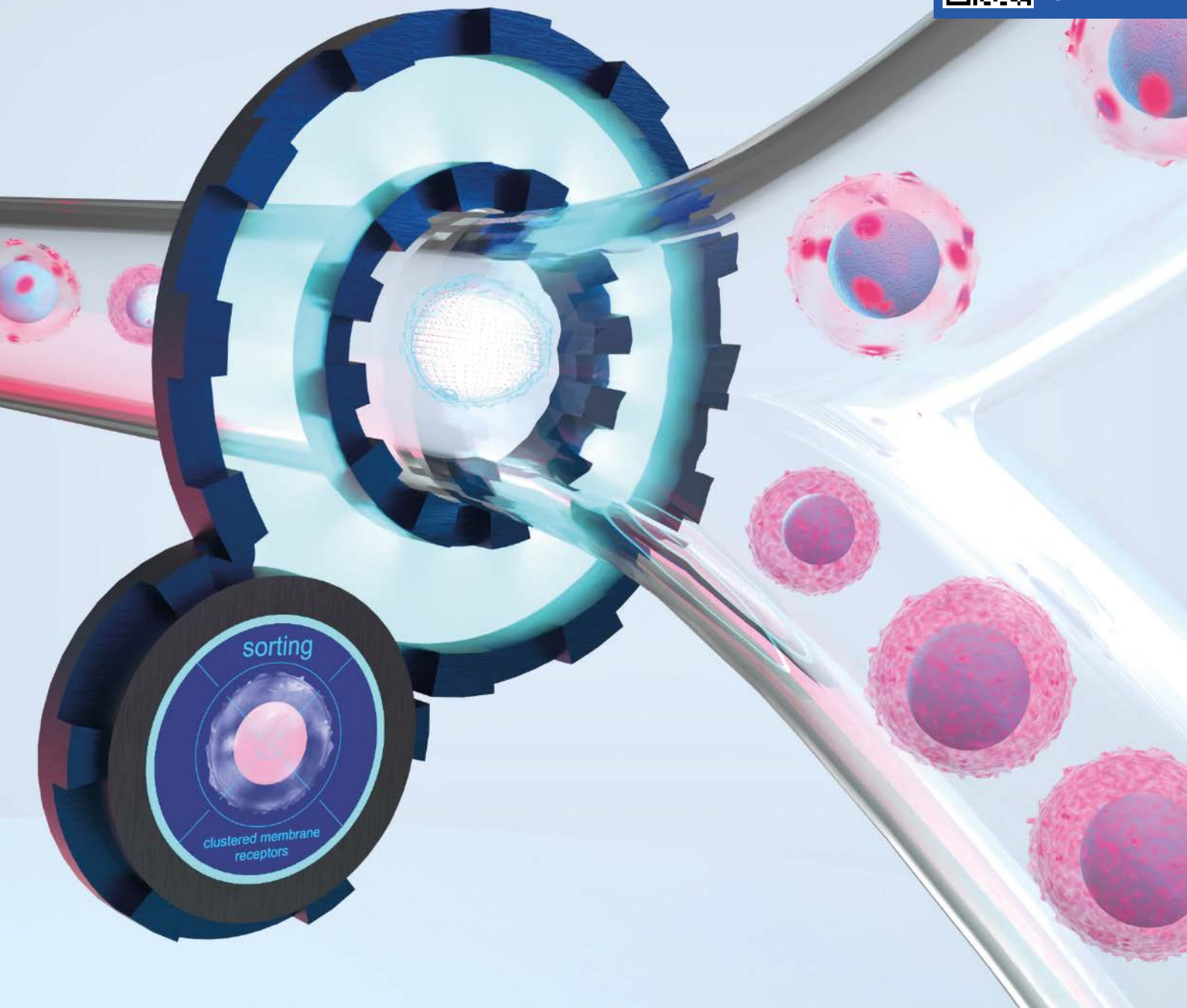


MAI 2024 • 68. JAHRGANG • ANALYTICALSCIENCE.WILEY.COM



Lesen Sie  
die GIT  
**ONLINE**

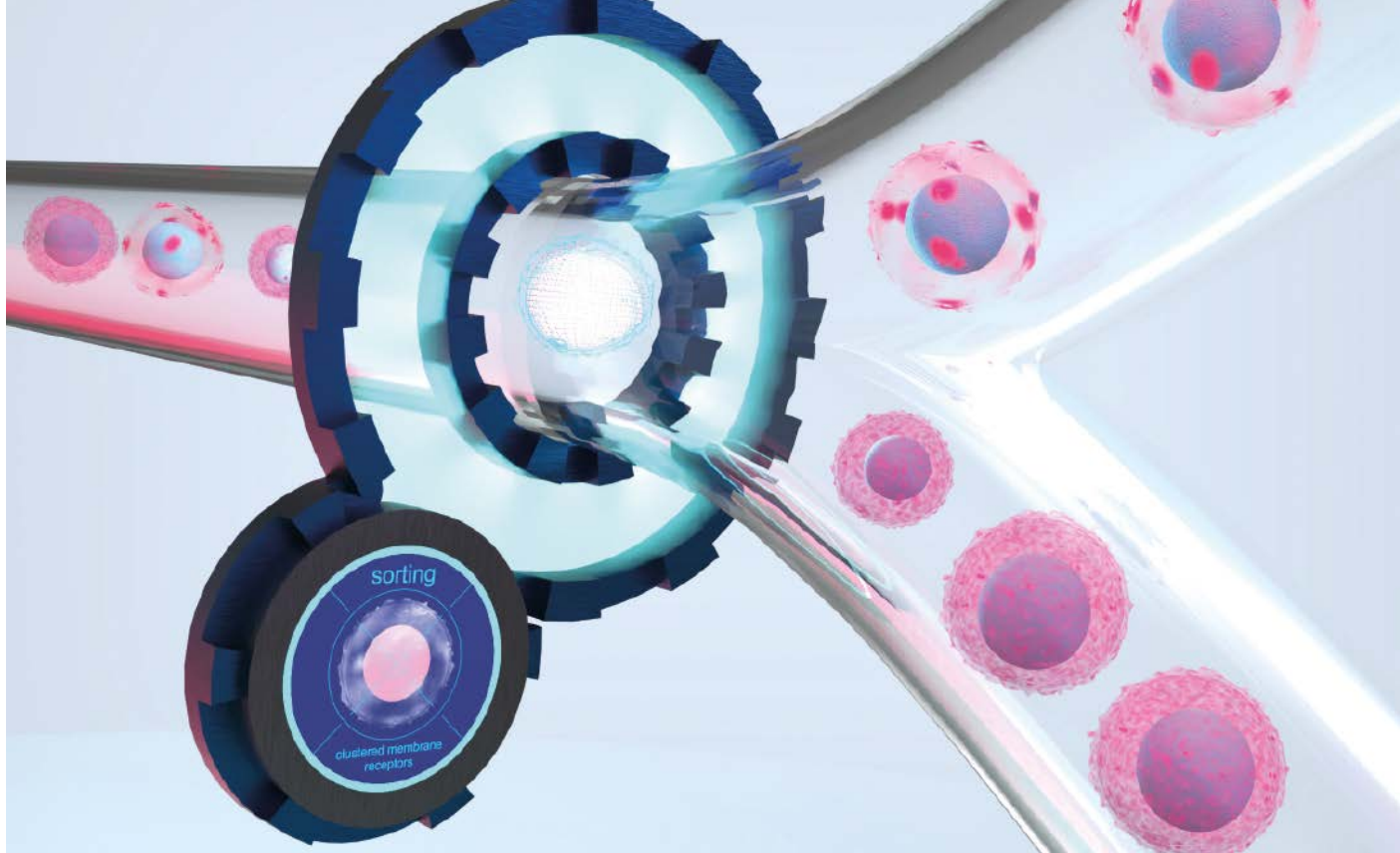
© Fraunhofer IZ-IBB



## Schwerpunkt

Nachhaltigkeit  
im Labor

# WILEY



© Fraunhofer IZI-BB

# Bildbasierte Zellsortierung kann so einfach sein

## Das Mikroskop als Zellsortierer

Felix Pfisterer<sup>1</sup>, Neus Godino<sup>1</sup>, Michael Kirschbaum<sup>1</sup>

Die Auftrennung heterogener Zellproben ist ein Schlüsselprozess in der modernen Biomedizin [1]. Herkömmliche Sortierverfahren verwenden eindimensionale Sortierkriterien wie die integrale Fluoreszenzintensität für die Sortierung, womit ortsauflösende Merkmale in Zellen ungenutzt bleiben [2]. Um Merkmale wie Morphologie oder subzelluläre Verteilung von Zellorganellen und Proteinen für die Zellsortierung zu nutzen, müssen bildgebende Verfahren mit einer hochpräzisen Sortierfunktion kombiniert werden.

### Zellsortierung der nächsten Generation

Die Verwendung von Zellen als Biomarker in der Diagnostik, als Zielstruktur in der Arzneimittelentwicklung oder als Grundlage für Zelltherapie und Tissue Engineering erfordert oft die Isolation spezifischer Zelltypen aus heterogenen Zellgemischen. Dabei müssen zunächst die Zielzellen identifiziert werden, bevor sie aus der Probe isoliert werden können. Obwohl die Mikroskopie in vielen zellbiologischen Laboren eines der wichtigsten Verfahren zur Identifizierung und Erfor-

schung von Zellen und ihren verschiedenen Zustandsformen ist, spielen mikroskopische Bilddaten für die meisten gängigen Sortierverfahren kaum eine Rolle. Stattdessen werden die Zellen in der Regel anhand der An- oder Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker klassifiziert und sortiert. Wesentliche Merkmale wie Größe, Form, Anordnung, Anzahl oder Interaktion von Organellen und Proteinen (Tab. 1) können mit diesen Verfahren daher nicht oder nicht gut erfasst werden. Ebenso gestaltet sich die Nutzung chemischer oder struktureller Merkmale, die durch bestimmte Mikroskopietechniken wie Raman- oder quantitativer Phasen-Bildgebung labelfrei erfasst werden können, mit herkömmlichen Verfahren als schwierig oder unmöglich.

In den letzten Jahren wurden neue Konzepte zur Durchflusssortierung entwickelt, die mikroskopische Bildinformationen zur Zellsortierung nutzen können [3–6]. Dabei werden die Zellen einer Probe mittels eines mikrofluidischen Systems in den Fokusbereich einer bildgebenden Optik geleitet, wo ihr Abbild in mehreren Hellfeld- oder Fluoreszenzkanälen erfasst wird (Abb. 1). Die Bildinformation wird dann in Echtzeit mit zuvor festgelegten Sortierkriterien abgegli-

chen. Erfüllt eine Zelle diese Kriterien, wird sie durch stromabwärts gelegene Aktorstrukturen von den übrigen Zellen separiert.

### Präzise Führung der Zellen

Die präzise Führung und Positionierung des Probenstroms in der Flusszelle ist dabei von entscheidender Bedeutung und wird normalerweise durch sogenannte Hüllströme realisiert, die den Probenstrom in der Flusszelle verjüngen und gleichzeitig präzise ausrichten (Abb. 2). Jedoch geht diese Verjüngung mit einer Beschleunigung des Probenstroms und hohen Vortriebsgeschwindigkeiten einher, was eine enorme Herausforderung für die Abbildung schwacher (Fluoreszenz-) Signale mit hoher örtlicher Auflösung und minimaler Bewegungsunschärfe darstellt. In diesem Fall sind nur kürzeste Integrationszeiten zur Erfassung und Verarbeitung der Bildinformation zulässig, was aufwändige optische Systeme und eine komplexe IT-Infrastruktur erfordert. Entsprechende Systeme sind daher oft komplex, teuer, inflexibel oder liefern nicht die nötige Bildqualität zur zweifelsfreien Identifizierung der Zielzellen.



## Ein Mikrofluidik-Modul für Mikroskope

Um die oben beschriebenen Herausforderungen zu überwinden, wurde am Fraunhofer IZI-BB in Potsdam eine mikrofluidische Kartusche entwickelt, die eine hüllstromfreie Durchflusssortierung bei deutlich geringeren Vortriebsgeschwindigkeiten ermöglicht [7]. Dies erlaubt sehr lange Integrationszeiten zur Bilderhebung und -Verarbeitung, wodurch das System mit einem einfachen Mikroskop verbunden und mit handelsüblichen PCs zur Datenanalyse betrieben werden kann (Abb. 3). Die Qualität der Bildinformation ist dabei vergleichbar mit Bildern unter statischen Bedingungen (Abb. 4). Die Möglichkeit einer Sortierung basierend auf der Standard-Bildgebung von Zellen mittels Mikroskopie erlaubt zudem eine einfache Übertragung der im Labor identifizierten Merkmale der Zielzellen auf den Sortierprozess.

Ein besonderes Konzept zur Handhabung der Zellen in der Flusszelle macht den Ansatz so elegant: Anstatt die Probenflüssigkeit wie üblich über Hüllströme zu positionieren, werden die Untersuchungsobjekte mittels elektrischer Wechselfelder im Radiofrequenzbereich schonend und mit höchster örtlicher Präzision in den Fokus der bildgebenden Optik geführt. Da die Verjüngung des Probenflusses entfällt, kann das Probenvolumen auch bei deutlich geringeren Vortriebsgeschwindigkeiten in angemessener Zeit verarbeitet werden (Abb. 2). Die gleichen Prinzipien werden ebenfalls genutzt, um die erfassten Zielzellen von ihrem ursprünglichen Weg durch den Mikrokanal abzulenken: Mittels präzise ansteuerbarer elektrischer Felder können einzelne Zellen selbst bei hoher Zelldichte individuell gehandhabt und von den übrigen Zellen getrennt werden.

Wie in der jüngsten Veröffentlichung (doi:10.1039/D3LC00242J) beschrieben wurde, konnten mit dem Konzept tausende T-Zellen anhand der subzellulären Verteilung von Fluoreszenzsignalen voneinander getrennt werden, ohne aufwändige optische Systeme oder komplexe Datenverarbeitungsarchitekturen integrieren zu müssen [7]. Da die dem Sortierverfahren zugrundeliegende Bildinformation lediglich durch das Mikroskop bestimmt wird, lassen sich verschiedene Abbildungsmodi und sogar unkonventionelle Bildgebungsverfahren wie quantitative Phasenmikroskopie [8, 9] relativ einfach und flexibel für die Zellsortierung nutzen.

## Die Zukunft wird noch bunter

Im Rahmen einer durch die Fraunhofer-Gesellschaft geförderten Forschungs-kooperation mit Forschenden des Fraunhofer-Instituts für Angewandte Optik und

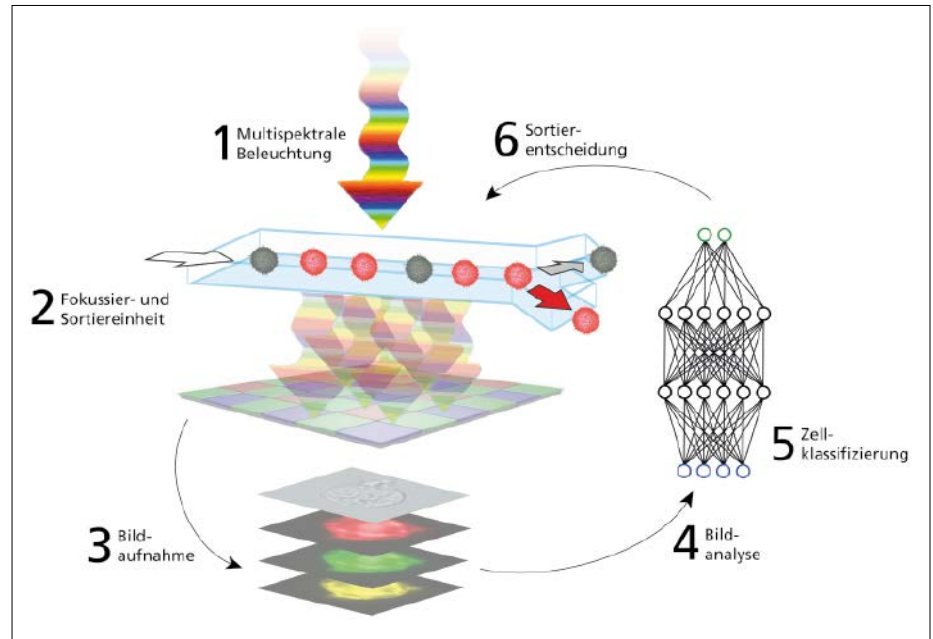


Abb. 1: Konzept einer bildbasierten Zellsortierung. Mittels einer Flusszelle werden die Zellen im Fokus des bildgebenden Elementes organisiert, bevor mikroskopische Abbilder in mehreren Bildmodalitäten erhoben werden. Die Bilder werden in Echtzeit verarbeitet, die Zellen klassifiziert, und eine Sortierentscheidung daraus abgeleitet. Auf dieser Grundlage separieren stromabwärts gelegene Aktorstrukturen die entsprechende Zielzellen von den übrigen Zellen.

Ortsaufgelöstes Merkmal	Beispielanwendung
Kern/Cytoplasma-Verhältnis	Isolierung maligner Zellen für die Präzisionsmedizin
Morphologie von Zellen oder Organellen	Isolierung besonderer Hefestämme für Fermentationen
(Ko-)Lokalisation von Proteinen/Organellen	Isolierung aktivierter Immunzellen
Zellaggregation	Isolierung Tumor-Antigen-spezifischer T-Zellen
Chromosomen-Anzahl / FISH-Analyse	Isolierung maligner Zellen
Membran-gebundene Vesikel	Isolierung Virus-infizierter Zellen

Tab. 1: Beispiele für ortsaufgelöste Merkmale in Zellen und mögliche Anwendungsfälle, die mit einem bildbasierten Sortierverfahren adressiert werden können.

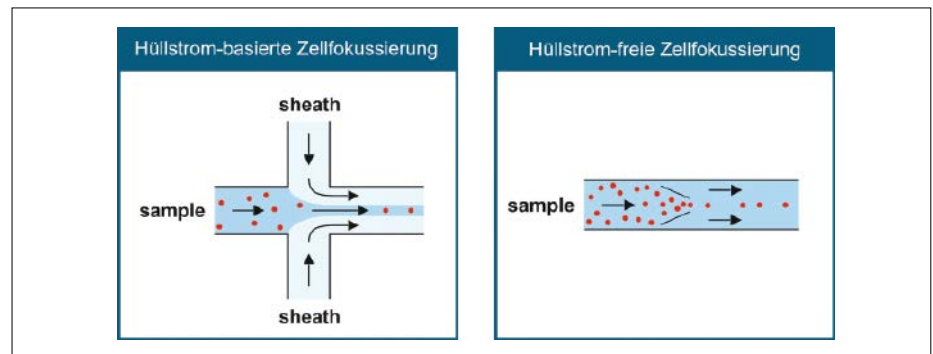


Abb. 2: Organisation der zellulären Probe im Mikrokanal. Links: Zur Positionierung der Zellen im Fokusbereich des bildgebenden Elementes werden üblicherweise sogenannte Hüllströmungen eingesetzt, mit denen der Probenfluss verjüngt und dadurch örtlich eingegrenzt wird. Unter diesen Bedingungen sind hohe Strömungsgeschwindigkeiten für die Prozessierung eines bestimmten Probenvolumens erforderlich. Rechts: Eine hüllstromfreie Handhabung der Untersuchungsobjekte zum Beispiel mittels elektrokinetischer Kräfte ermöglicht den gleichen Volumendurchsatz bei deutlich kleineren Strömungsgeschwindigkeiten, was die Bildgebung erheblich vereinfacht.

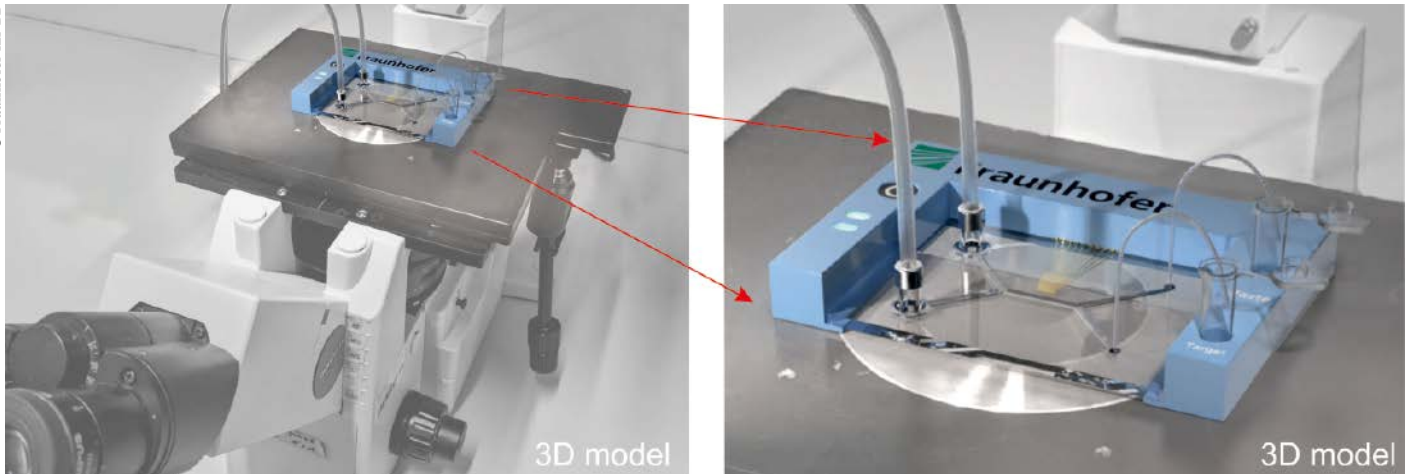


Abb. 3: Eine mikrofluidische Kartusche als Mikroskop-Erweiterung. Die Kartusche kann auf nahezu jedem Mikroskop platziert werden und verwandelt dieses in ein bildbasiertes Zellsortiersystem.

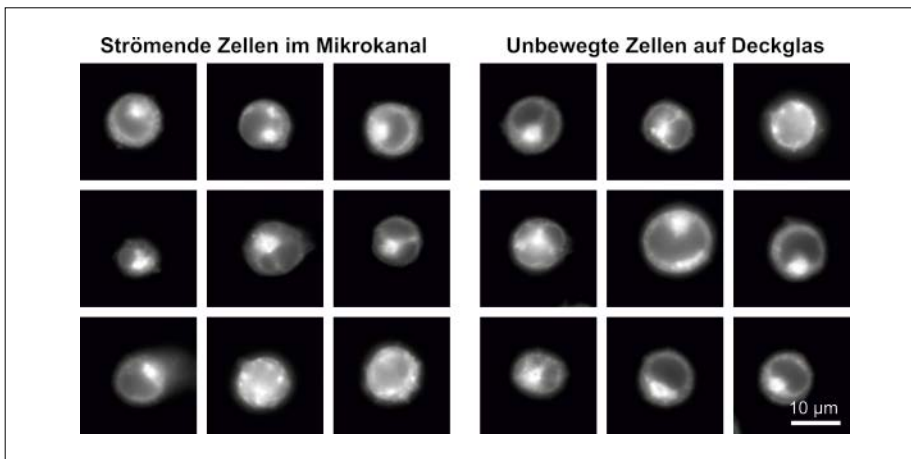


Abb. 4: Hochqualitative Bildgebung der im Mikrokanal fließenden Zellen. Die Schärfe und Qualität der Fluoreszenzbilder von durch den Kanal fließenden Zellen sind von Aufnahmen unter statischen Bedingungen kaum zu unterscheiden (40x Ölimmersionsobjektiv, 500  $\mu$ s Belichtungszeit, Fließgeschwindigkeit im Kanal: 500  $\mu$ m  $s^{-1}$ ).

Feinmechanik (IOF), des Fraunhofer-Instituts für Integrierte Schaltungen (IIS) und der Berliner Charité wird momentan an der simultanen Integration von Durchlicht- und Fluoreszenzbildgebung in mehreren Farbkanälen gearbeitet ([www.cellsorting.fraunhofer.de](http://www.cellsorting.fraunhofer.de)). Darüber hinaus soll das Verfahren mit einer intelligenten Bildverarbeitung kombiniert werden. Die Einfachheit des Ansatzes spielt auch hierbei erneut eine entscheidende Rolle: Aufgrund der relativ langsamen Vortriebsgeschwindigkeiten steht ausreichend Zeit für die Bildanalyse zur Verfügung, die darüber hinaus je nach den Anforderungen an die Rechenzeit angepasst werden kann, indem der Abstand zwischen dem Zellinspektionsbereich und der stromabwärts gelegenen Sortierfunktion durch einfache Verschiebung

der Kartusche auf dem Mikroskop-Tisch variiert wird. Auf diese Weise steht in jeder Situation ausreichend Prozesszeit zur Verfügung, um qualitativ hochwertige Bilder von leistungsfähigen KI in hoher Tiefe zu analysieren und für die Sortierung zu nutzen. Möglicherweise wird es damit in Zukunft gelingen, physiologische Eigenschaften einer Zelle mit ihrer Morphologie zu korrelieren und neue Marker für die Sortierung bestimmter Zelltypen zu identifizieren.

#### Fazit

Die hier vorgestellte Mikroskop-Erweiterung ermöglicht eine schonende und präzise Durchfluss-Sortierung von Zellen

anhand ihres mikroskopischen Abbildes. Dadurch werden orts aufgelöste Merkmale zugänglich, die mit herkömmlichen Sortiergeräten nicht erfasst werden können. Aufgrund der Vermeidung von Hüllströmungen und der Nutzung sanfter elektrokinetischer Kräfte zur Handhabung der Zellen ist das System zudem sehr kompakt und kann leicht auf einem Mikroskop platziert werden. Im Gegensatz zu komplexen Großgeräten eignet es sich damit für fast jede Art von Labor. Die Verwendung mit verschiedenen Mikroskop-Varianten ermöglicht außerdem eine hochauflösende Bildgebung und bietet maximale Flexibilität in Bezug auf die Bildgebungstechnik: Durchlicht-, Phasenkontrast- oder Fluoreszenzbildgebung verschiedener Anregungs- und Emissionswellenlängen lassen sich ebenso leicht kombinieren wie weniger gängige Verfahren wie quantitative Phasenbildgebung [8, 9] und vieles mehr. Die besonderen Merkmale des Verfahrens machen das System sowohl für alltägliche Sortieraufgaben, als auch für die Adressierung außergewöhnlicher Fragestellungen oder der verlustarmen Verarbeitung kleiner, wertvoller Zellproben gleichermaßen interessant.

#### Zugehörigkeit

<sup>1</sup> Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse IZI-BB, Potsdam, Deutschland

#### ● KONTAKT |

##### Dr. Michael Kirschbaum

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse IZI-BB, Potsdam, Deutschland

ORCID: 0000-0003-3686-8349

[michael.kirschbaum@izi-bb.fraunhofer.de](mailto:michael.kirschbaum@izi-bb.fraunhofer.de)



Weitere Beiträge zum Thema:  
<https://bit.ly/WAS-Mikrofluidik>



Literatur:  
<https://bit.ly/GIT-Kirschbaum>