

Schlussbericht

zum Teilvorhaben: Der Optical Stretcher als vollautomatische Technologie zur molekular Marker-freien Charakterisierung von Zellen

im Verbundprojekt: Optische Messungen von zellulären Materialeigenschaften für pharmakologische Hochdurchsatzverfahren (Agescreen)

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Josef Käs, Universität Leipzig

Förderkennzeichen: 13N10935

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2010-31.12.2013 (nach kostenneutraler Verlängerung)

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Eine immer mehr differenzierte Sicht auf Zellen in Feldern wie der Zellbiologie und Medizin erfordert neue Ansätze Zellen genauer und nach neuen Gesichtspunkten zu charakterisieren und zu isolieren. Durch bessere Charakterisierung können neue und seltene Zelltypen gefunden werden und die Zellfunktion besser bestimmt werden. Molekulare Zellmarker, die nur ein molekulares Detail der Zelle erkennen, oder selbst die Kombinationen von mehreren molekularen Markern sind begrenzt in ihrer Spezifität und Selektivität diese neuen Zelltypen zu erkennen.

Bereits Jahrzehnte vor der Entwicklung des Optical Stretchers war bekannt, dass das zelluläre Zytoskelett stark durch Differenzierung der Zelle reguliert ist. Dennoch war es mit herkömmlichen Methoden kaum möglich diese Veränderungen, die sich in den viskoelastischen Eigenschaften der Zelle widerspiegeln, zu messen und dann für mehrere Zellsysteme zu vergleichen. Aus diesem Grund wurde der Optical Stretcher entwickelt: Ziel dieser Entwicklung war es durch die Bestimmung des zellulären Deformationsverhaltens einzelner suspendierter Zellen Rückschlüsse auf Seneszenz von Zellen zu verstehen. Hierbei macht man sich zunutze, dass Messungen des viskoelastischen Verhaltens einzelner suspendierter Zellen mit der Optical Stretcher Technologie kleinste Änderungen des Zytoskeletts detektiert, was sich als ausgezeichneter Zellmarker herausgestellt hat.

Ziel dieses Vorhabens war es daher den Optical Stretcher weiterzuentwickeln, dass die Handhabung vereinfacht wurde und der Durchsatz erhöht werden konnte, um die Benutzerfreundlichkeit zu verbessern und neue Märkte zu erschließen. Dabei war der Fokus nicht nur den bereits bestehenden Zweistrahl Optical Stretcher technisch zu verbessern, sondern auch die Grundlagen zu schaffen die Zellen schneller, „im Fluss“ und nur mithilfe eines einzigen Lasers zu analysieren. Die dafür notwendige Laserphysik sollte in diesem Vorhaben erforscht werden.

Weiterhin war geplant einen Optical Stretcher bei Beiersdorf AG zu etablieren, um die Anwendung der Technologie bei der Erforschung von Seneszenz zu etablieren und neue Anwendungsgebiete dieser Marker-freien Technik zu erschließen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeit der AG Käs ist geprägt von der Erforschung und Entwicklung neuer Technologien wie dem Zweistrahl Optical Stretcher (siehe auch 4.). In der AG gibt es mehrere Techniker und Wissenschaftler, die hervorragende Kenntnisse auf dem Gebiet der Elektronik, Mikrofluidik, Optik und Sensorik haben, um die Optical Stretcher Technologie in Richtung Hochdurchsatz voranzutreiben. Allerdings ist es ohne externe Förderung nicht möglich diese Technologien zur Marktreife zu führen, da die Universität dazu keine finanziellen Mittel zur Verfügung stellt. Dennoch ist neben dem Know-How auch das entsprechende Equipment vorhanden und die Vernetzung mit an deren Arbeitsgruppen und der Industrie, um den Optical Stretcher für das Hochdurchsatzscreening zu erweitern.

Die Optical Stretcher Technologie wird als mikrofluidisches System betrieben, das bereits vollautomatisch läuft und mehrere hundert Zellen pro Stunde deformieren kann. Hierbei sind die mikrofluidischen Kanäle und die Laserfasern in einen Messchip integriert, der auf ein herkömmliches invertiertes Phasenkontrastmikroskop gemountet ist. Die Kanäle sind mit einem Pumpensystem verbunden, das einen mikrofluidischen Fluss generiert. Sobald eine Zelle in der „Trap-Kammer“ zwischen den Laserfasern von der Kamera detektiert wird, stoppt ein Computerprogramm den Fluss und beginnt durch Erhöhung der Laserleistung die Zellen zu stretchen. Nach erfolgreichem Stretchvorgang wird eine neue Zelle in die Trap-Kammer gespült und der Vorgang beginnt erneut. Dieser Vorgang dauert jedoch recht lange, so dass hier kein Hochdurchsatz erreicht werden kann und neue physikalische Ansätze notwendig sind. Außerdem ist das Einsetzen und Austauschen den Chips umständlich und teuer und erfordert gute Kenntnisse der Technologie.

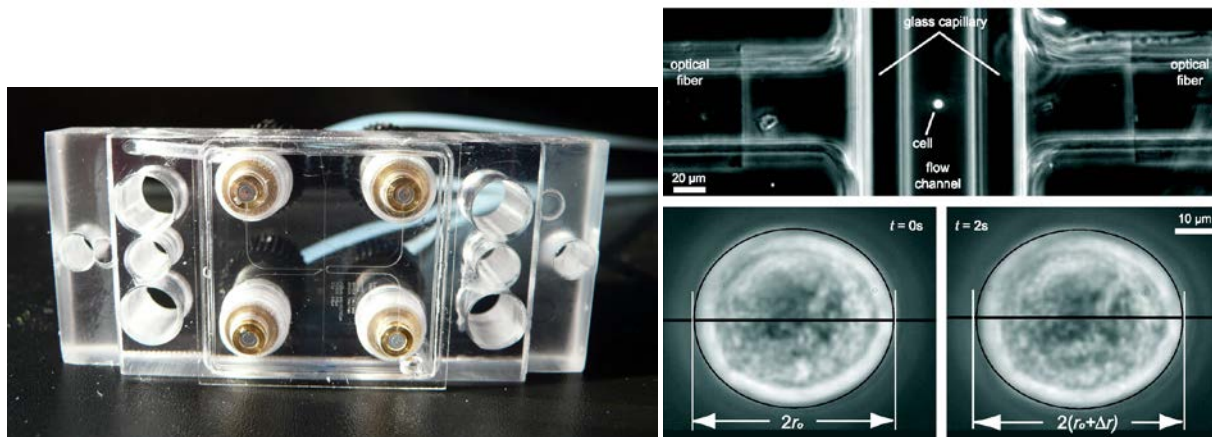


Abb. 1: Links: Grundeinheit des Optical Stretchers ist ein mikrofluidischen Chip, der auf ein invertiertes Phasenkontrastmikroskop gemountet ist. Während der Messung steuert ein Computerprogramm sowohl den Fluss in den mikrofluidischen Kanälen, als auch die Kamera am Mikroskop, die 30 Bilder/sec. von der Zelle während des Stretchvorgangs aufnimmt. Rechts: Die suspendierten Zellen bewegen sich in einem Flusskanal. Einzelne Zellen werden nacheinander zwischen zwei gegenläufigen, divergenten Laserstrahlen gefangen, die durch zwei optische Fasern verlaufen. Wird die Laserleistung erhöht, so führt der erhöhte Strahlungsdruck an der Zelloberfläche zu einer verstärkten Oberflächenspannung, die die Zelle entlang der Laserachse deformiert.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Forschungsvorhaben war in fünf Arbeitspakete unterteilt:

AP1: Entwicklung eines neuen Chipdesigns für den Zweistrahl Optical Stretcher

AP2: Erforschung der physikalischen Grundlagen des Optical Stretchers „im Fluss“

AP3: Erforschung der Laserphysik und der Strahlprofile im Optical Stretcher

AP4: Erforschung neuer Bildverarbeitungstechniken mittels Diodenarrays zur Detektion der Zelldeformation

AP5: Analyse der besten Materialparameter zur Marker-freien Charakterisierung von Zellen

Dabei geht in in AP1 zunächst darum für den zu Projektbeginn bereits bestehenden Zweistrahl Optical Stretcher einen neuen mikrofluidischen Chip zu entwickeln, der das Einsatzgebiet der Technologie erweitert und die Handhabung kostengünstiger und einfacher macht.

AP 2 und 3 haben das Ziel neue physikalische Ansätze zu erforschen, um Zellen nur mit Hilfe eines einzigen Lasers im Fluss zu deformieren, was die Messung schneller macht und den Hochdurchsatz erlaubt.

In AP 4 sollen dann neue Möglichkeiten der Bildaufnahme beim Stretchvorgang erforscht werden, um die Messung und auch die Datenanalyse schneller zu machen und die Datenmenge, die bei einer Messung anfallen zu verringern.

Ziel des letzten AP 5 ist es, die gemessenen Parameter bei der Zelldeformation miteinander in einer Netzwerkanalyse zu korrelieren, um geeignete Analyseparameter für verschiedene Zelltypen zu definieren.

4. wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Zweistrahl Optical Stretcher wurde 1998 an der University of Texas at Austin von Josef Käs und Jochen Guck entwickelt und patentiert. Diese Technologie basiert auf einer optischen Falle, bestehend aus zwei gegenläufigen, leicht divergenten Laserstrahlen zwischen denen suspendierte Zellen aufgrund von Impulsübertragung des Laserstrahls auf die Zelle entlang der Laserachse optisch deformiert werden. Diese neue Messtechnik ermöglicht es suspendierte Zellen Marker- und Kontakt-frei zu deformieren, um aus dem zellulären Zytoskelett Informationen über die Zellelastizität – und damit einhergehend dem Zelltyp – zu gewinnen. So ist es unter anderem möglich nur anhand der Zellsteifigkeit suspendierte Krebszellen von normalen Zellen zu unterscheiden, den Einfluss von Zytostatika zu testen oder Rückschlüsse auf die Zellerterung zu ziehen.

Der 1998 entwickelte Prototyp des Optical Stretchers bestand aus einem Lasersystem, bei dem zwei Laserfasern in einem Tropfen Zellkulturmedium im Abstand von ca. 100 µm zusammengeführt wurden. Mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops mussten dann die Zellen in dem Tropfen zwischen die Fasern manuell geführt werden, um sie dann optisch zu deformieren. Hierbei war ein Durchsatz von wenigen Zellen pro Stunde möglich. 2005 wurde dann von der Arbeitsgruppe von Prof. Käs in Leipzig der erste Kapillaraufbau des Optical Stretchers in Betrieb genommen. Hierbei bewegen sich die Zellen in einem mikrofluidischen Kanal, wobei der Fluss durch die Höhenverstellung der Zuflussschläuche zu den Kanälen manuell variiert wird. Sobald eine Zelle in dem Kanal zwischen den Laserfasern erscheint, wird der Fluss gestoppt und die Zelle gestretcht.

2009 konnte schließlich der Prototyp des Optical Stretchers vollautomatisiert werden, indem die mikrofluidischen Kanäle und die Laserfasern in einem Messchip integriert wurden, der wiederum mit einem computergesteuerten Pumpsystem verbunden ist. Dieser Chip ist auf einem Phasenkontrastmikroskop montiert, wobei eine Kamera die Zellen in den Kanälen beobachtet. Sobald diese eine Zelle in der „Trap-Kammer“ zwischen den Laserfasern detektiert, stoppt der Fluss in den Kanälen und die Zelle wird automatisch optisch deformiert. Das Laserprofil – wie

viele Sekunden und mit welchem Laserleistungsverlauf die Zelle gestretcht wird – kann zuvor computergesteuert eingestellt werden. Dieser Prototyp erreicht einen Durchsatz von mehreren hundert Zellen pro Minute.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen klar das Marktpotential des vollautomatischen Optical Stretchers sowohl in der Grundlagenforschung im Bereich der Biophysik und Zellbiologie, sowie der klinischen Forschung, als auch in der Diagnose von Krebs, sowie der Erforschung von Alterungsprozessen in der Haut. Weiterhin kommt der gesamte Zytometriebereich und alle weiteren Anwendungen zur Isolierung seltener Zelltypen als potenzieller Markt in Betracht, da durch die optische Deformierbarkeit kleine Zellpopulationen kontakt- und markerfrei selektiert werden können, was viele unterschiedliche Analysen im Anschluss an die Selektion ermöglicht. Ebenso können nur durch die Messungen der optischen Deformierbarkeit Rückschlüsse auf den Zelltyp und den Differenzierungsgrad gezogen werden, als auch ist es möglich gesunde und krebsartig veränderte Zellen zu unterscheiden. Zu Beginn des Forschungsvorhabens war der Optical Stretcher jedoch technisch nicht weit genug entwickelt, um die Marktreife zu erlangen, da insbesondere das Handling des mikrofluidischen Chips zu umständlich und schwierig und wenig benutzerfreundlich war. Außerdem war der Durchsatz für viele Anwendungen zu gering, so dass hier neue technische Möglichkeiten erforscht werden mussten.

Die Optical Stretcher Technologie ist durch Publikationen bereits dokumentiert und durch Patente geschützt:

Publikationen:

1. Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Tess J. Moon, C. Casey Cunningham, Josef Käs: Optical Deformability of Soft Biological Dielectrics. *Physical Review Letters*, Volume 84, Issue 23, 5451-5454 (2000)
2. Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Hamid Mahmood, Tess J. Moon, C. Casey Cunningham, Josef Käs: The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophysical Journal*, Volume 81, Issue 2, 767-784 (2001)
3. Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Casey C. Cunningham, Josef Käs: Stretching biological cells with light. *Journal of Physics: Condensed Matter*, Volume 14, Issue 19, 4843-4856 (2002)
4. Falk Wottawah, Stefan Schinkinger, Bryan Lincoln, Susanne Ebert, Karla Müller, Frank Sauer, Kort Travis, Jochen Guck: Characterizing single suspended cells by optorheology. *Acta Biomaterialia*, Volume 1, Issue 3, 263-271 (2005)
5. Revathi Ananthakrishnan, Jochen Guck, Falk Wottawah, Stefan Schinkinger, Bryan Lincoln, Maren Romeyke, Josef Käs: Modelling the structural response of an eukaryotic cell in the optical stretcher. *Current Science*, Volume 88, Issue 9, 1434-1440 (2005)
6. Jochen Guck, Stefan Schinkinger, Bryan Lincoln, Falk Wottawah, Susanne Ebert, Maren Romeyke, Dominik Lenz, Harold M. Erickson, Revathi Ananthakrishnan, Daniel Mitchell, Josef Käs, Sydney Ulvick, Curt Bilby: Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence. *Biophysical Journal*, Volume 88, Issue 5, 3689-3698 (2005)
7. Falk Wottawah, Stefan Schinkinger, Bryan Lincoln, Revathi Ananthakrishnan, Maren Romeyke, Jochen Guck, Josef Käs: Optical Rheology of Biological Cells. *Physical Review Letters*, Volume 94, Issue 9, 98103 (2005)
8. Moritz K. Kreysing, Tobias Kießling, Anatol Fritsch, Christian Dietrich, Jochen R. Guck, Josef A. Käs: The optical cell rotator. *Optics Express*, Volume 16, Issue 21, 16984–16992 (2008)

Patente:

1. U.S. Patent # 6,067,859 "Optical Stretcher" (May 2000) Inventors: Dr. J. Käs and Dr. J. Guck.
2. European Patent # EP1059871 "Optical Stretcher" (Nov. 2000) for Germany, Great Britain, France, Switzerland, Italy, Spain, Prof. Dr. J. Käs and Dr. J. Guck. Weiter internationale Patente existieren.
3. European Patent # 193549811 „Anordnung und Verfahren zur berührungslosen Ausrichtung und Drehung von Partikeln durch anisotrope, elektromagnetische Strahlungsfelder“, Dr. Jochen Guck, Prof. Dr. Josef Käs, Moritz Kreysing.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Vorhabens ist kurzzeitig mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lothar Lilge (University of Toronto) kooperiert worden. Prof. Lilge ist Experte auf dem Gebiet der Modellierungen und Simulationen von optischen Prozessen. Ziel war es durch die Kooperation ein besseres Verständnis vom Strahlengang innerhalb des mikrofluidischen Chips des Optical Stretchers zu bekommen. Insbesondere hat uns interessiert, wie der Übergang des Laserstrahls von optisch unterschiedlichen Medien am besten zu handhaben ist. Dabei hat sich gezeigt, dass unsere Verbesserungen an dem neu entwickelten Chip für den Optical Stretcher notwendig waren, was durch die Zusammenarbeit mit ibidi GmbH erfolgreich bewältigt werden konnte. Der innerhalb des Vorhabens entwickelte „Hybridchip“ funktioniert sehr zuverlässig, ist kostengünstig und benutzerfreundlich (siehe unten).

Als Anwender innerhalb des Vorhabens konnten wir die Arbeitsgruppe von Prof. John Condeelis vom Albert Einstein College in New York, USA gewinnen. Die Arbeitsgruppe ist durch reine medizinische und klinische Forschung geprägt, ist aber neuen Möglichkeiten bei der Analyse von Zellen sehr aufgeschlossen und hat bereits in zwei Projekten die Optical Stretcher Technologie eingesetzt, um Möglichkeiten in der Detektion seltener Zelltypen zu erforschen.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die beantragten Mittel sind entsprechend dem Zuwendungsbescheid verwendet worden. Alle Arbeitspakete und Meilensteine konnten vollständig realisiert werden. Die erzielten Ergebnisse sind im Folgenden detailliert dargestellt:

Entwicklung eines neuen Chipdesigns für den Zweistrahl Optical Stretcher

Zusammen mit ibidi GmbH wurde ein Hybrid-Chip für den Optical Stretcher entworfen, der sowohl Bestandteile des ersten Optical Stretcher Kapillar-Chips enthält, als auch Teile im Spritzgussverfahren enthält. Hierbei werden wie in Abb. 2 gezeigt die Anschlüsse an die mikrofluidischen Kanäle, als auch eine Schiene zur Einführung der Kanäle aus Kunststoff im Spritzgussverfahren gefertigt, wobei diese zwei separaten Teile durch zwei Halterungen verbunden werden. Anschließend wird unterhalb dieses Chips eine Glaskapillare in denen sich während des Experiments die Zellen bewegen werden, zusammen mit einer Prägefolie mit dem Chip verbunden.

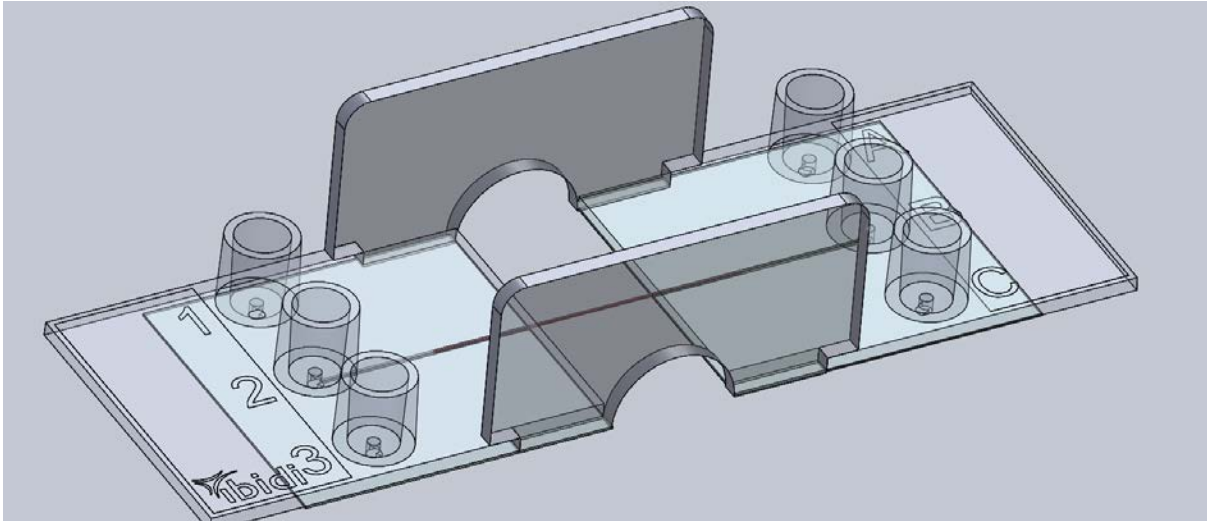


Abb. 2: Skizze des Hybrid-Chips für den Optical Stretcher. Die zwei im Spritzgussverfahren hergestellten Bauteile links und rechts sind über eine Glaskapillare miteinander verbunden. Zwei Halterungen parallel zur Kapillare sorgen für die nötige Stabilität des Chips und dienen gleichzeitig zur Einführung der Ferrulen mit den Laserfasern unter den Halbbogen-förmigen Öffnungen. Die Zellen werden durch die Zufüsse 1-3 in die Kapillare eingespeist und in den Abläufen A-C sortiert.

Der Vorteil dieses Hybrid-Chips ist es, dass das Einfädeln der Laserfaser entfällt und das Produkt damit kundenfreundlicher wird. Das Einsetzen dieses „Wegwerf-Chips“ ist schnell und einfach zu bewältigen, da die Vorrichtung auf dem Mikroskopisch so angepasst wird, dass der Chip nur durch einen Klick-Mechanismus befestigt wird. Die von uns neu entwickelte Mikroskopstage, auf der der Chip montiert ist, ist in Abb. 3 zu sehen.

Weiterhin bietet dieser Hybrid-Chip die Möglichkeit viele verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Größen vermessen zu können. Durch die freie Einstellbarkeit der Laserfasern in Bezug zur Fluss-Kapillare können die Abstände zur Zelle und damit das Strahlprofil auch für z.B. sehr kleine Zellen wie Blutzellen entsprechend angepasst werden, ohne dass hierfür ein Chip mit anderen mikrofluidischen Kanälen oder Waveguides notwendig wären.

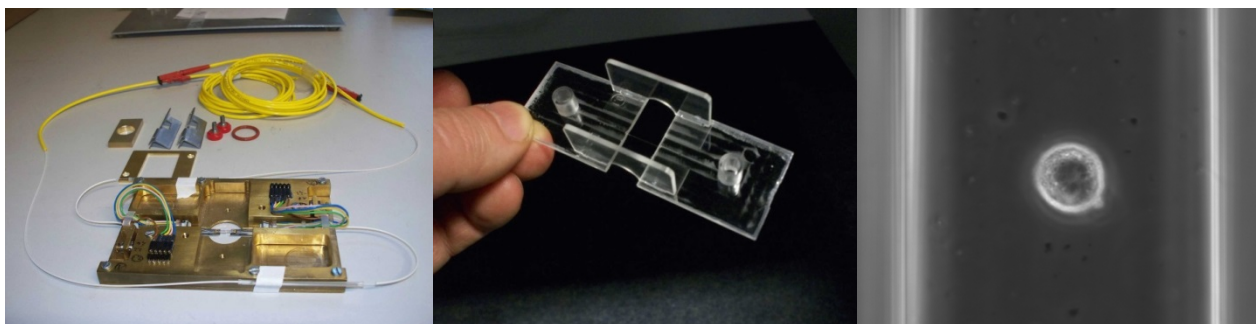


Abb. 3: Neuentwickelte Mikroskopstage (links) für den Hybrid-Chip (Mitte) des Optical Stretchers. Rechts: Zelle in der optischen Falle im Hybridchip.

Tests des neuen Chipsystems innerhalb des Forschungsvorhabens haben zunächst einige Schwierigkeiten aufgezeigt, die jedoch alle gelöst werden könnten, so dass der Chip nun technisch einwandfrei funktioniert:

Probleme nach ersten Tests:

- zu geringe mechanische Robustheit der Faseranschlüsse
- Sedimentierung der Zellen tritt auf – Verstopfungsgefahr in den Kapillaren
- optische Abbildung im Phasenkontrast wird durch Ferrulen zu sehr gestört

Lösung dieser Probleme:

- Einbau einer Zugentlastung des LWL-Kabels und eines Faser-Reservoirs vereinfacht die Montage der LWL-Fasern erhöht die Zuverlässigkeit der Piezo-Stage
- Verlagerung des Reservoirs für die Zellsuspension direkt auf den Chip mit Rührmöglichkeit war erfolgreich
- ein verbessertes Indexmatching zwischen Gel und Ferrule konnte nur durch Verwendung speziell angefertigter Faserend-Ferrulen auf Basis von CFQ (clear fused quartz) erreicht werden.
- Einsatz von Glas-Glas-Laminaten als Flachchip zur Lösung von Dichtigkeitsproblemen im Spülbetrieb und Minimierung der Messkanal-Länge für Sortieraufgaben (Anbieter Fa. Micronit)

Sonstige Verbesserungen am Chip

- eine Optimierung der Faserführung direkt hinter der Ferrule ermöglicht den Einsatz von deutlich einfacheren Flach-Chips ohne stabilisierende Seitenwände
- die pneumatische Kontaktierung von Multi-Port-Chips durch eine einzige Gegenplatte vereinfacht die Bedienung

Erforschung der physikalischen Grundlagen des Optical Stretcher als "In Flow Optical Stretcher" – Zellstretchen im Fluss – als Hochdurchsatzmessgerät

Nicht-invasive Mikrorheologie von Einzelzellen wird seit einigen Jahren erfolgreich mit dem Optical Stretcher betrieben. Dieser nutzt den sog. Strahlendruck - eine Kraft die von Licht erzeugt wird, wenn sie Grenzflächen zwischen Medien von unterschiedlicher optischer Dichte passiert - um Zellen ganzheitlich zu verformen. Im Vergleich zu traditionellen Messmethoden hebt sich der Optical Stretcher durch eine bedeutend höhere Durchsatzrate ab. Der momentane Standard, der Zweistrahl "Automatic Microfluidic Optical Stretcher" (AMOS), ist in der Lage bis zu 350 Zellen pro Stunde zu messen. Dies und die einfache Handhabung des AMOS machen ihn zu einem hervorragenden wissenschaftlichen Messgerät und prädestinieren ihn zu einer Anwendung im Bereich der Diagnostik. Der Durchsatz des AMOS wird allerdings nicht von der Messung selbst, sondern durch zusätzliche Schritte der Positionierung der Zellen begrenzt. Auch muss der AMOS seinen mikrofluidischen Fluss für jedes Objekt stoppen, um Zellen zu detektieren. Ein Konzept, das diese Verzögerungen umgeht, ist der "In Flow Optical Stretcher" (IFOS). Dieser benutzt, genauso wie der AMOS, eine Laserstrahlenfalle aus divergenten, direkt aus der Lichtleitfaser emittierten Gaußstrahlen. Allerdings positioniert der IFOS diese nicht senkrecht zum Fluss, wodurch jede Zelle einzeln angehalten und positioniert werden muss, sondern lässt die Zellen entlang der Strahlachse der Laserfalle fließen. Hierdurch ist es nicht mehr notwendig den Fluss anzuhalten und die Zellen werden automatisch durch die im Kanal herrschenden mikrofluidischen Kräfte positioniert. Eventuelle Objekte, deren Messung nicht erwünscht ist, wie tote Zellen oder Zellhaufen, durchlaufen ebenfalls den Messprozess, halten

das System allerdings in keiner Weise auf.

Es wurden bereits erste Versuche mit dem IFOS durchgeführt, die zeigten, dass mit diesem Zellen aus dem Fluss heraus gefangen werden konnten. Auch eine Deformation der Zellen ist aufgezeichnet worden, jedoch nur schwach ausgeprägt und mit schlechter Bildqualität. Nach diesen ersten erfolgreichen Versuchen mit dem IFOS lag der Fokus demnach auf einer Verfeinerung des Messverfahrens. Es sollten Experimente erfolgen, aus denen eine Aussage zu der erwünschten Erhöhung des Durchsatzes getroffen werden kann. Erste Brennpunkte waren die Anschlüsse der Kanäle an das Schlauchsystem, die zu Druckinstabilitäten neigten, die Versiegelung der Messkammer, die in der alten Version Bildstörungen verursachte, und die Optimierung der Kanalgeometrie. Letzteres ist Frage des Designs, eng mit den gewählten Messparametern verknüpft und soll daher später erläutert werden. Die ersten beiden Punkte stellen ein Herstellungsproblem dar und werden im Folgenden zusammen mit dem Bau des IFOS behandelt.

Der IFOS, der in diesem Forschungsvorhaben erforscht und entwickelt wurde, besteht im Prinzip aus einem Kanalsystem aus Polydimethylsiloxan (PDMS), das mit Teflon-Schläuchen an Reservoirs angebunden werden kann und in das Lichtleitfasern für die optische Falle eingeführt werden können. Grundlage für das Kanalsystem ist der sog. Master, ein lithographisch hergestellter Stempel des zweidimensional designten Systems. Hierfür wird ein Silizium-Chip von knapp 26 x 26 mm zuerst mit einem Haftvermittler und danach mit dem negativen Photolack SU-8 zu einer Strukturhöhe vom 50 µm beschichtet. Durch Erhitzung wird der Photolack bis zu einem gewissen Grad ausgehärtet und daraufhin unter einer Maske, die ein Negativ des gewünschten Kanalsystems darstellt, mit UV-Licht bestrahlt. Ein weiterer Schritt der Erhitzung lässt die so belichteten Strukturen vollständig aushärten und die nicht belichteten Stellen können mit einer Entwicklerlösung entfernt werden.

Der Master wird nun in eine Haltevorrichtung eingespannt. Der IFOS soll später ein leicht zu transportierendes, Chip-artiges Gerät darstellen. Daher wird ein Polycarbonat-Körper (PC-Körper) benutzt, um die Strukturen zu tragen. Dieser transparente Körper von ca. 5 x 24 x 40 mm besitzt durchgehende Öffnungen, um Teflon-Schläuche fest einzuschrauben. Die Verbindung dieser Schläuche mit dem Kanalsystem stellte bisher eines der größten Probleme in der Herstellung dar. Um zu verhindern, dass beim späteren Gießen des Chips PDMS in die Schläuche eintritt, mussten sie fest an die SU-8 Strukturen gepresst werden. Die großen Spannungen innerhalb des Chips führten oft zu undichten Systemen. Eine Verbindung der Schläuche mit dem Master durch feine Stäbe, die am Master fixiert werden können, löst dieses Problem. Kommerziell erhältliche Lichtleitfasern von 125 µm Durchmesser sind optimal für diesen Zweck. Sie sind geringfügig breiter als der Innendurchmesser der benutzten Teflon-Schläuche. Da diese auf kleinen Skalen elastisch reagieren, können die Fasern problemlos in die Schläuche eingeführt werden und dichten diese ab. Auf die Verbindungsstellen am Master werden nun kleine Tropfen Epoxidharz gesetzt. Wenn der PC-Körper mit den Teflon-Schläuchen und ca. 5 mm herausstehenden Lichtleitfasern auf den Master gesenkt wird, tauchen die Enden der Fasern in die Epoxidharztropfen und schieben sich schließlich weiter in die Schläuche hinein, wenn sie den Boden des Masters berühren. Nach kurzer Zeit zum Aushärten des Epoxidharzes kann der Chip nun mit flüssigem und mit Härter versetztem PDMS ausgegossen werden. Der Chip wird 6 - 12 h bei 40 °C gelagert um das PDMS aushärten zu lassen. In einem Reinraum kann nun der Master entfernt werden. Mit ihm werden auch die Lichtleitfasern aus dem System herausgezogen und bilden Trichter-artige Tunnel, die Teflon-Schläuche und Kanalsystem verbinden.

Das Kanalsystem ist nun nach unten hin offen und muss mit einem Glasplättchen versiegelt werden. Bisher wurden mit PDMS beschichtete Glasplättchen benutzt. Diese passten sich an eventuelle Verformungen durch innere Spannungen an, reduzierten die Bildqualität aber bedeutend. Mit dem neuen System der Schlauch-Kanal-Verbindung konnte auf die PDMS-Beschichtung verzichtet werden. Außerdem wurde ein zusätzlicher Schritt der Wasserdessorption eingeführt, bei dem das Glasplättchen für 2 min auf 170 °C erhitzt wird. Daraufhin werden die

Oberflächen von Glasplättchen und Chip in einem Plasmacleaner aktiviert und dann zusammengefügt. Die radikalen Oberflächenmoleküle von Chip und Glas verbinden sich, was von der Hitze des Glases noch unterstützt wird. Somit ist ein dichtes System geschaffen, dessen Druckresistenz weit über die Mindestanforderung von 500 mbar hinausgeht.

Um den IFOS zu vervollständigen wurde der Chip auf einer selbstkonstruierte Aluminium-Grundplatte befestigt. Mit zwei auf dieser befestigten Gummirollen lassen sich zuvor entkleidete und sauber gebrochene Lichtleitfasern in im Kanalsystem integrierte Öffnungen einführen. Der Durchmesser der Lichtleitfasern ist mit Flußsäure bis auf wenige μm an die Höhe des Kanalsystems heran geätzt worden. Auch verschmälern sich die Öffnungen in den Chip hinein. Somit deformieren die Fasern das elastische PDMS während sie hinein geschoben werden und werden an ihrer Endposition von diesem fest eingespannt und ausgerichtet. Ethanol wurde als Gleitmittel benutzt. Nach dessen Verdampfen haften die Fasern stark an den PDMS-Wänden und die Fasern sind in ihrer Position gesichert.

Das Design des Chips betreffend wurden Änderungen in Komplexität und Dimension des Kanalsystems vorgenommen. Eine zuvor eingeführte mikrofluidische Fokussierung wurde aus dem System genommen, um es einfacher in der Handhabung und stabiler in den Flussparametern zu gestalten. Durch die Reduzierung auf drei Eingänge, von denen oft sogar nur zwei benötigt wurden, lief der Chip zuverlässiger und die Herstellung erwies sich als bedeutend weniger kritisch (Abb. 4). Weiterhin wurde die Dimension der Messkammer erhöht. Statt den zuvor verwendeten 400 μm wurde nun mit einem 600 μm langen Weg durch die Zweistrahlensfalle gearbeitet. Auch wurde der Abstand der Lichtleitfasern von dem effektiven Messweg verlängert. Damit schlägt sich der längere Messweg nicht bedeutend auf die Homogenität der Falle nieder. Die verlorene Gesamtintensität durch den längeren Weg sollte durch die längere Messzeit, die nun mit einer Flussgeschwindigkeit von 350 $\mu\text{m}/\text{s}$ auf 1-2 s angesetzt ist, ausgeglichen werden. Von der verlängerten Messzeit mit niedrigerer Flussgeschwindigkeit werden stabilere, reproduzierbarere Experimente erwartet, was auch bestätigt werden konnte. Auch ist es nicht mehr notwendig, ungewöhnlich hohe Laserleistungen zu benutzen. Mit einer den Lasern zumutbaren Leistung von 1200 mW pro Laser wird im Zentrum der Falle eine Intensität von rund 800 mW erreicht, was mit einer typischen AMOS-Messung vergleichbar ist.

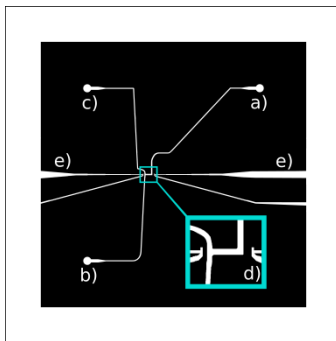


Abb. 4: Neues Kanalsystem des IFOS. a) stellt den Eingangs-Anschluss dar, b) den Ausgang. c) ist ein zusätzlicher Anschluss für einen zusätzlichen Spül-Fluss. d) ist die Messkammer, an die links und rechts die Lichtleitfaser-Kanäle e) heranreichen.

IFOS-Chips wurden mit den beschriebenen Änderungen produziert und experimentell getestet. Er wurde auf einem Zeiss Axiovert 25 Mikroskop montiert und an ein selbstgebautes 500 mbar Druckmodul angeschlossen, mit dem der Fluss erzeugt werden kann. Die in den Chip eingebauten Lichtleitfasern wurden per High-Power-Stecker mit einem 1064 nm Fibolux-Laser verbunden. Dieser Laser wurde von der Firma FiboTec speziell für die Anforderungen des Optical Stretcher entworfen und besitzt zwei separat ansteuerbare Ausgänge mit je 2 W maximaler Leistung. Die Wellenlänge von 1064 nm wurde gewählt, weil sie sowohl in einem lokalen Absorptionsminimum von Wasser, als auch außerhalb des Absorptionsbereiches von Proteinen liegt. Eine extreme Erhitzung der Messkammer durch die Laser wird damit verhindert und Zellen werden durch den Messprozess kaum geschädigt, wie Viabilitäts-Messungen zeigen. Für die Aufnahme der Messung wurde eine XimeaxiQ (MQ013MG-E2) USB 3.0 Kamera auf einem 0.5 x C-Mount mit einer Framerate von 30 fps benutzt. Aufgrund der Größe der Messkammer lag die maximal zu benutzende Vergrößerung bei einem 32 x Zeiss Luftobjektiv. Diese sollte für ein "Proof of principle"-Experiment ausreichen.

MCF-10A, eine Zelllinie, die aus einer Biopsie einer gesunden Brustdrüse einer 36-jährigen

Kaukasierin gewonnen wurde, wurde für den experimentellen Test des Systems benutzt. Die Zelllinie zeigt keinerlei mutagene Merkmale. Sie und ihr malignes Gegenstück MCF-7 gelten als klassisches Modell für In Vitro Untersuchungen von Brustkrebskrankungen. MCF-10A Zellen wurden bereits intensiv mit dem AMOS untersucht. Sie sind groß, pflegeleicht, robust und neigen dazu in Suspension eine sehr gleichmäßige sphärische Form anzunehmen, was sie zu hervorragenden Versuchsobjekten macht. Die Verformung von MCF-10A Zellen allerdings liegt im AMOS bei einer Leistung von 1200 mW bei ca. 5-7 %. Bei der im IFOS benutzten Vergrößerung wäre es schwierig eine Deformation in dieser Größenordnung zu beobachten. Um die induzierte Deformation zu intensivieren, wurde Cytochalasin D benutzt. Cytochalasine sind Zellgifte, die das Aktin-Cytoskelett der Zelle angreift. Cytochalasin D blockiert die Polymerisation von Aktin-Fasern, wodurch ihre mittlere Länge reduziert und der Aktin-Kortex weicher wird. In der richtigen Konzentration führt dies zu einer deutlich erhöhten Deformierbarkeit, die einige Minuten anhält, bevor Zellform und Lebensfunktionen der Zellen angegriffen werden. Der Zellsuspension wurde vor der Messung Cytochalasin D zu einer Konzentration von 30 μM hinzugefügt. Nach 20 min Einwirkzeit wurde Messung wie folgt vorgenommen:

Das gesamte Kanalsystem wird zuerst mit einer phosphatgepufferten Salzlösung und dann mit Zellkulturmedium gespült. Danach wird das Eingangsreservoir mit der Zellsuspension beladen und auch diese durch den Chip gespült. Mit Hilfe eines Joysticks kann das Druckmodul kontrolliert werden. Nachdem ein Nulldruck eingestellt wurde, bei dem kein Fluss entsteht, kann eine Zelle kurz vor der Messkammer platziert werden. Die Laser werden daraufhin auf der zuvor festgelegten Leistung von 1200 mW eingeschaltet und die Zelle wird mit einem fest eingestellten Druck durch die Kammer gespült, der zu einer Flussgeschwindigkeit von ca. 350 $\mu\text{m/s}$ führt. Der Prozess wird von der benutzten Kamera aufgezeichnet. Danach kann die Kammer wieder leer gespült und die nächste Zelle positioniert werden.

Abb. 5 zeigt einen so dokumentierten Messprozess. Mehrere Schlüsse können aus diesem und anderen Aufnahmen gezogen werden:



Abb. 5: Deformation einer Zelle im IFOS. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf den Moment, in dem die Zelle in die Messkammer eintritt.

Hier ist es möglich eine Zelle mit dem Fallenkonzept des IFOS zu fangen und im Fluss zu deformieren. Die Deformation findet außerdem kontinuierlich statt, während sich die Zelle die Messkammer entlang bewegt. Die gesamte Messung, einschließlich der Zeit, die zum Fangen der Zelle benötigt wird, benötigt weniger als 2 s. Eine durch die kontinuierliche Bewegung der Zelle induzierte Rotation tritt nicht auf. Weiterhin ist es möglich, Zellen zu fangen und zu deformieren, selbst wenn sich diese perlenschnurartig in der Laserfalle aufreihen.

All dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass das Konzept des IFOS eine durchsatzstarke Messung tragen kann. Probleme finden sich allerdings weiterhin im Bau des IFOS-Chips. Das benutzte PDMS-System ist zwar schnell und einfach zu produzieren, aber ungenau und fehleranfällig bezüglich der Flussparameter. Auch in der Beobachtung des Messprozesses muss eine Lösung gefunden werden, die es erlaubt, auch kleine Deformationen sicher zu detektieren. Dennoch ist davon auszugehen, dass ein in diesen Punkten korrigierter IFOS in der Lage ist, einen bedeutsamen Sprung in der Durchsatzrate des Optical Stretchers zu erreichen. Bei dem hier benutzten Messkammervolumen von $4.8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ und einer für eine Stretcher-Messung typischen Zelldichte von 500.000 Zellen pro ml befinden sich zu jeder Zeit 1-2 Zellen in der Messkammer. Durch die schnelle Messung von 1-2 s Länge und der Möglichkeit, Zellen sogar simultan zu messen, ergäbe sich ein theoretischer Durchsatz von mind. 1600 Zellen pro Stunde, eingeschlossen einer 10 % Quote von nicht gefangenen Zellen.

Die Ergebnisse gehen weit über die ursprünglich geplanten Arbeitsziele hinaus. Wir waren nicht nur in der Lage die Grundlagen für das Strecken von Zellen im Fluss zu erforschen, sondern auch einen Prototyp eines solchen Optical Stretchers zu entwickeln und erfolgreich zu bauen. Die hier präsentierten Ergebnisse sollen in naher Zukunft im Open Access Journal "Optics Express" veröffentlicht werden.

Erforschung der Laserphysik und der Strahlprofile im Optical Stretcher

Beim hier beschriebenen Arbeitspaket geht es darum, den Strahldurchgang des Laserstrahls im Optical Stretcher über die Einkopplung in die gegenüberliegende Faser zu messen und zu modellieren. Die gemessene Kopplungsintensität soll beispielsweise verwendet werden, um die Zelldeformation zu detektieren, ohne auf die Kantendetektion von Phasenkontrastbildern angewiesen zu sein; dies würde den nötigen Rechenaufwand zur Berechnung der entscheidenden Messgröße des Optical Stretcher, die Zelldeformabilität, drastisch reduzieren. Im Fall des im Aufbau befindlichen Single-Beam-Stretchers, bei dem die Zellen im Fluss deformiert werden, ist es aufgrund des größeren Messbereichs notwendig, Objektive schwächerer Vergrößerung zu verwenden, was die optische Kantendetektion mit der geforderten Genauigkeit sogar unmöglich machen könnte.

Im Fall des „klassischen“ Optical Stretchers, also der Zweistrahlfalle, ist es mittels der Kopplungsintensität nun möglich, den Brechungsindex der gefangenen Partikel, in der Regel Zellen, zu bestimmen. Diese Methode wurde mittels Messungen an PDMS-Beads, deren Brechungsindex bekannt ist, verifiziert und erlaubt erstmals, den hohen Durchsatz des Optical Stretchers zu nutzen, um Zusammenhänge von optischer Deformabilität und Brechungsindex der Zellen zu untersuchen.

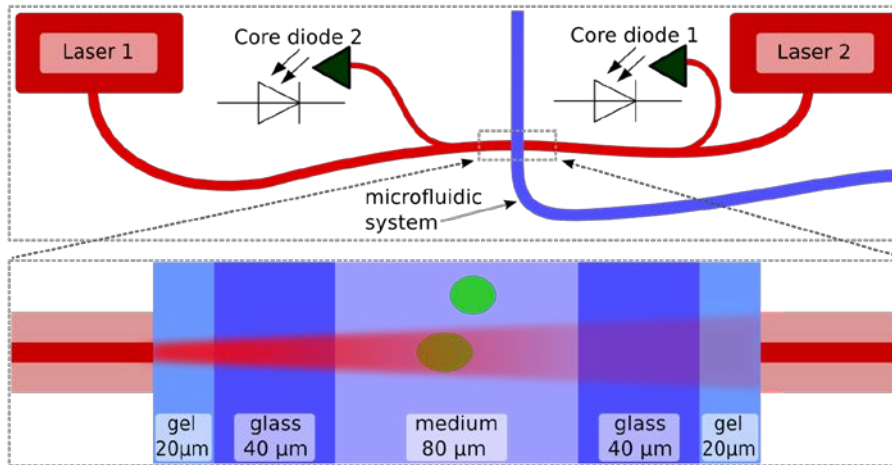


Abb. 6: Aufbau des Setups. Oben: Zwischen Laser und Messkammer werden Photodioden über Fasersplices angeschlossen. Unten: Übersicht über die Größenverhältnisse in der Messkammer.

Modellieren des Strahldurchgangs

Zunächst haben wir Testkügelchen, die die Größe und in etwa den gleichen Brechungsindexunterschied zum Medium haben wie Zellen gesucht, die es erlauben, die Größenabhängigkeit des Fokussiereffekts bei konstantem Brechungsindex zu messen und somit die Gültigkeit des Strahlenmodells zu überprüfen. Es hat sich herausgestellt, dass Silikonöltröpfchen (PDMS) in Ethanol ein geeignetes Testsystem sind.

PDMS hat bei der von uns verwendeten Wellenlänge von 1064 nm einen Brechungsindex von 1.389. Dieser Brechungsindex wurde mittels eines zum IR-Refraktometer umgebauten klassischen Abbe-Refraktometers in unserem Labor gemessen. Gegenüber Ethanol ($n=1.355$) ergibt sich somit ein relativer Brechungsindex von 0.035; dies ist ein günstiger Wert, da er etwa dem Wert von biologischen Zellen in Zellmedium entspricht. Die Strahlengänge des Testsystems (PDMS/Ethanol) und des Zielsystems (Zelle/Medium) sind somit vergleichbar.

Das in diesem Vorhaben entwickelte Modell besteht darin, die Strahlausbreitung bis zur Zelle mit der Ray-Transfer-Matrix-Methode zu berechnen; der Effekt der Zelle wird als Phasenobjekt modelliert, das die Flächen gleicher Phase in einer Welle mit einer zusätzlichen Krümmung versieht. Wenn man das elektrische Feld des Strahls nun in der Ebene, wo sich die Zelle befindet, numerisch in kleine Pixel aufteilt, kann man die Wirkung einer beliebig geformten Linse modellieren, in dem man das Feld mit einer dementsprechenden Phasenmaske multipliziert. Von da kann man das modifizierte Feld bis zur gegenüberliegenden Faser numerisch weiterpropagieren und es mit dem Feld, das in der Faser propagiert, überlappen um die Kopplungsintensität zu berechnen – in Wirklichkeit ist es natürlich einfacher, das Feld der gegenüberliegenden Faser analytisch bis zur Zelle „zurück“ zu propagieren und die Felder gleich dort zu überlappen. Die Kopplungsintensität berechnet sich also wie folgt:

$$\eta = \left| \int \psi_1 Q \psi_2 dS \right|^2$$

Dabei ist Q die komplexe Phasenmaske, die den ortsabhängigen (reellen) Gangunterschied der Strahlen berücksichtigt, diese wird an das Strahlprofil multipliziert:

$$Q = \exp(i\Delta\phi)$$

$$\psi_j = \sqrt{\frac{2}{\pi i}} \frac{1}{\omega_j} \exp\left(\frac{r^2}{\omega_j^2} + i \frac{r^2}{2R}\right),$$

wobei $j=1,2$ für die beiden Felder steht.

Neben dem Einfluss der Partikel auf die Strahl müssen noch zwei andere Effekte in der Modellierung des Strahlengangs berücksichtigt werden. Dies sind der Thermal Lens Effekt und die Abweichung der Partikelposition von der optischen Achse.

Der Thermal Lens Effekt entsteht durch die partielle Absorption des Laserlichts durch das Medium, welches sich dadurch aufheizt. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex entsteht eine räumliche Brechungsindexverteilung mit dem niedrigsten Index auf der optischen Achse, wo die Temperatur am höchsten ist. Der Thermal Lens Effekt kann als eine kontinuierliche Defokussierungslinse modelliert werden. Messungen der Stärke des Effekts stimmen mit theoretischen Vorhersagen überein, womit der Effekt einfach in die Modellierung aufgenommen werden kann.

Darüber hinaus muss die Abweichung der Partikelposition von der optischen Achse berücksichtigt werden, die durch die Gravitation des Partikels entsteht, das in der Regel etwas dichter als das umgebende Medium ist. Diese Abweichung beträgt typischerweise nur Bruchteile eines Mikrometers, was jedoch durchaus die Kopplungsintensität beeinflusst.

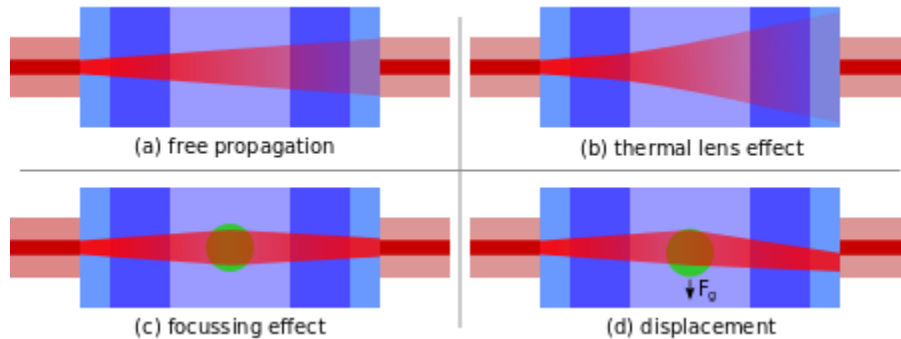


Abb. 7: Übersicht über die Effekte bei der Strahlausbreitung. (a) freie Propagation, (b) der Thermal Lens Effekt führt zu einer Strahlaufweitung, (c) gefangene Partikel wirken wie eine Linse; der Strahl wird auf die gegenüberliegende Faser fokussiert, (d) durch die Gravitation hängen die Partikel leicht unterhalb der optischen Achse, was den Strahl ablenkt.

Der Brechungsindex der Teilchen taucht in der Phasenmaske auf. Für Partikel unterschiedlichen Indexes ergibt sich somit ein anderes Kopplungsverhalten. Eine Darstellung der Phasenmaske und dem Einfluss von Teilchen unterschiedlichen Brechungsindex auf die Kopplungsintensität findet sich in Abb. 8.

Verformungsdetektion

Wenn Partikel sich deformieren, ändern sich die Krümmungsradien der Oberflächen und damit, wie bei einer klassischen Linse, ihre „Brennweite“, also ihr Fokussierverhalten, was an der Kopplungsintensität abgelesen werden kann. Um den Einfluss der Elliptizität der Partikel auf die Kopplungsintensität zu modellieren, benutzt man für die Phasenmaske einfach eine entsprechend geformte Maske. Rückwärts gerechnet, kann man zu einem gegebenen Kopplungssignal auf die Verformung schließen.

Ein Problem dabei ist der starke Einfluss des Thermal Lens Effekts auf das Kopplungssignal bei den hohen Laserintensitäten während des Stretchprozesses. Während der Einfluss für den ungestörten Strahl (ohne Partikel) gut modelliert werden kann, ist speziell der Einfluss von Zellen auf die Erwärmung in der Gemeinde noch nicht gut modelliert. Dennoch ist es möglich, Verformungsdaten zu extrahieren, die gerade für größere Populationen statistisch ähnliche Ergebnisse zeigen wie die klassische Edge-Detection.

Für den Single-Beam Stretcher wäre diese Methode der Verformungsdetektion vorteilhaft, da die Mikroskopvergrößerung dort kleiner ist. Da der Single-Beam Stretcher aber noch nicht im Alltagsbetrieb angekommen ist, werden für den herkömmlichen Stretcher die Deformation weiterhin aus den Phasenkontrastbildern ausgelesen, allein schon um die Vergleichbarkeit mit früheren Messungen zu gewährleisten. Das Problem des großen Rechenaufwands für die Analyse der optischen Daten wurde durch einige Performanceverbesserungen der Edge-

Detection-Software reduziert; auf moderner Hardware (Mehrkernprozessoren) wird es durch Parallelisierung erneut abgeschwächt.

Als Resultat der Forschung lässt sich festhalten, dass die Verformungsdetektion aus den Kopplungsdaten zwar möglich ist, jedoch die klassische Methode nicht in den Schatten stellt. Eine andere Anwendung der Kopplungsdaten, die kaum unter dem Thermal Lens Effekt leidet und zudem noch Daten liefert, die nicht schon im Prinzip bekannt waren, ist die Refraktometrie mittels Kopplungsdaten, die im weiteren kurz vorgestellt werden soll.

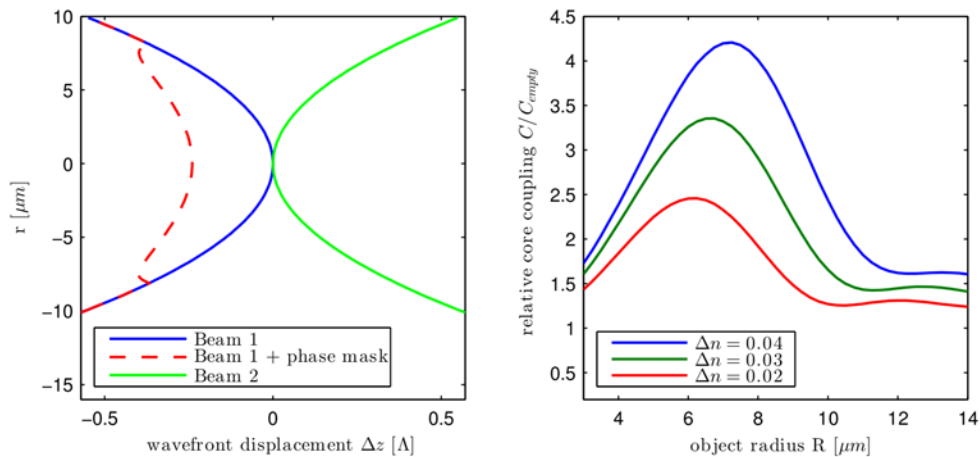


Abb. 8: Links. Die Flächen gleicher Phase zweier Wellenfronten aus den gegenüberliegenden Fasern. Die linke Front wird durch die Phasenmaske verformt, sodass sie besser zur rechten „passt“. Rechts: Modellvorhersage für das Kopplungssignal abhängig von relativem Brechungsindex und Partikelgröße.

Messung des Brechungsindex von Partikeln

Das Kopplungssignal erlaubt insbesondere, den Brechungsindex der gefangenen Partikel – in der Regel Zellen – zu bestimmen. Dieser ist von großem Interesse, da die auf die Zelle einwirkenden Kräfte im Optical Stretcher in erster Ordnung von ihrem Brechungsindex abhängen. Darüber hinaus ist er ein Marker für den Zustand von Zellen und für ihren Proteingehalt.

Anhand der Kurven in Abb. 8 ist erkennbar, dass bei bekannter Partikelgröße das Kopplungssignal direkt den Brechungsindex eines Partikels verrät. Die Partikelgröße wird in diesem Fall aus den Daten der Edge-Detection gewonnen. Indem man Daten aus der Trap-Phase nimmt, bei der die Partikel bei vergleichsweise niedriger Laserleistung gefangen werden, umgeht man die Probleme, die der Thermal Lens Effekt mit sich bringt.

Diese neue Methode wurde am Testsystem PDMS/Ethanol verifiziert. Der Brechungsindex der PDMS-Beads wurde zu $n=1.39\pm 0.002$ bestimmt, wobei 1.389 ± 0.001 der Wert für PDMS aus dem Abbe-Refraktometer ist; mit anderen Worten, die Genauigkeit der Methode ist hoch genug, um die Unterschiede zwischen Zellen aufzulösen, die sich im Bereich von etwa 0.01 bewegen (s. Abb. 9).

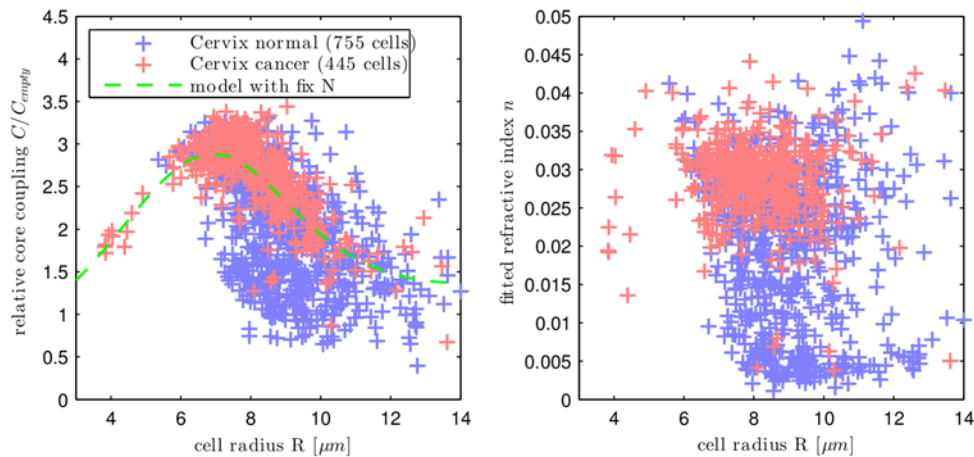


Abb. 9: Links: Beispiel für preliminäre Daten für primäre Krebszellen und Normalzellen. Die Normalzellen haben in diesem Fall teilweise deutlich niedrigere Kopplungssignale. Rechts: Relative Brechungsindizes der Zellen nach dieser Methode. Hier erkennt man, dass die Normalzellen eine Subpopulation mit sehr niedrigen Brechungsindizes haben -tote Zellen, die sonst nicht weiter aufgefallen wären.

Damit ist es zum ersten Mal möglich, den hohen Durchsatz des Optical Stretchers gleichzeitig mit einer Messung des Brechungsindex der Zellen zu nutzen. Damit kann in Zukunft etwa auf Zusammenhänge zwischen der Deformation und dem Brechungsindex eingegangen werden, die von hohem Interesse sind – bis jetzt ist es beispielsweise unbekannt, ob Zellen mit höherem Brechungsindex *stärker* deformiert werden, da auf sie eine höhere Kraft wirkt, oder *schwächer*, da sie aufgrund des höheren Proteingehalts eine höhere Elastizität haben; beides ist denkbar. Erste Messungen deuten darauf hin, dass beide Verhaltensweisen auch tatsächlich vorkommen. Ein Beispiel für Ergebnisse dieser Methode findet sich in Abb. 9. Dort werden zwei Zellpopulationen miteinander verglichen. Die Methode deckt auf, dass die Brechungsindexverteilungen der beiden sich deutlich voneinander unterscheiden. Das Arbeitspaket konnte somit sehr erfolgreich bearbeitet werden und die Ziele sind mehr als erreicht worden.

Erforschung neuer Bildverarbeitungstechniken mittels Diodenarrays zur Detektion der Zelldeformation

Im Rahmen der IFOS Entwicklung muss eine Möglichkeit gefunden werden, Zellgrößen auch mit geringer Vergrößerung (20x) adäquat zu bestimmen. Zusätzlich sollte die Messung an allen Punkten des Bildausschnittes möglich sein. Mit dem Optical Tweezer und der Vierquadrantendiode könnte man dies verwirklichen. Die Idee ist es, den fokussierten Laser über ein dielektrisches Objekt fahren zu lassen und die Ablenkung des Lasers mit einer Vierquadranten-Diode zu detektieren, die mit sehr hohen Frequenzen ausgelesen werden kann. Während die Geometrie des Objektes die Form des Signals bestimmt, sollte seine Längenausdehnung die Breite des Signals verändern. Ein Scan mit einem Optical Tweezer hat nicht nur den Vorteil einer sehr schnellen Signalerzeugung; die Bildunabhängigkeit der Datenaufnahme per Vierquadranten-Diode ermöglicht auch eine deutlich beschleunigte Auswertung, ohne gewaltige Computerleistungen zu benötigen, sowie eine von einer Kameraauflösung unabhängige Messung.

Für vorangehende Experimente wurde ein Optical Tweezer, wie es üblich ist, auf einem Lichtmikroskop montiert. Der Laser kann so über das Objektiv des Mikroskops auf das Sample fokussiert werden. Eine CCD Kamera wurde über dem Sample angebracht und ein

semipermeabler Spiegel spaltet das aus dem Sample kommende Signal auf, sodass das Signal sowohl von der Vierquadranten-Diode erfasst wird, als auch auf der Kamera sichtbar ist. Dies ist notwendig, um den Fokuspunkt des Tweezers zu bestimmen und um auch während der Messung Einblick in das Sample zu haben. Das Signal einer solchen Messung ist der Intensitätsunterschied zwischen zwei Seiten der Diode. Es ist somit zweidimensional und beschreibt die Ablenkung des Strahls in x- bzw. y-Richtung.

Erste Experimente wurden mit einem statischen Tweezer durchgeführt, sodass das Objekt mit einer Piezo-Stage durch den Laser bewegt werden musste. Da das Ziel ein sehr schneller Linienscan ist, wurde auch hier schon mit Frequenzen von 5-20Hz (entspricht einer Bewegungsgeschwindigkeit von bis zu 2400 $\mu\text{m/s}$ bei 60 μm Scanstrecke) gescannt. Um ein mögliches Verrutschen des Objektes zu verhindern, wurden in PDMS eingegossene Glas-Beads benutzt. Da aber später auch adhärente oder sogar suspendierte Zellen vermessen werden sollen, wurde das System bald mit akusto-optischen Deflektoren (AODs) versehen. Mit diesen kann der Strahlengang des Lasers verschoben werden. Somit ist das Scannen eines unbewegten Samples möglich. Mit AODs können sehr hohe Scanfrequenzen erreicht werden. Soll später einmal eine Zelle gemessen werden, die sich mit 800 $\mu\text{m/s}$ bewegt, kann diese Bewegung aufgrund der hohen Scangeschwindigkeit des Tweezers in der Auswertung der Messdaten vernachlässigt werden.

Innerhalb des Vorhabens konnten Experimente durchgeführt, um die Abhängigkeit des Messsignals von der Position des Samples in Relation zum Fokuspunkt des Tweezers zu bestimmen. Dies ist sowohl mit Glasbeads als auch mit suspendierten Zellen gelungen. Allerdings hat sich bei der Analyse von verschiedenen Zellen gezeigt, dass es notwendig sein kann nicht nur die Deformation der Zelle entlang der Laserachse zu bestimmen, sondern andere, zellspezifische Parameter, die bei der Verwendung einer Vierquadrantendiode anstelle der herkömmlichen Phasenkontrastaufnahme nicht gewonnen werden können (siehe „Analyse der besten Materialparameter“).

Der einzige Vorteil der Vierquadrantendiode gegenüber der Bildaufnahme mittels Phasenkontrastmikroskopie ist insbesondere die Geschwindigkeit, mit der die Bilder aufgenommen und ausgewertet werden. Die Geschwindigkeit bei der Bildaufnahme kann jedoch inzwischen mit einer Hochgeschwindigkeitskamera problemlos bewältigt werden. Die Geschwindigkeit bei der Bildanalyse haben wir in den letzten 9 Monaten der Projektlaufzeit dadurch hochskaliert, dass wir die von uns selbst entwickelte Software „Cellinspector“ optimiert und parallelisiert haben, so dass die Bildanalyse nun auf mehreren Prozessoren gleichzeitig erfolgen kann und nun innerhalb kürzester Zeit erfolgt. Das Ziel dieses Projekts, die Bildanalyse zu optimieren, so dass sie auch für den Hochdurchsatzeinsatz des Optical Stretchers geeignet ist, ist damit gelungen.

Analyse der besten Materialparameter zur Marker-freien Charakterisierung von Zellen

Zur Bestimmung der Materialeigenschaften einzelner Zellen im Optical Stretcher wird normalerweise die optisch induzierte Zelldeformation mittels Detektion des Zellrandes in den aufgenommenen Phasenkontrastbildern ermittelt. Durch Kenntnis der ausgeübten optischen Kraft und der beobachteten Deformation der Zellen kann so deren zeitabhängige optische Deformierbarkeit bestimmt werden. Obwohl bewährt stellt diese Art der Quantifizierung von Optical Stretcher Messungen doch eine signifikante Reduktion der vorhandenen Messdaten dar, da lediglich die erzielte Deformation entlang der Laserachse in die Berechnung der Ergebnisse einfließt. Die während des optischen Streckens aufgezeichneten Bilder beinhalten aber weitaus mehr Informationen welche für eine Charakterisierung von Zellproben wichtig sein könnten. So lassen sich beispielsweise Größe und Elliptizität der Zellen aus den vorhandenen Zellranddaten extrahieren, viskoelastische Kenngrößen durch fitten verschiedener rheologischer Modelle an die zeitabhängige Deformationskurve bestimmen oder das visuelle Erscheinungsbild der Zellen

im Phasenkontrastbild quantifizieren (Abb. 10). Auf diese Art konnten wir neben der optischen Deformierbarkeit zusätzlich 46 weitere Parameter für jede einzelne Zelle extrahieren, welche eine detailliertere biophysikalische Zellcharakterisierung und -klassifizierung im Optical Stretcher zu ermöglichen sollten. Zur Bewältigung der dabei entstandenen großen Datenmengen bedienen wir uns Netzwerk-Analyse Methoden welche typischerweise bei der Interpretation von Gen-Daten angewendet werden.

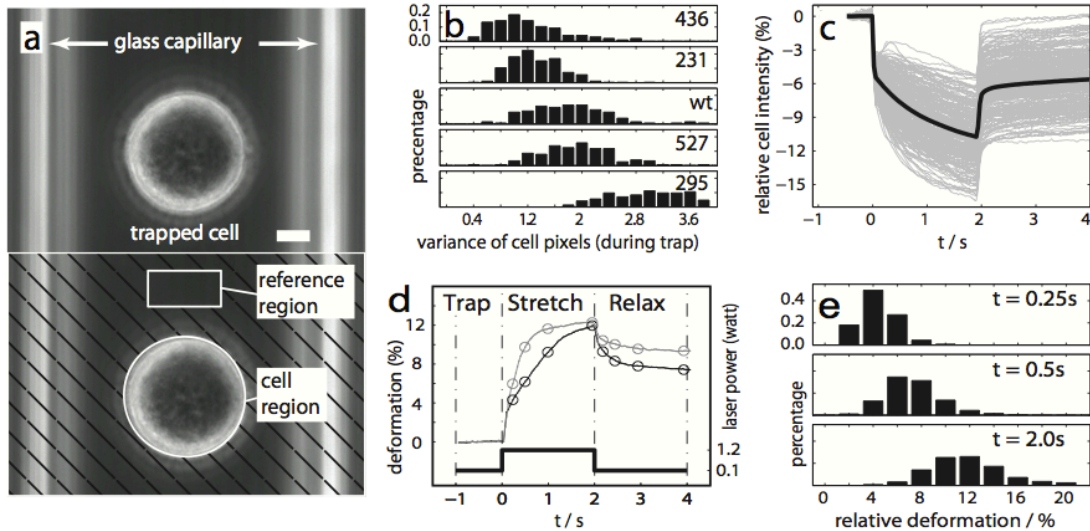


Abb. 10: Extraktion zusätzlicher Parameter aus Optical Stretcher Messungen: [a] Quantifizierung des visuellen Erscheinungsbildes der Zellen im Phasenkontrastbild. Zunächst werden alle zur Zelle gehörigen Pixelwerte auf die Helligkeit des Hintergrundes normiert und dann deren Mittelwert und Varianz bestimmt. [b] Die Varianz der Zellpixel, gemessen für fünf verschiedene Zelllinien, unterscheidet sich messbar und kann daher hilfreich für deren Charakterisierung sein. [c] Zeitabhängigkeit der relativen. Für den gezeigten Zelltyp verringert sich diese während des Stretchvorgangs im Mittel um ca. 11%. [d] Gemessene optische Deformation von zwei Zellen im Optical Stretcher: Obwohl beide Zellen nach zwei Sekunden annähernd die gleiche Ausdehnung erreichen unterscheiden sie sich doch in ihrem zeitlichen Verlauf. Um solche Unterschiede zu erkennen wurde die Deformation zu verschiedenen Zeitpunkten (markiert mit Kreisen) berücksichtigt. [e] Verteilung der gemessenen Zelldeformation für einen Zelltyp zu drei verschiedenen Zeiten.

Zunächst erstellten wir ein sogenanntes Parameter-Netzwerk, welches die wechselseitige Beziehung zwischen den einzelnen Parametern ermittelt und abbildet. Innerhalb dieses Netzwerkes wurden dann Gruppen von Parametern identifiziert, welche ähnliche biophysikalische Informationen enthalten (Abb. 11). Durch diese Herangehensweise kann für die Charakterisierung von Zellproben alle verfügbare Information gleichermaßen und unvoreingenommen berücksichtigt werden. Um diesen Ansatz zu testen wurden 5 Zelltypen mit systematischen genetischen und biomechanischen Variationen vermessen. Durch die Extraktion zusätzlicher Parameter und der Analyse des zugehörigen Parameternetzwerkes konnten 8 Parametergruppen identifiziert werden welche die gemessenen Zelltypen am besten charakterisieren. Dabei ermöglichte die Visualisierung einen intuitiven Zugang zum Parameternetzwerk (Abb. 11), wobei die Parametergruppen wichtige Hinweise auf zugrundeliegenden zellrheologischen Prozessen während der Deformation und Relaxation lieferten. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Parameter, welche das Erscheinungsbild der Zellen im Phasenkontrast quantifizieren, ein wichtiger Parameter für die biophysikalische Charakterisierung von Zellen spielen könnten.

Die von uns entwickelte und erfolgreich publizierte Methode ermöglicht die Berücksichtigung von prinzipiell beliebig vielen biophysikalischen Parametern pro Zelle und bietet damit eine Basis für

eine objektive Identifikation des für die Charakterisierung einer Zellprobe optimalen Parametersatzes.

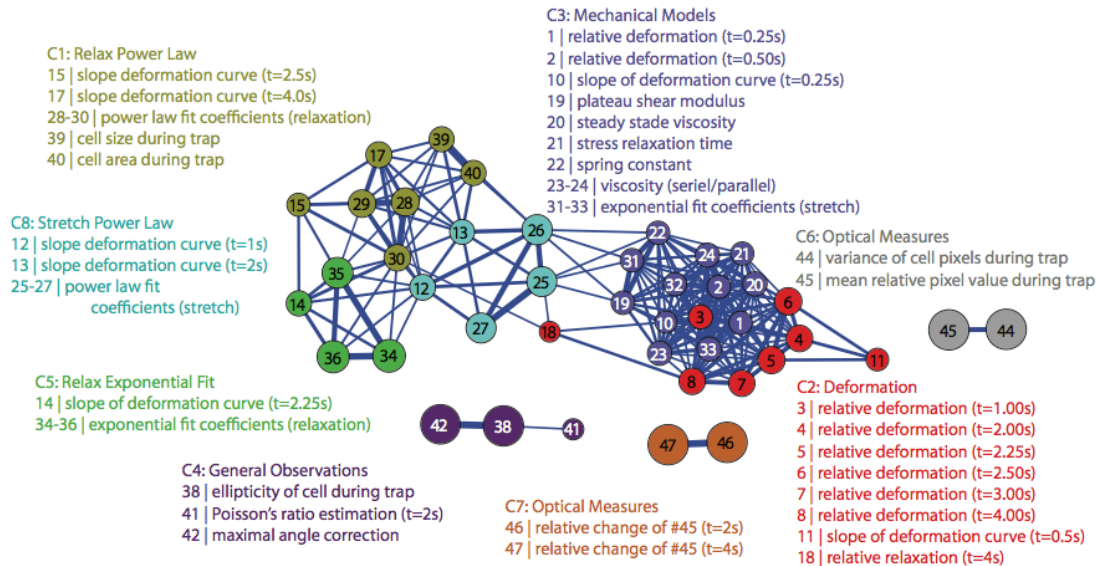


Abb. 11: Netzwerkanalyse von Optical Stretcher Daten: Jeder Punkt repräsentiert einen der 47 Parameter die für jede Zelle ermittelt wurden. Je kleiner der Abstand zwischen zwei Punkten und je dicker deren Verbindungslinie desto korrelierter sind die Parameter. Einzelne Farben repräsentieren die Zugehörigkeit zu einer der 8 gefundenen Parametergruppen. Diese Darstellung der Daten erlaubt einen intuitiven Zugang zu Zusammenhängen im Parameternetzwerk und die Identifikation eines optimalen Parametersatzes für die Klassifikation von Zellen

Anhand der vielfältigen Experimente, die in diesem Vorhaben durchgeführt wurden, hat sich herausgestellt, dass bei den meisten Analysen von Zelldeformationsdaten die Ausdehnung der Zelle entlang der Laserachse (angegeben in Prozent) der wichtigste Parameter zum Verständnis des Zellverhaltens im Optical Stretcher darstellt. Dennoch zeigen gerade Experimente mit Primärzellen, z.B. aus unterschiedlichen Gewebeproben, dass die Deformierbarkeit nicht ausreicht, um Subpopulationen herauszufiltern. Hierbei bietet die Netzwerkanalyse neue Ansatzpunkte für verschiedenste Zelltypen geeignete Analyseparameter zu identifizieren.

Alle geplanten Arbeitspakete und Meilensteine konnten damit vollständig erfüllt werden. Aufgrund der erzielten Ergebnisse war es weiterhin möglich **Nebenergebnisse** zu erreichen, die im Folgenden skizziert sind:

Entwicklung eines Pumpsystems für die mikrofluidischen Kanäle des Optical Stretcher Chips

Wichtiger Bestandteil des Optical Stretchers ist eine Pumpe, die mit hoher Genauigkeit den mikrofluidischen Fluss in den Chip-Kanälen steuert. Bisher konnte dies nur mit einem Gerät der Fa. Fluigent realisiert werden, da keine Alternativgeräte kommerziell erhältlich sind. Diese Pumpe ist jedoch mit einem Preis von ca. 20.000 € sehr teuer und würde damit die Kosten für den Optical Stretcher stark erhöhen. Wir haben deshalb in den vergangenen Monaten ein eigenes Pumpsystem entwickelt, mit dem es nicht nur möglich ist den mikrofluidischen Fluss in

den Chip-Kanälen mit der gleichen Präzision wie mit dem Fluigent-Gerät zu bewerkstelligen, sondern auch bis zu 8 Kanäle separat voneinander zu spülen und damit die Sortierfunktion des Chips zu garantieren. Abb. 12 zeigt unsere entwickelte Pumpe.

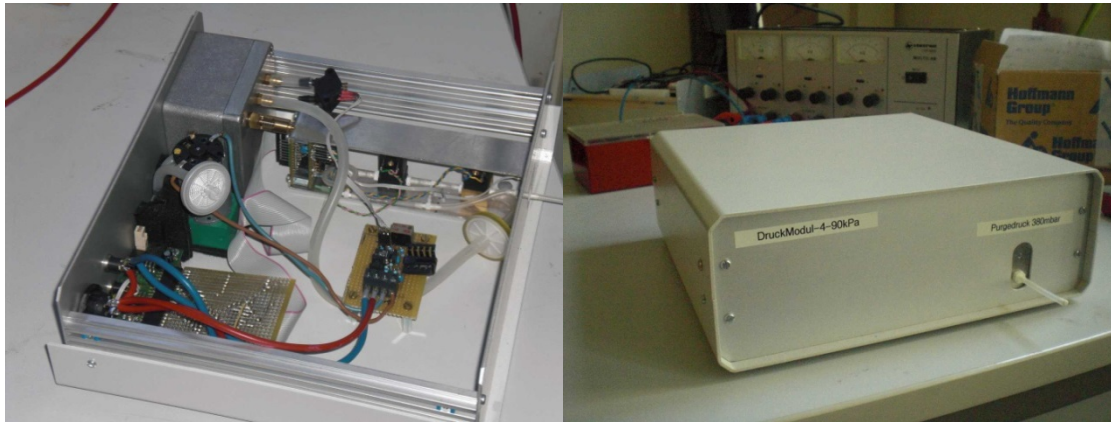


Abb. 12: Oben: Innenansicht der selbstentwickelten Präzisionspumpe zur Steuerung des hydrodynamischen lamellaren Flusses im Optical Stretcher Chip. Unten: Schaltbild.

Einfluss von Temperatur auf Zellmechanik mit dem Optical Stretcher

Um den Einfluss des durch Absorption von Laserlicht verursachten und unvermeidbaren Temperaturanstieges während der Optical Stretcher Messungen zu klären, wurden umfangreiche Untersuchungen in einem speziell entwickelten Aufbau durchgeführt: Durch das Anbringen zusätzlicher optischer Fasern konnte die Temperatur in der Messregion binnen weniger Millisekunden um bis zu 30°C geändert werden. So wurde zum ersten Mal gezeigt, dass bereits kleinste Temperaturänderungen von wenigen Grad Celsius die Deformierbarkeit einzelner suspendierter Zellen signifikant beeinflussen. Durch Ausnutzen des hohen Durchsatzes konnten statistisch relevante Zellmessungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt und analysiert werden. Die gewonnenen Daten zeigen deutlich, dass sich die Deformationsdynamik lebender Zellen bei höheren Temperaturen instantan beschleunigt, während sie bei niedrigeren Temperaturen verlangsamt wird. Weiter konnte gezeigt werden, dass der Effekt kleiner Temperaturänderungen reversibel ist. Da durch unseren Aufbau Temperaturänderungen auf extrem kurzen Zeitskalen realisiert werden können und der Effekt der Temperaturänderung als reversibel identifiziert wurde, kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um eine inhärente Temperaturabhängigkeit des Zellmaterials handelt und nicht um eine etwa durch regulatorische Prozesse der Zelle hervorgerufene Materialveränderung. So konnte der in der Polymerphysik seit etwa 70 Jahren bekannte Zusammenhang zwischen Temperatur und Fließverhalten von Polymerlösungen zum allerersten Mal in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Durch genaue Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit des zellulären Materials konnten neue charakteristische Materialeigenschaften, wie etwa die Aktivierungsenergie für den viskosen Fluss lebender Zellen erstmals bestimmt werden. Diese Materialparameter bilden neben der Bestimmung der Elastizität eine völlig neue Klasse von Eigenschaften, die zur Unterscheidung und Charakterisierung von Zellproben verwendet werden kann. Diese neuen Parameter in Kombination mit der entwickelten Netzwerkanalyse können deshalb zu neuen Analysemethoden seltener Zellen herangezogen werden.

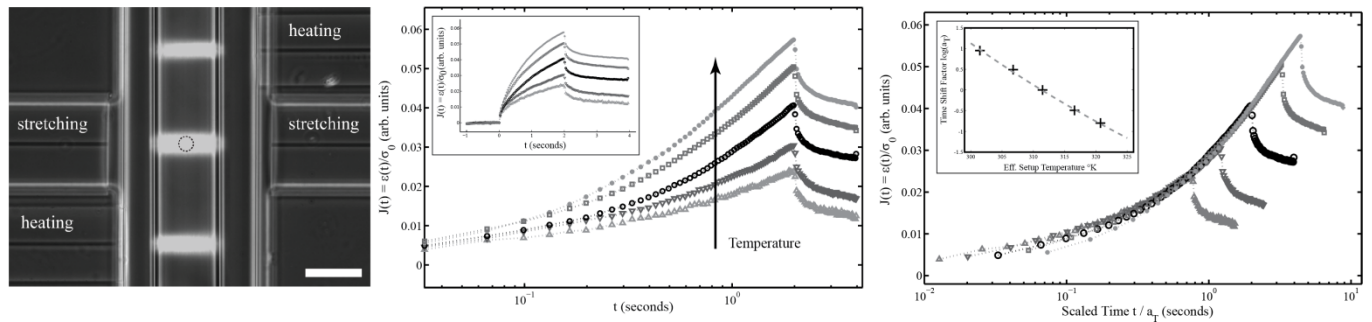


Abb. 13: Links: Mikroskopische Aufnahme eines speziell entwickelten Aufbaus zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf Optical Stretcher Messungen. Neben den im Optical Stretcher normalerweise verwendeten Lasern (stretching) wurden weitere optische Fasern (heating) eingebaut durch deren Hilfe in der Messregion befindliche Zellen binnen Millisekunden kontrolliert aufgeheizt werden können. Mitte: Beobachtete Deformationen bei verschiedenen Temperaturen in einem semi-logarithmischen Plot (inset: linearer Plot). Rechts: skalierte Deformationskurven können zu einer sogenannten Masterkurve reskaliert werden. (inset: verwendete Skalierungsfaktoren. Die Steigung ist proportional zur Aktivierungsenergie für den viskosen Fluss des Zellmaterials).

Verbindung der Optical Stretcher Technologie mit Fluoreszenzmikroskopie

Weiterhin wurde eine Kombination von Calcium Signalmessung mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie im Confokalen Laser Scanning Mikroskop und dem Optical Stretcher entwickelt. Dadurch war es erstmal möglich gleichzeitig kontaktfrei die Mechanik von suspendierten Einzelzellen zu messen und den Einstrom von Calcium sichtbar zu machen. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich ein Modellsystem von HEK293 Zellen, die mit dem hitzeaktivierten TRPV1 Ionenkanal transfiziert sind, zu untersuchen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass der Temperaturanstieg, der durch die Laser während einer gewöhnlichen Optical Stretcher Messung entsteht, ausreicht, um die Ionenkanäle zu öffnen. Auf diese Weise konnte während der Messung bei den Zellen ein massiver Calciumeinfluss getriggert werden. Durch Kontrollzellen ohne den TRPV1-Ionenkanals und durch geeignete Blocker bei den transfizieren Zellen kann dieses Signal gezielt vermindert oder unterdrückt werden. Die HEK293-TRPV1 Zellen stellen somit ein optimales Modellsystem für die Untersuchung des Calciumeinflusses auf die Zellen dar und bieten eine wichtige Ergänzung der Optical Stretcher Technologie.

Mit Hilfe HEK293-TRPV1 Zellsystemen und Optical Stretcher Messungen konnte ferner gezeigt werden, dass die mechanische Antwort auf Deformationen durch äußere Kräfte in suspendierten Zellen teilweise durch Calcium Signalkaskaden gesteuert wird. Zur Quantifizierung dieses Effekts wurde ein phänomenologisches Modell entwickelt, das eine Trennung von passiven und aktiven Einflüssen auf die Deformation der Zellen erlaubt.

In unseren Experimenten zeigen eine Reihe der transfizierten Epithelzellen Kontraktionen gegen die äußerlich anliegende, optisch induzierte Kraft. Durch Unterdrückung des Calcium Einflusses konnte die Verformung deutlich beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass die Aktivität der Zellen ausreicht, um die Veränderungen zu erklären, die Kontraktionen der Zellen wurden schwächer und traten seltener auf. Inhibition von Myosin Motoren, dem Hauptkandidaten für zelluläre Kontraktionen, konnte die Kontraktionen zwar ebenfalls abschwächen, anders als erwartet verschwanden sie allerdings nicht vollständig. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass Myosin zwar eine wichtige Rolle spielt, aber nicht der einzige Faktor bei der Generierung von kontraktile Kräften in suspendierten Zellen ist. Eine weitere wichtige Beobachtung geht aus den Veränderungen der Verteilungen der Verformungen hervor. In der Vergangenheit wurde

diskutiert, welcher funktionalen Gesetzmäßigkeit sie folgen würden. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich die Verteilung durch Manipulation der zellulären Aktivität stark beeinflussen lassen.

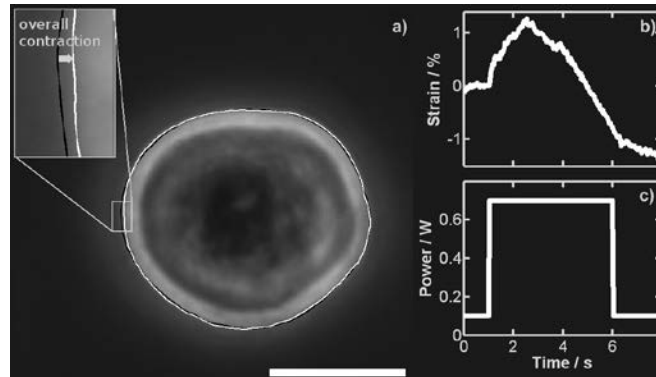


Abb. 14: a) Suspensierte Zelle, gefangen im Optical Stretcher. Der Einschub links zeigt die Vergrößerung des Zellrandes. Vom Beginn der Messung (schwarz markierter Zellrand) zum Ende (weißer Rand) zeigt sich eine deutliche Kontraktion. b) Verformung parallel zur Richtung der Laserausbreitung. c) Leistung pro Laserfaser. Die gemessene Verformung ist nicht allein mit passiven Materialeigenschaften der Zelle erklärbar.

Weiter Ergebnisse zum Optical Stretcher in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie

Wir konnten weiterhin zeigen, dass der Optical Stretcher in Kombination mit von Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden kann bestimmte Zellorganellen, wie z. B. den Zellkern, zu untersuchen. Aufgrund thermischer Erhitzung der Zellen durch Absorption des Laser Lichtes haben wir eine drastische Umstrukturierung des Zellkernes gefunden. Hierbei hat sich gezeigt, dass sich der Zellkern ab ca. 45 °C zusammenzieht und gleich wieder ausdehnt um bis zu 30 % seiner Ursprungsgröße. Diesen Effekt konnten wir im Optical Stretcher im Detail erforschen und auf seine thermischen Ursprünge, sowie des Einflusses von Langzeiterhitzung im Gegensatz zu Kurzzeiterhitzung zurückführen. Für die Langzeituntersuchungen temperierten wir den Objektisch auf den sich der OS befindet in einem Bereich von ca. 4 °C bis 45 °C mit einer Genauigkeit von 0,01 °C. Die Kurzzeit Temperatursprünge sind realisierbar durch zwei weitere Heiz-Laserfasern, die jeweils rechts und links neben den gegenüberliegend gerichteten Stretch-Laserfasern befestigt sind. Durch Absorption von Heiz-Laserlicht neben den gefangenen Zellen erhitzt sich die Zelle innerhalb weniger Millisekunden. Mithilfe dieser technischen Erweiterungen des Optical Stretchers, fanden wir heraus, dass bei kurzzeitigem Erhitzen der Umgebungstemperatur der Einzelzellen (mithilfe der Heiz-Laser), die Kernumstrukturierung immer bei der gleichen Temperatur induziert wurde. Dagegen erhöhte sich die Anfangstemperatur der Kernumstrukturierung, sofern die Umgebungstemperatur der Einzelzellen langsam erhöht wurde (mithilfe des temperierten Objektisches). Dies weist daraufhin, dass sich die Zellen, sofern sie genügend Zeit haben (mindestens 30 Minuten), biologisch an neue Umgebungszustände anpassen können und sich ihre biomechanischen Eigenschaften ändern. Der erweiterte Optical stretcher mit Heizlasern und temperierbarer Stage ist dahingehend sehr gut geeignet diese thermischen Anpassungsmechanismen tiefergründiger zu untersuchen.

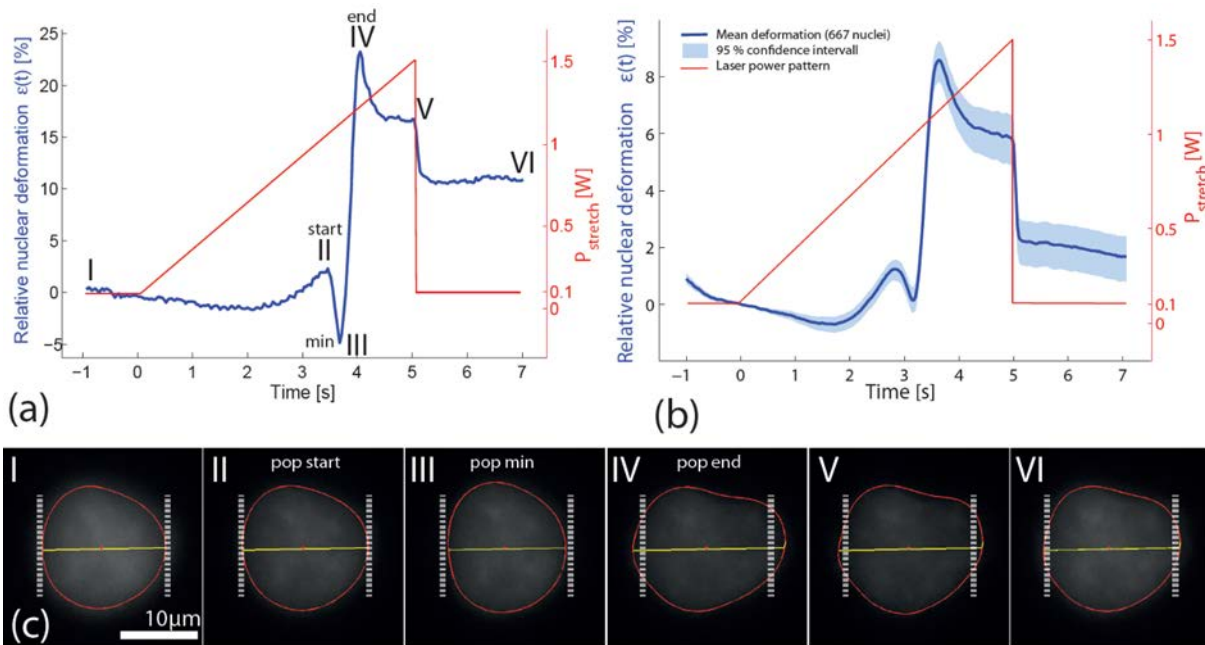


Abb. 15: Zellkernumstrukturierung im Optical Stretcher. (a): Deformationskurve (blau) eines Zellkerns als Antwort einer linear steigenden Laser Leistung (rot). Bei Punkt II beginnt die Umstrukturierung, bei III ist die minimale Kernaushdehnung erreicht, und bei IV die maximale, vergleichen Sie die Fluoreszenzbilder in (c). (b): Mittelwert der Deformationskurven von 667 Zellkernen, mit 95 %igem Konfidenzintervall.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Neben den Personalkosten und Reisemitteln sind ausschließlich Verbrauchsmittel innerhalb dieses Vorhabens verbraucht worden. Investitionen wurden nicht getätigt. Aus diesem Grund sollen hier kurz einige Positionen der Verbrauchsmittel erläutert werden:

Rechnung Nr. 20133703 vom 07.10.2013 der Firma ibidi GmbH: Kauf von Zellkulturschalen für die Kultivierung von Zellen für den Optical Stretcher

Rechnung Nr. 20133828 vom 14.10.2013 der Firma ibidi GmbH: Kauf von Farbstoffen für Zellen, um verschiedene Merkmale von Zellen bei der Optical Stretcher Messung durch Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Rechnung Nr. 1500815 RI vom 18.01.2013 der Life Technologie: Kauf von Farbstoffen für Zellen, um verschiedene Merkmale von Zellen bei der Optical Stretcher Messung durch Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Rechnung Nr. 31377 vom 18.05.2011 und Nr. 321059 vom 10.11.2012 der Firma Pinder: Kauf von Osram HBO Lampen für das Mikroskop zur Zellbeobachtung im Optical Stretcher.

Rechnung Nr. 90028694 vom 22.03.2012 der Firma Diamond: Kauf von High Power Steckern für den Optical Stretcher Aufbau und den mikrofluidischen Chip.

Rechnung Nr. FA2011300 vom 31.03.2011 der Firma Cyto: Kauf von Zellkulturplatten mit verschiedenen Geometrien. Hierbei werden Zellen auf Inseln verschiedener Formen kultiviert. Diese Formen zwingen den Zellen bestimmte Formen und Größen auf und werden anschließend im Optical Stretcher vermessen. Dadurch ist es möglich zu testen, ob der

entwickelte Optical Stretcher in der Lage ist verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Formen und Größen zu vermessen und dabei den gleichen Durchsatz und die gleiche Zuverlässigkeit zu erlangen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der vollautomatische Optical Stretcher bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung der Biophysik, Biologie und Medizin, ebenso wie im klinischen Bereich oder der industriellen Forschung. Ohne die o.g. Ergebnisse zur Durchsatzerhöhung des Optical Stretchers wäre es nicht möglich das Gerät kommerziell zu vermarkten, da die Anwendung zu langwierig wäre und die Anzahl der zu analysierenden Zellen zu gering. Des Weiteren konnten wir in diesem Vorhaben zeigen, wie vielfältig das Gerät eingesetzt werden kann, um Zellen Marker-frei auf ihre mechanischen Eigenschaften zu testen.

Da bisherige Zellanalysen in der Biologie und der Medizin auf den Einsatz von Markern, wie z.B. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe basieren, um spezifische Zelleigenschaften zu detektieren, ist unser Ansatz Zellen anhand ihrer mechanischen Eigenschaften zu charakterisieren völlig neu und erfordert einen Paradigmenwechsel in der Medizin und Zellbiologie. Gerade in dieser Hinsicht liefern unsere Ergebnisse einen wertvollen Beitrag, um Zelleigenschaften, für die es bislang keine Marker gibt, mit Hilfe des Optical Stretchers zu detektieren. Ohne die Förderung wäre es nicht möglich gewesen die vielfältigen Verbesserungen und die Durchsatzerhöhung zu erreichen. Auch sind durch diese Ergebnisse die Sichtbarkeit der Technologie deutlich verbessert worden und es konnten neue Kooperationen begonnen und Drittmittel eingeworben werden, wie im Folgenden erläutert. Weiterhin ist im Herbst 2013 die Firma Cellastix GmbH gegründet worden, die den Optical Stretcher nun kommerziell vertreibt.

4. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus diesem Forschungsvorhaben konnten genutzt werden, um verschiedene Drittmittelprojekte einzuwerben und die Firma Cellastix GmbH zu gründen:

1. EXIST-Forschungstransfer (Phase 1 und 2), gefördert durch den BMBF-PTJ. Innerhalb des Projekts, Phase 2, wurde Cellastix GmbH im Herbst 2013 gegründet.
2. SMWK-Projekt (Projektförderung im Forschungsbereich „Biotechnologie und Lebenswissenschaften“ des Sächsischen Staatsministeriums für Wissenschaft und Kunst (SMWK)): „Erforschung und Entwicklung eines Sortier-Chips zur Analyse seltener Zellen“
3. BMBF Verbundprojekt (Vorantrag eingereicht bei KMU innovativ – Nanotechnologie (NanoChance)): „Nano-Optische Einzelzell- und Zellsphäroid-Manipulation und Analyse“, zusammen mit LLS ROWIAK LaserLabSolutions GmbH, Fibotec Fiberoptics GmbH, co.don AG, Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik (iba) e.V. (Fachbereich Biowerkstoffe)

Weiterhin konnten einige neue Kooperationen basierend auf der Hochdurchsatz Optical Stretcher Technologie begonnen werden:

1. Prof. Dr. Dr. M. Höckel und Dr. S. Briest, Universitätsfrauenklinik Leipzig
In dieser Zusammenarbeit werden klinische Studien durchgeführt, um mittels Hochdurchsatz Optical Stretcher die Biomechanik von Brust- und Zervixtumoren zu erforschen.
2. Prof. Dr. J. Condeelis, Albert Einstein College New York, USA

Die Forschungsgruppe von Prof. John Condeelis beschäftigt sich mit der Tumorentwicklung und Metastasenbildung von Brustkrebs. Unter anderem fanden sie heraus, dass ein Gen (Men1NV) bei aggressiven und weit fortgeschrittenen Tumoren besonders stark exprimiert ist. Um zu überprüfen ob die starke Expression mit einer Änderung der mechanischen Eigenschaften verbunden ist, wurden Messungen vor Ort (New York) mit dem Optical Stretcher vollzogen. Dabei wurden primäre Proben von Mäusen aus einer kontrollierten Mauskolonie entnommen, aufbereitet und vermessen.

3. Prof. Dr. Ingolf Sack, Institut für Radiologie, Charité, Berlin

Die Kooperation beschäftigt sich mit dem Einfluss der mechanischen Eigenschaften von Glioblastomen. Hierbei werden verschiedene Methoden wie die NMR-Elastographie und der Hochdurchsatz Optical Stretcher eingesetzt, um den Einfluss der mechanischen Eigenschaften von Hirntumorgewebe und einzelnen Tumorzellen zu erforschen. Ziel dabei ist es weiterhin zu Analysieren, wie neue Methoden der Zell/Gewebemechanik komplementär eingesetzt werden können, um neue Erkenntnisse zur Tumorausbreitung und Tumoraggressivität zu gewinnen.

4. Nanosurf, Basel: Kooperation auf dem Gebiet der Zell- und Gewebemechanik

5. Der während des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderer Stelle

Der Optical Stretcher ist ein methodisch neuer, objektivierender Ansatz zur präzisen, quantitativen und automatischen Messung der Verformbarkeit von Zellen.

Derzeit werden keine Geräte kommerziell vertrieben, welche die globalen mechanischen Eigenschaften einzelner suspendierter Zellen kontaktfrei vermessen. Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) ist das einzige kommerziell erhältliche Gerät zur Messung der Zellmechanik. Allerdings bestimmt es nur die lokalen mechanischen Eigenschaften von adhären Zellen und benötigt zur manuellen Messung und zur Auswertung der Daten intensiv geschultes Fachpersonal. Die Durchsatzraten des AFMs sind nicht hoch genug, statistisch aussagekräftige Aussagen zu einer Zellpopulation zu machen.

Andere Technologien wie die Mikropipettenaspiration oder die Magnetkugelmikroskopie werden in den wissenschaftlichen Laboren an selbstgefertigten Apparaturen durchgeführt. Auch diese Verfahren verformen die Zellen lokal und müssen manuell betrieben werden. Dies erfordert einen hohen personellen Aufwand, ohne dabei die Durchsatzraten des Optical Stretchers zu erreichen.

Tab. 1: Vergleich von Forschungsgeräten zur Vermessung von Zellelastizität

Kriterium	Optical Stretcher	AFM	Mikropipetten- aspiration	Magnetkugel- rheologie
Durchsatz	5000 Zellen/Tag	20 Zellen/Tag	30 Zellen/Tag	20 Zellen/Tag
Detektion	Marker- und kontaktfrei	Markerfrei	Markerfrei	Anheftung magnetischer Kugeln an die Zellen
Ganzzellanalyse	Ja	Nein	Nein	Nein
Weiterverarbeitung der Zellen nach Analyse	Ja	Ja	Ja	Nein oder nur bedingt
Kosten	Gerät: 180.000 – 220.000 € (ohne Mikroskop)	Gerät: 150.000 – 400.000 €	Nicht kommerziell erhältlich, Eigenbauten	Nicht kommerziell erhältlich, Eigenbauten
Anbieter	Cellastix GmbH	JPK Instruments AG, Nanosurf, Oxford Instruments	-	-

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Erfolgte Veröffentlichungen:

1. T. R. Kießling, M. Herrera, K. D. Nnetu, E. M. Balzer, M. Girvan, A. W. Fritsch, S. S. Martin, J. A. Käs, W. Losert: Analysis of multiple physical parameters for mechanical phenotyping of living cells. *European Biophysics Journal*, Volume 42, Issue 5, 383–394 (2013)
2. Florian Huber, Jörg Schnauß, Susanne Rönicke, Philipp Rauch, Karla Müller, Claus Fütterer, Josef Käs: Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics*, Volume 62, Issue 1 (2013)
3. Kristin Seltmann, Anatol W. Fritsch, Josef A. Käs, Thomas M. Magin: Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *PNAS*, Volume 110, No. 46, 18507–18512 (2013)
4. Markus Gyger, Tobias Kießling, Roland Stange, Anatol Fritsch, Annette G. Beck-Sickingher, Mareike Zink, Josef A. Käs: Active contractions in single suspended epithelial cells. *European Biophysics Journal*, Volume 43, Issue 1, pp 11-23 (2014)

Geplante Veröffentlichungen in Kürze:

1. Roland Stange, Tobias Kießling, Anatol Fritsch and Josef Käs: Automated optical stretching of suspended cells for biomechanical characterization in a statistical way. Journal: Physical Review Applied
2. Erik W. Morawetz, Roland Stange, Tobias Kießling, Josef A. Käs: Optical stretching in continuous flows. Optics Express
3. Steffen Grosser, Anatol Fritsch, Tobias Kießling, Roland Stange and Josef A. Käs: Refractometry in a dual-beam optical trap. Optics Express

Beantragte Patente:

1. Patentanmeldung: „Charakterisierung lebender Zellen mittels thermorheologischer Kenngrößen als Zellmarker“, Erfinder: Tobias Kießling, Anatol Fritsch und Josef Käs. DE 102 012 211 735.0, WO 002 014 006 145 A1

Veröffentlichungen und Patente von Nebenprodukten/Projekten, die aus diesem Forschungsvorhaben hervorgegangen sind:

Erfolgte Veröffentlichungen:

1. Markus Gyger, Daniel Rose, Roland Stange, Tobias Kießling, Mareike Zink, Ben Fabry, Josef A. Käs: Calcium imaging in the optical stretcher. Optics Express, Volume 19, Issue 20, 19212-19222 (2011)
2. Tobias R. Kießling, Roland Stange, Josef A. Käs, Anatol W. Fritsch: Thermorheology of living cells—impact of temperature variations on cell mechanics. New Journal of Physics, Volume 15, Issue 4 (2013)
3. E. Warmt, T. Kiessling, R. Stange, A. Fritsch, M. Zink, J. Käs: Thermal Instability of Cell Nuclei. New Journal of Physics, in press

Geplante Veröffentlichungen in Kürze:

1. Franziska Wetzel, Anatol Fritsch, Steve Pawlizak, Tobias Kießling, Roland Stange, Lars-Christian Horn, Michael Höckel, Klaus Bendrat, Axel Niendorf, Maja Oktay, John Condeelis, Mareike Zink, Josef A. Käs: Significant biomechanical changes in clinical breast and cervical tumors samples. Nature

Beantragte Patente:

1. Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2010 041 912.5 "Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose von Krebserkrankungen durch Analyse der mechanischen Eigenschaften von Tumorzellen", eingereicht Oktober 2010, Erfinder: Josef Käs und Jochen Guck.