

Zellanalyse und -separation

LIFTOSCOPE: automatisierte Highspeed-Zelluntersuchung und -transfer

FLORIAN NIENHAUS¹, ANN-SOPHIE AURICH¹, BASTIAN NIESSING¹,
ROBERT H. SCHMITT^{1,2}

¹ FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR PRODUKTIONSTECHNOLOGIE IPT

² WZL, RWTH AACHEN UNIVERSITY

Analysis and isolation of cell cultures play a decisive role in biological processes. Currently, these steps are often performed manually, which is time-consuming. Additionally, for each step a separate device is required. The aim of LIFTOSCOPE is to automate these processes in just one device. It combines three functional principles: high-speed microscopy, image analysis and laser-induced forward transfer. A prototype was successfully developed to demonstrate the feasibility of this concept.

DOI: 10.1007/s12268-023-1987-7
© Die Autorinnen und Autoren 2023

Der Markt für biologische Anwendungen wächst stetig [1]. Um den steigenden Bedarf zu bewältigen, werden vollständig automatisierte Lösungen immer wichtiger [2]. Hiervon sind auch die Kultivierung, Analyse und Isolation von Zellen betroffen. Daraus entstand die Idee, ein Gerät zu entwickeln, das die Zellobservation, Evaluation und Separation in einem einzigen Gerät vereint – das LIFTOSCOPE. In einem Prototyp wurden hierfür die Kernprozesse der Highspeed-Mikroskopie, der KI-basierten Zellbilddauswertung

und dem laserinduzierten Vorwärtstransfer (*laser induced forward transfer*, LIFT) vereint. Im Gegensatz zu anderen kommerziell verfügbaren Technologien ist es dadurch möglich, alle drei Schritte direkt auf einer herkömmlichen Mikrotiterplatte (MTP) ohne weitere Probenpräparation durchzuführen [3].

Prototyp

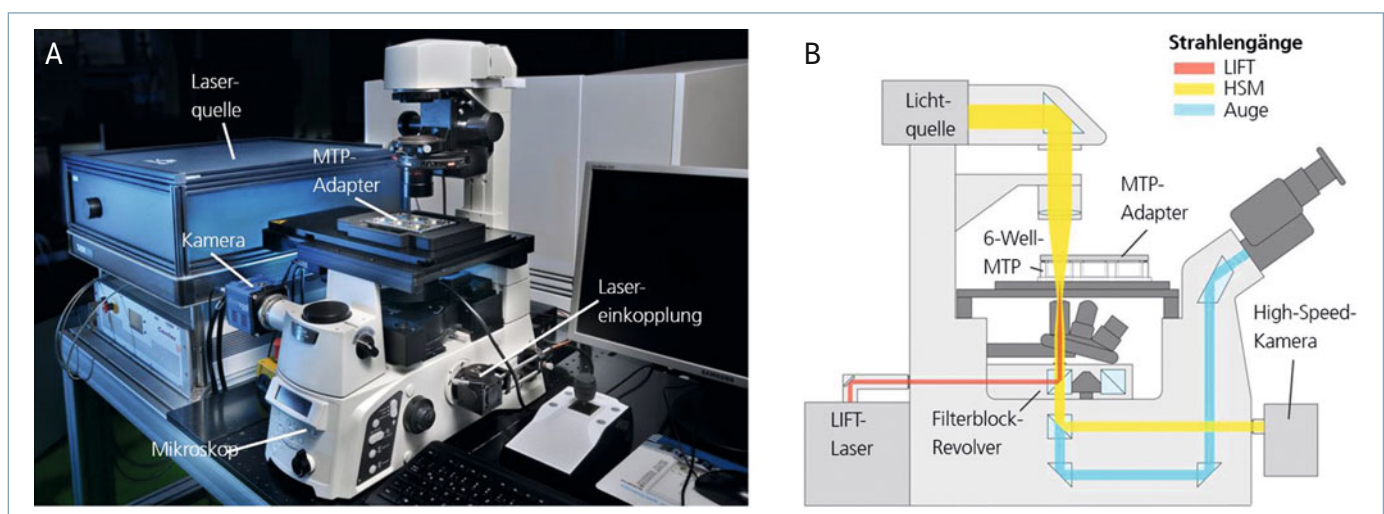
Der LIFTOSCOPE-Prototyp wird auf der Basis eines inversen Mikroskops aufgebaut (Abb. 1A). Dieses wird durch einen bewegli-

chen Mikroskopstisch, eine Hochgeschwindigkeitskamera und eine Blitzlichtquelle für die schnelle Bildaufnahme ergänzt. Die Bewegungen des Mikroskopstischs werden von einem Achsen-Controller gesteuert. Die Koordination des Gesamtprozesses übernimmt ein leistungsfähiger Computer, welcher ebenfalls zur Auswertung der Bilddaten verwendet wird.

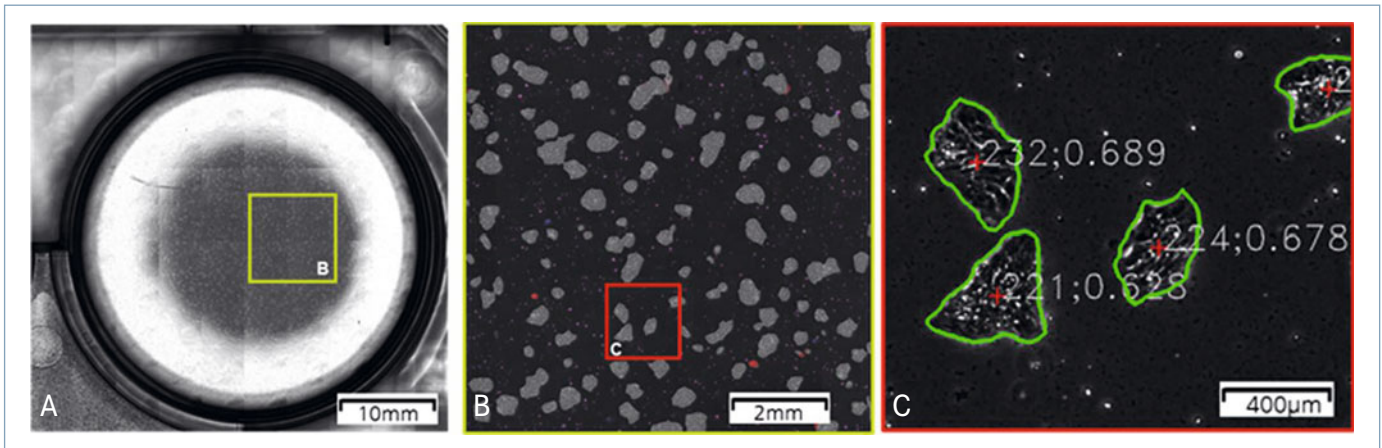
In das Mikroskop wird ein Lasersystem optisch über Spiegel für den LIFT-Prozess eingekoppelt (Abb. 1B). Es kann zwischen den beiden Modi, der Kamera- und Laseranwendung, gewechselt werden. Die Zellen befinden sich während des Prozesses in handelsüblichen 6-Well-Mikrotiterplatten (MTPs).

Highspeed-Mikroskopie

Für den ersten Prozessschritt des LIFTOSCOPEs kommt ein kontinuierlicher Bildaufnahmeprozess zum Einsatz. Dabei wird die Probe kontinuierlich unter dem Sichtfeld des Mikroskops verfahren und hunderte hochauflösende Bilder pro Sekunde aufgenommen. Die einzelnen Bildaufnahmen werden abschließend durch einen Stitching-Algorithmus zu einem Gesamtbild zusammengefügt (Abb. 2A). Um trotz des unebenen MTP-Bodens und geringer Tiefenschärfe des Mikroskops schar-



▲ Abb. 1: Der LIFTOSCOPE-Prototyp. **A**, Demonstrator mit Komponentenbeschreibung. **B**, schematische Darstellung des Lasers im Strahlengang des Mikroskops. HSM = Highspeed-Mikroskop.



▲ **Abb. 2:** Schritte der Bildverarbeitung für den Transfer der Zellen. **A,** iPSC-Kultur in einer Mikrotiterplatte unter Phasenkontrast-Mikroskopie mit 4x-Objektiv. **B,** Bildausschnitt mit *deep-learning*-klassifizierten Zellen. **C,** vergrößerter Ausschnitt der Zellkultur, Grenzen der Kolonien in grün und Mittelpunkt mit roten Kreuzen gekennzeichnet. Die Nummer der Kolonie und die Rundheit werden neben der Kolonie angegeben

fe Bilder zu erhalten, stellt ein Autofokussystem bei jedem Einzelbild den richtigen Fokusabstand her. Hierzu werden Daten aus einem vorgelagerten Scan verwendet [4].

Bildauswertung

Im Anschluss an die Bildaufnahme werden die Bilder automatisiert ausgewertet. Je nach Anwendungsfall kommen spezifische Klassifizierungsalgorithmen zum Einsatz. Diese Algorithmen kennzeichnen die zu transferierenden Zellen und Zellcluster und berechnen deren Mittelpunkt und Größe für den anschließenden LIFT-Prozess (**Abb. 2C**).

Für den Prototypen wird exemplarisch ein Algorithmus für die Identifikation von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) verwendet [5]. Dieser nutzt den PHANTAST-Algorithmus, um den Vordergrund in den Bildern zu segmentieren. Diese Bilder werden anschließend in eine U-Net-Architektur überführt, die die einzelnen Zellen in den Bilddaten kennzeichnet [6]. Auf Basis vorher festgelegter Kriterien (z. B. Größe oder Rundheit der Zellkolonien) werden daraufhin Zellen für den Transfer mittels LIFT ausgewählt. Um dem Nutzer mehr Flexibilität zu ermöglichen, kann eine Auswahl der Zellen auch manuell über eine grafische Benutzeroberfläche erfolgen.

Laserinduzierter Vorwärtstransfer (LIFT)

Der LIFT nutzt gepulste Laserstrahlung, um Zellen zwischen zwei Oberflächen zu transportieren. Dabei wird der Laser auf die Grenzfläche zwischen der MTP und dem Zellmedium gerichtet. Das Zellmedium absorbiert die Laserstrahlung und evaporisiert. Beim Kollabieren der daraus entstandenen

Blase entsteht ein Flüssigkeitsstrom, der die Zellen über einen Luftspalt auf eine Empfängerplatte transferiert [7]. Beim LIFTOSCOPE-Demonstrator beträgt dieser Luftspalt 2 mm.

Für den Prototypen wurde ein gepulster Laser mit Pulsdauern von 9 ns und einer Pulsenenergie von 5 µJ bis 50 µJ, sowie einer Wellenlänge von 2940 nm eingesetzt. Hierdurch wird die Laserstrahlung vom Zellkulturmedium absorbiert, nicht aber vom Kunststoff der MTP. Die Transferzeit für eine einzelne Zelle oder einen Zellverbund liegt zwischen 10 µs bis 200 µs. Nach etwa einer Millisekunde befindet sich das umgebende Medium wieder im Ausgangszustand. Die Prozessdauer steigt mit größer werdenden zu transferierenden Volumen und Distanzen und sinken bei steigender Laserpulsenergie [8]. Der LIFT-Prozess hat bei Versuchen zu Überlebensraten von nahezu 100 Prozent geführt und ist damit sehr schonend [9].

Für den Einsatz im kontinuierlichen Scanprozess müssen adhärenente Zellen verwendet werden, was jedoch für den Transfer mittels LIFT herausfordernd ist. Es wurden Studien mit HeLa-Zellen ohne zusätzliche Separationsschicht in der MTP durchgeführt. Diese zeigten, dass für den Transfer lebender adhärenenter Zellen eine dünne Hydrogelschicht notwendig ist, um direkte Bestrahlung oder thermische Schäden an den Zellen zu vermeiden [10]. Damit können Areale mit einem Durchmesser von 80 µm bis 100 µm übertragen werden.

Effizientes LIFT-Verfahren

Mit dem LIFTOSCOPE-Prototyp sollen möglichst hohe Prozessgeschwindigkeiten bei einer großen Zahl transferierter Zellen erreicht werden. Für die Bildaufnahme wird

dies durch die Highspeed-Mikroskopie gewährleistet. Die Bildauswertung wird durch den Einsatz leistungsfähiger Computer und Parallelisierung auf der Graphikkarte beschleunigt. Für den LIFT-Prozess musste ein effizientes Verfahren entwickelt werden.

Das einfachste Vorgehen ist der etablierte „Stop and Go“-Prozess. Bei diesem wird jede zu transferierende Zelle auf die Fokusposition des Lasers verfahren und dieser anschließend für den LIFT-Prozess aktiviert. Bei hohen Zellzahlen erweist sich dieses Vorgehen jedoch als zeitintensiv. Daher wurde ein kontinuierlicher Prozess implementiert, der äquivalent zur Bildaufnahme arbeitet. Hierbei hält der Mikroskopist zum Auslösen des Lasers nicht an und rastert die Probe in parallelen Linien im Abstand von 50 µm ab. Zellen werden immer der nächstgelegenen Linie zugeordnet. Hierfür profitiert das Prinzip davon, dass bei einem LIFT-Prozess ein ausgedehntes Areal beeinflusst wird, sodass nicht exakt der Mittelpunkt getroffen werden muss [10].

Der Vorteil dieses Prozesses wurde in Computersimulationen gezeigt. Ab einer Zahl von ca. 2.000 Zellen ist der kontinuierliche Prozess effizienter, da mit steigender Zellzahl mehr Ziele auf einer Linie liegen, was keine zusätzliche Zeit benötigt. Im Gegensatz zum „Stop-and-Go“-Prozess steigt dadurch die Dauer des Gesamtprozesses für den kontinuierlichen Vorgang bei einer Zellzahl von 100.000 im Vergleich zu 10.000 Zellen kaum merklich an.

Anwendungen

Das LIFTOSCOPE-Konzept ist eine vielseitige Plattform mit unterschiedlichen Anwendungsfeldern. Bei der Entwicklung wurde der Einsatz in einem vollautomatischen Labor

angedacht. Es kann hier für viele Aufgaben der Zellisolierung trainiert werden, z. B. für die gezielte Entnahme seltener Zellen oder einer kleinen Anzahl ausgewählter Einzelzellen aus einer großen Kolonie ohne Fluoreszenzmarker.

Aufgrund seiner Modularität kann das LIFTOSCOPE flexibel verwendet werden. Auch getrennte Mikroskopie- und LIFT-Anwendungen sind denkbar. Es sind mehrere Mikroskopiemodi verfügbar, wie Durchlicht und Phasenkontrast. Durch die Trainierbarkeit der Bildauswertung ist die Erweiterung um neue Anwendungsfälle einfach realisierbar.

Zusammenfassung

LIFTOSCOPE ist ein Konzept für ein vollständig automatisiertes Zellanalyse- und Isolationssystem. Aufgrund seines modularen Designs ist es äußerst vielseitig einsetzbar und eine Vielzahl inverser Mikroskope können für die Anwendung des LIFTOSCOPE-Prinzips ausgestattet werden. Durch die Kombination der Highspeed-Mikroskopie und des LIFTs lassen sich niedrige Prozesszeiten und ein schonender Zelltransfer realisieren. Zukünftig sollen weitere Experimente durchgeführt werden, um den Einsatz des

Prototyps unter realen Bedingungen zu testen.

Literatur

- [1] Shields CW, Reyes CD, López GP (2015) Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab Chip* 15:1230–1249
- [2] Chory EJ, Gretton DW, DeBenedictis EA et al. (2021) Enabling high-throughput biology with flexible open-source automation. *Mol Syst Biol* 17: e9942
- [3] Riba J, Gleichmann T, Zimmermann S et al. (2016) Label-free isolation and deposition of single bacterial cells from heterogeneous samples for clonal culturing. *Sci Rep* 6: 32837
- [4] Schenk FW, Brill N, Marx U et al. (2016) High-speed microscopy of continuously moving cell culture vessels. *Sci Rep* 6: 34038
- [5] Piotrowski T, Rippel O, Elanzew A et al. (2021) Deep-learning-based multi-class segmentation for automated, non-invasive routine assessment of human pluripotent stem cell culture status. *Comput Biol Med* 129: 104172
- [6] Jaccard N, Griffin LD, Keser A et al. (2014) Automated method for the rapid and precise estimation of adherent cell culture characteristics from phase contrast microscopy images. *Biotechnol Bioeng* 111: 504–517
- [7] Schiele NR, Corr DT, Huang Y et al. (2010) Laser-based direct-write techniques for cell printing. *Biofabrication* 2: 32001
- [8] Hopp B, Smausz T, Kresz N et al. (2005) Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Eng* 11: 1817–1823
- [9] Serra P, Piqué A (2019) Laser-Induced Forward Transfer: Fundamentals and Applications. *Adv Mat Technol* 4: 1800099
- [10] Deng Y, Renaud P, Guo Z et al. (2017) Single cell isolation process with laser induced forward transfer. *J Biol Eng* 11: 2

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Florian Nienhaus, Ann-Sophie Aurich (oben), Bastian Nießing und Robert H. Schmitt (unten, v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Florian Nienhaus
 Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT
 Steinbachstraße 17
 D-52074 Aachen
florian.nienhaus@ipt.fraunhofer.de