



BioRam® – Photonic fingerprinting®

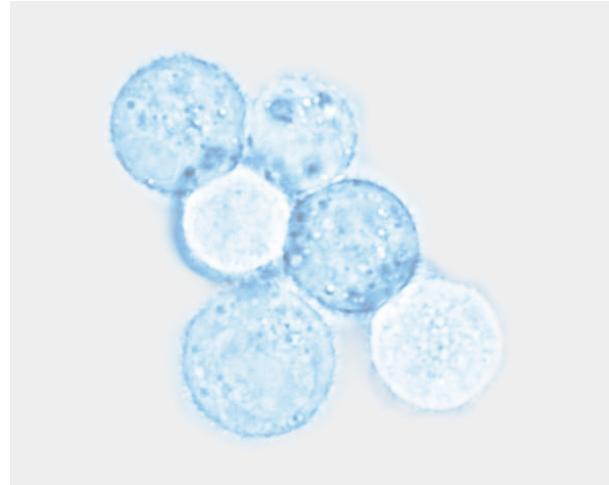
Raman-Spektroskopie für einzelne Zellen

BioRam: Einzelne Zellen ohne Marker identifizieren und charakterisieren

BioRam von CellTool bietet Biologen, Pharmazeuten und Medizinern einen unkomplizierten Zugang zur Welt der **Raman-Spektroskopie**.

Durch eine innovative Kombination von Raman-Mikroskopie, optischer Pinzette und speziellen Software-Algorithmen können **einzelne Zellen** sehr einfach, effizient und hochpräzise identifiziert und analysiert werden, frei von Antikörpern, Fluoreszenzfarbstoffen, biochemischen Markern oder Beads – **absolut schonend** für lebende Zellen.

Dies eröffnet völlig neue Möglichkeiten.



Der Schlüssel zum Erfolg: Reine Zellpopulationen – unverändert und vital

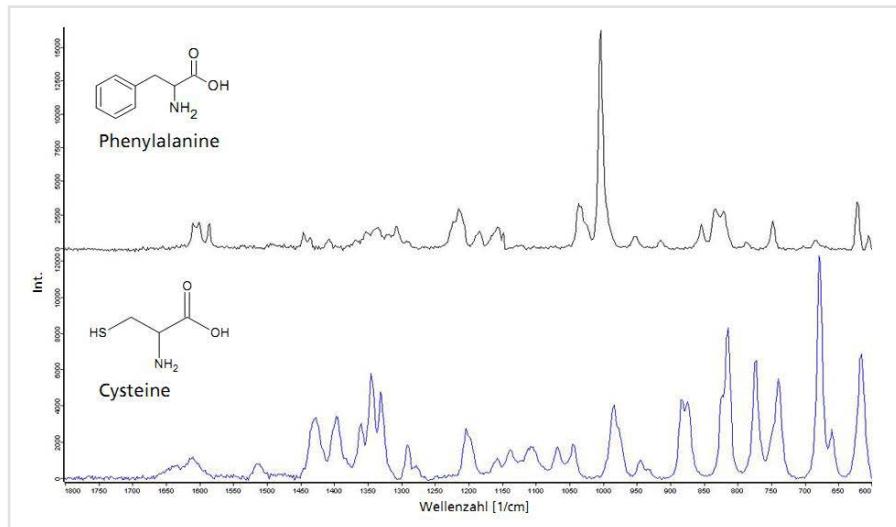
Mit BioRam von CellTool können Sie erstmals:

- | Zelltypen sowie Aktivitätszustände von **lebenden Zellen ohne Marker** bestimmen, unter physiologischen Bedingungen und sogar in Flüssigkeit
- | Stammzellen voneinander unterscheiden oder deren Differenzierungsgrad erkennen
- | Mit hoher Spezifität Zellen finden, die anhand von Oberflächenmarkern nicht eindeutig erkennbar sind, oder für die es keine Marker gibt
- | Mit hoher Sensitivität äußerst **seltene Zellen** in humanen Proben identifizieren
- | Mit **minimalen Probenvolumina** arbeiten
- | Die Zellen nach der Analyse in speziell entwickelten Fluidikchips schonend sortieren
- | Die Zellen anschließend in ihrem ursprünglichen Zustand weiter untersuchen – keine biochemische Belastung mit Markern, **kein physikalischer Stress** durch Scherkräfte u.a.
- | Zelluläre Abläufe in Zell- und Gewebezucht kontinuierlich beobachten und dokumentieren – **berührungslos**, auch während des Produktionsprozesses
- | Zell-Wirkstoff-Interaktionen in der Lebendzellkultur untersuchen

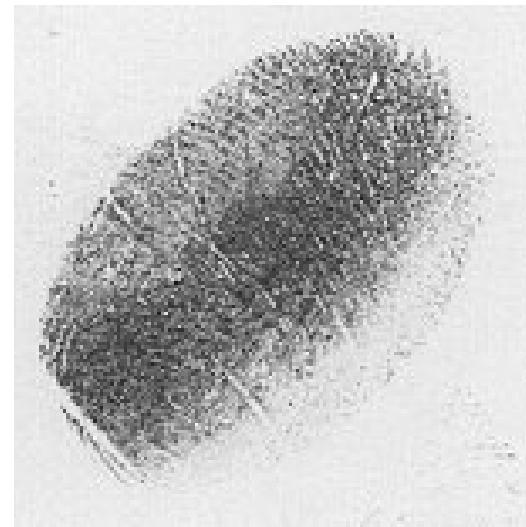
Das Prinzip: Zellen anhand ihres biophotonischen Profils erkennen

BioRam nutzt den Raman-Effekt: Wird ein Molekül mit Laserlicht bestrahlt, streut es einen Bruchteil des eingestrahlten Lichtes mit einer **Frequenzverschiebung**. Diese ist für das jeweilige Molekül so charakteristisch wie ein **Fingerabdruck**. In den Materialwissenschaften wird dieses Prinzip mit großem Erfolg zur berührungs- und zerstörungsfreien Materialcharakterisierung genutzt. Auch in der Biologie ist das Potenzial der Raman-Spektroskopie inzwischen nachgewiesen: Mehrere Teams haben unabhängig voneinander gezeigt, dass die Raman-Spektren aller Biopolymere einer Zelle je nach Zelltyp, Aktivitäts- oder Differenzierungszustand **klar erkennbare Cluster** bilden. Anhand dieser Cluster lassen sich Zellen durch einen softwarebasierten, automatischen Datenbankabgleich bestimmen. Anders als bei PCR- oder Marker-basierten Verfahren, kommen dabei auch Zellen ans Licht, nach denen nicht explizit mit Hilfe definierter Marker oder Sequenzen gesucht wurde.

Einer breiten Anwendung standen bisher die besonderen technischen Herausforderungen entgegen, die **biologische Proben** an die Raman-Spektroskopie stellen. Lebende Organismen rufen unerwünschte Fluoreszenzstrahlung hervor und zeigen sehr schwache **Raman-Signale**. Außerdem erfordern sie eine zellverträgliche Wellenlänge und kontrollierte physiologische Bedingungen während der Messung, um die Vitalität zu erhalten. CellTool hat in enger Kooperation mit der Universität Würzburg, Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin, diese Herausforderung gemeistert und stellt mit BioRam erstmals ein **robustes** und **zuverlässiges System** zur Raman-Spektroskopie bereit, das speziell auf die Bedürfnisse von Biologen, Pharmazeuten und Medizinern zugeschnitten und intuitiv zu bedienen ist.



Raman-Spektren von Aminosäuren (1)

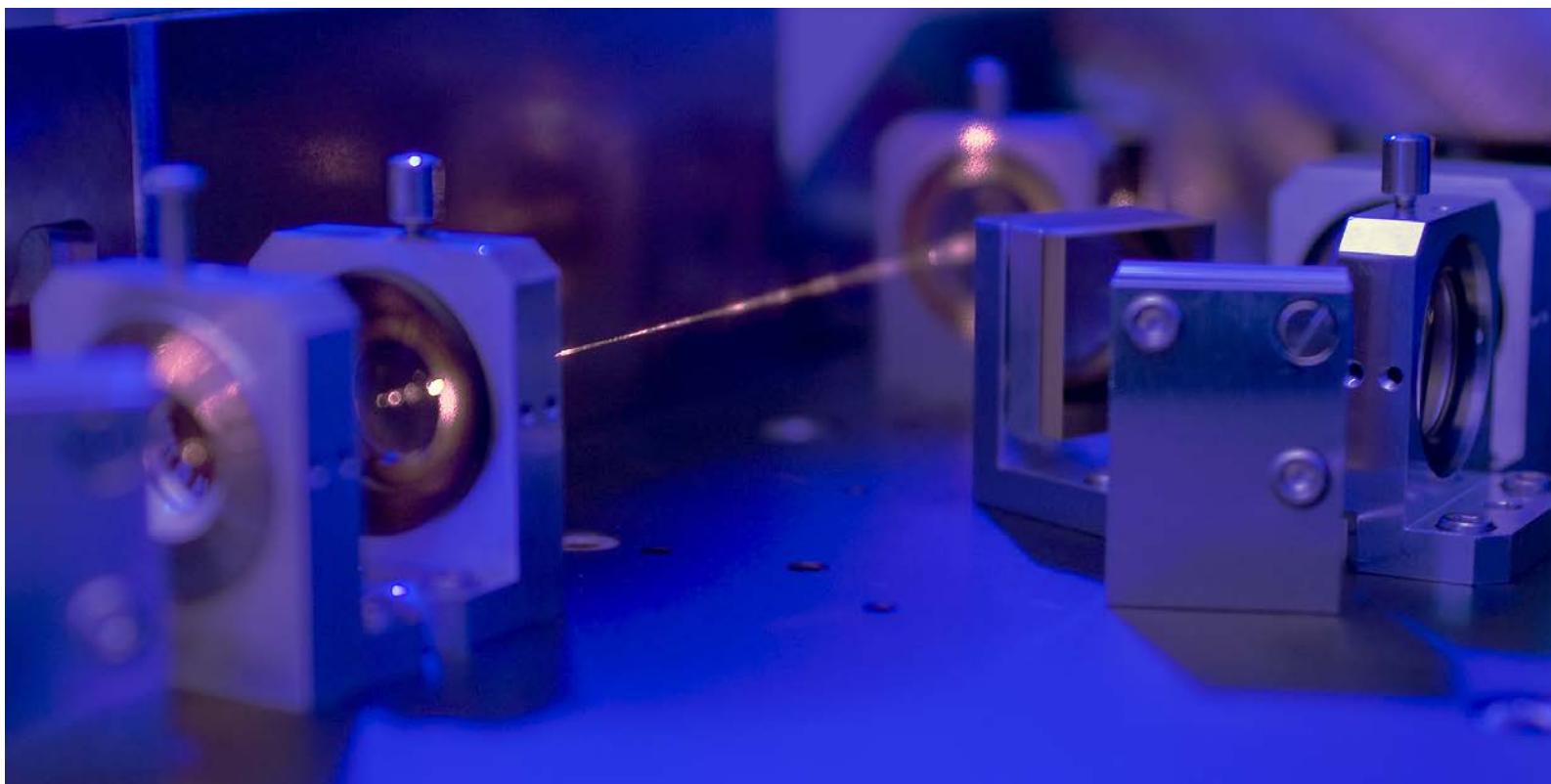


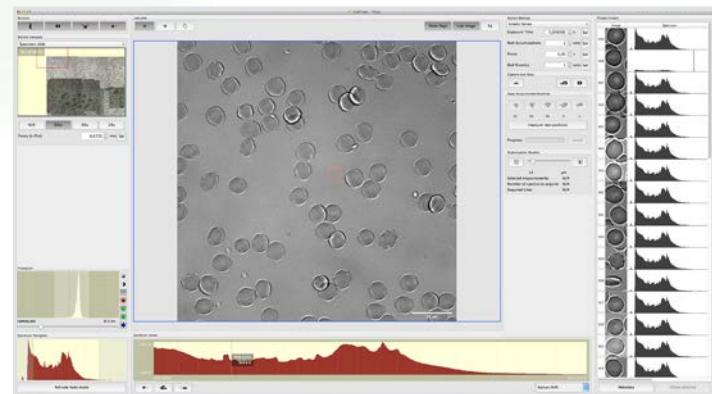
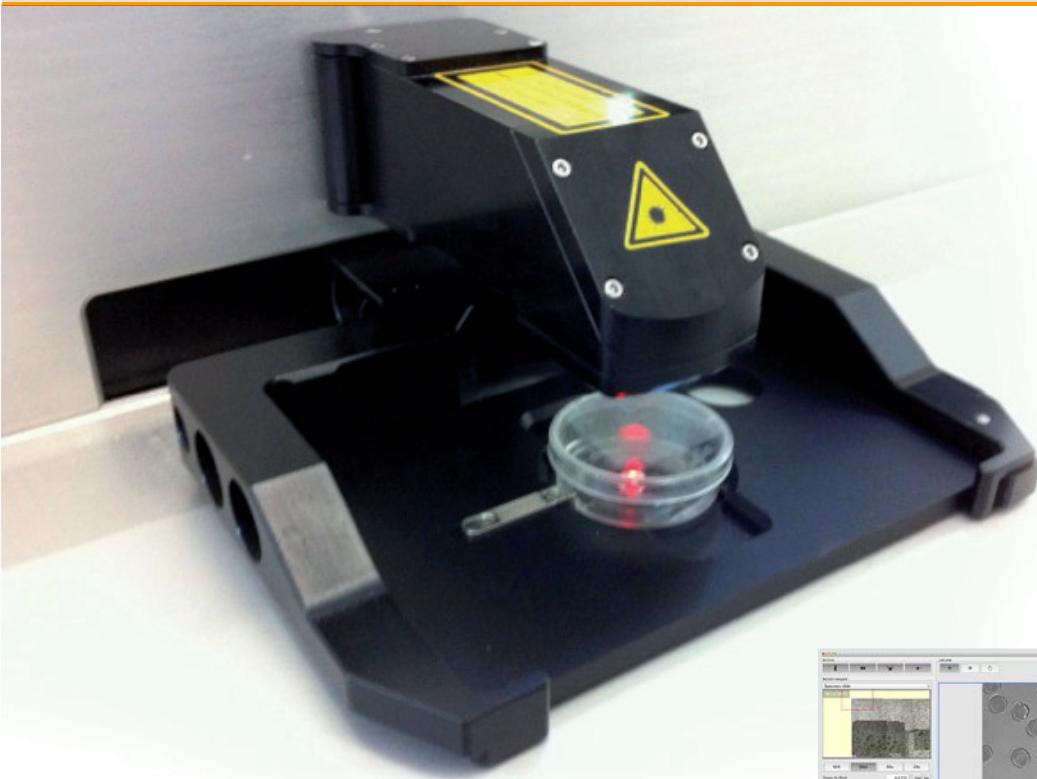
Das System: Maßgeschneidert für lebende Zellen

BioRam ist eine integrierte Plattform.

In ihrer Basisversion umfasst sie folgende Komponenten:

- | Leistungsfähiges Mikroskop im **kreativen Design**, das auch alle klassischen Verfahren ermöglicht: Durchlicht, Fluoreszenz, etc.
- | Halterung für lebende biologische Proben, temperierbar und kontaminationsgeschützt
- | Raman-Laser mit 785 nm – eine **optimale Wellenlänge** für biologische Proben: nicht zellschädigend, wird in wässrigen Lösungen kaum absorbiert, minimale Störeffekte
- | Elemente zur Strahlführung – **effizient**, sicher und stabil
- | Spektrograph, Detektionsbereich von ca. -100 cm^{-1} – 3.400 cm^{-1} mit ultrasensitiver CCD-Kamera
- | PC oder Mac mit **innovativer Software** zur automatischen Systemsteuerung (inkl. motorisiertem Mikroskopisch, Laserkontrolle, Shutter, Interlock-System und individuell konfigurierbarer Bedienoberfläche)
- | Spektrenbearbeitung und multivariate **Datenanalyse** für die Auswertung und zum Auffinden der spektralen Unterschiede in den Messdaten





Das Messverfahren: Einfach starten

Proben werden ohne spezielle Aufbereitung als lebendes Gewebe oder wässrige Lösung auf Raman-kompatible Objektträger aufgebracht. Alternativ können Zellen auch **direkt in Nährmedien** und Raman-kompatiblen Petrischalen oder **Mikrofluidik-Chips** analysiert werden. Mit einer 3D-Maus steuert man die zu untersuchenden Zellen an und löst per Mausklick die **automatische Aufnahme** der Raman-Spektren aus.

Dabei können die Koordinaten für weitere Messungen vorgemerkt und später automatisch wieder angefahren werden. Die aufgenommenen Spektren werden mit Hilfe spezieller Algorithmen ausgewertet und zur **Zellidentifikation** mit der **Datenbank** abgeglichen. Gleichzeitig werden ein Livebild sowie die Rohdaten und sämtliche Parameter zu Mikroskop- und Lasereinstellung gespeichert, so dass Messungen im Nachhinein überprüft werden können und die Daten jederzeit für alternative Auswerteverfahren zur Verfügung stehen.

Das Potenzial: Rasche, exakte Analysen und neue Anwendungen

BioRam leitet einen Paradigmenwechsel in der Zellerkennung und Zellsortierung ein.

Die Raman-Spektroskopie hat deutliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren und macht damit vieles möglich, was zuvor kaum denkbar war.

Uneingeschränkt vitale, kultivierbare Zellen

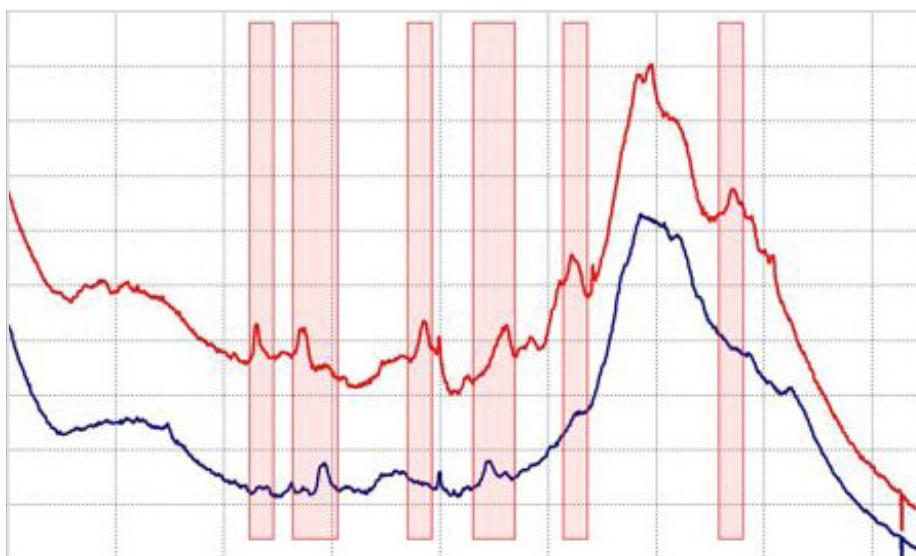
Anders als bei Zellerkennung mittels FACS oder MACS bleiben die Zellen bei BioRam **vital** und gehen **unverändert** aus der Analyse hervor – ohne Beladung mit magnetischen Beads, biochemischen Markern oder Fluoreszenzfarbstoffen. Damit bleiben sie **kultivierbar** und stehen für nachfolgende Untersuchungen uneingeschränkt zur Verfügung. So könnten **Krebszellen** zum Beispiel weiter charakterisiert oder direkt hinsichtlich ihrer Reaktion auf verschiedene **Wirkstoffe** analysiert werden (1).

Die Anwendungsmöglichkeiten reichen von der biologischen Forschung bis hin zur medizinischen Praxis, u.a. zur Unterstützung von **Diagnose** und **patientenspezifischer** Therapieentscheidungen.

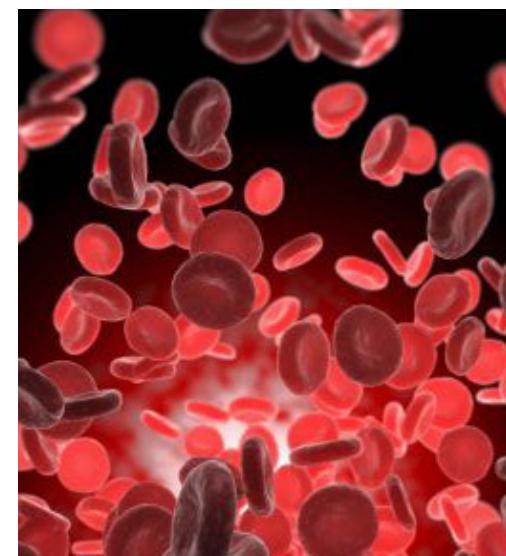
Eindeutige Ergebnisse, auch in Flüssigkeiten

Nicht alle Zellen lassen sich mit Hilfe von Oberflächenmarkern eindeutig unterscheiden. Bei der Charakterisierung solcher Zellen – insbesondere von Krebszellen und gesunden Zellen bzw. von Stammzellen und ausdifferenzierten Zellen – ist die **Raman-Spektroskopie** anderen Verfahren klar überlegen.

Sie liefert u.a. **eindeutige Ergebnisse** für Erythrozyten, Leukozyten, akute myeloische Leukämiezellen oder Brustkrebszellen (2,3). Damit können in der medizinischen Diagnostik pathogene Zellen im **Blut** sowie im unfixierten **Gewebe** oder **Biopsat** rasch und zuverlässig identifiziert werden. Ebenso können **Stammzellen** vergleichsweise einfach aus peripherem **Blut** oder aus **Nabelschnurblut** isoliert und in nativem Zustand für Forschung und Therapie bereitgestellt werden.



Raman-Spektren von verschiedenen Blutzellen



Das Potenzial: Schnelle und zerstörungsfreie Analyse, auch von Geweben

Künstlich gezüchtete Gewebe können mittels Bio-Ram erstmals nicht-invasiv analysiert werden – ein entscheidender Vorteil gegenüber herkömmlichen histologischen, immun-histochemischen oder bio-chemischen Methoden, die alle die Zerstörung und Aufbereitung des Gewebes erfordern.

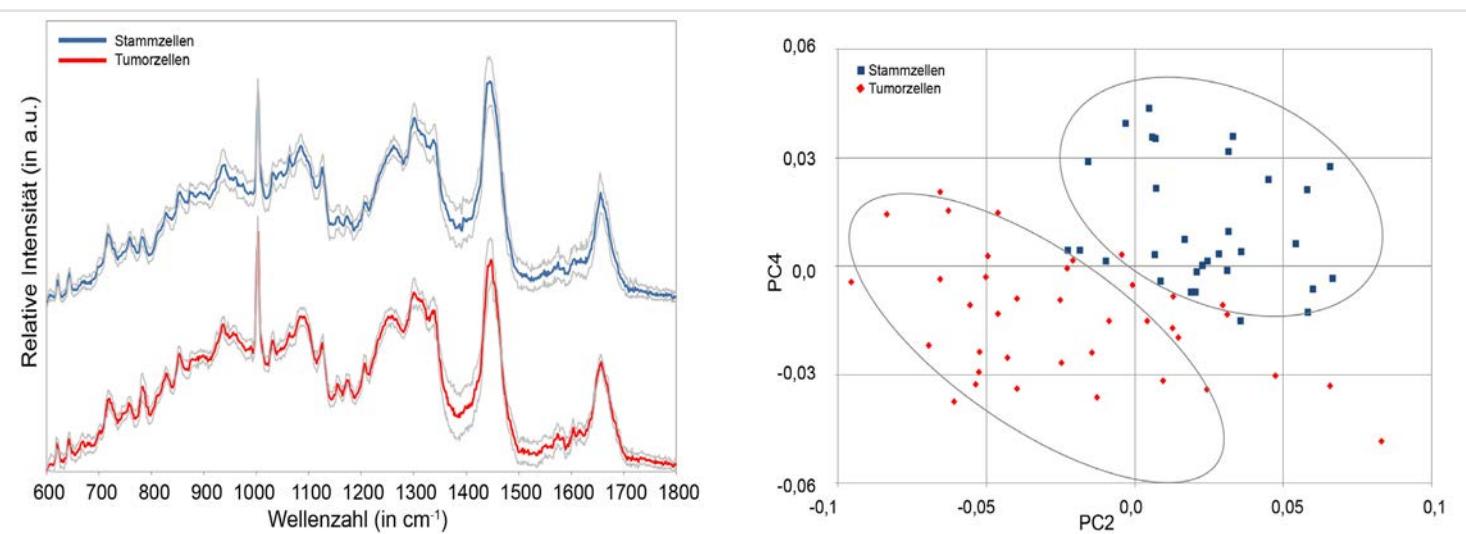
So wurden mit Hilfe der Raman-Spektroskopie z.B. bei autologen Knorpeltransplantaten die Vitalität und **Reinheit** der Knorpelzellen getestet und deren **Differenzierungsgrad** überprüft (4).

Lebende humane Hautfibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten sowie immortalisierte Keratinozyten wurden berührungslos und **schnell** erkannt und voneinander unterschieden, ohne deren Lebensfähigkeit zu beeinträchtigen (5).

In einer Kultur mesenchymaler **Stammzellen** konnte mit überragender **Spezifität** eine Kontamination mit stromalen Fibroblasten nachgewiesen werden (6). Dies eröffnet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten z.B. zum Monitoring und zur Qualitätskontrolle in der **Zellkultur** und im **Tissue Engineering**.



Transplantat aus autologem Knorpelbiopsat



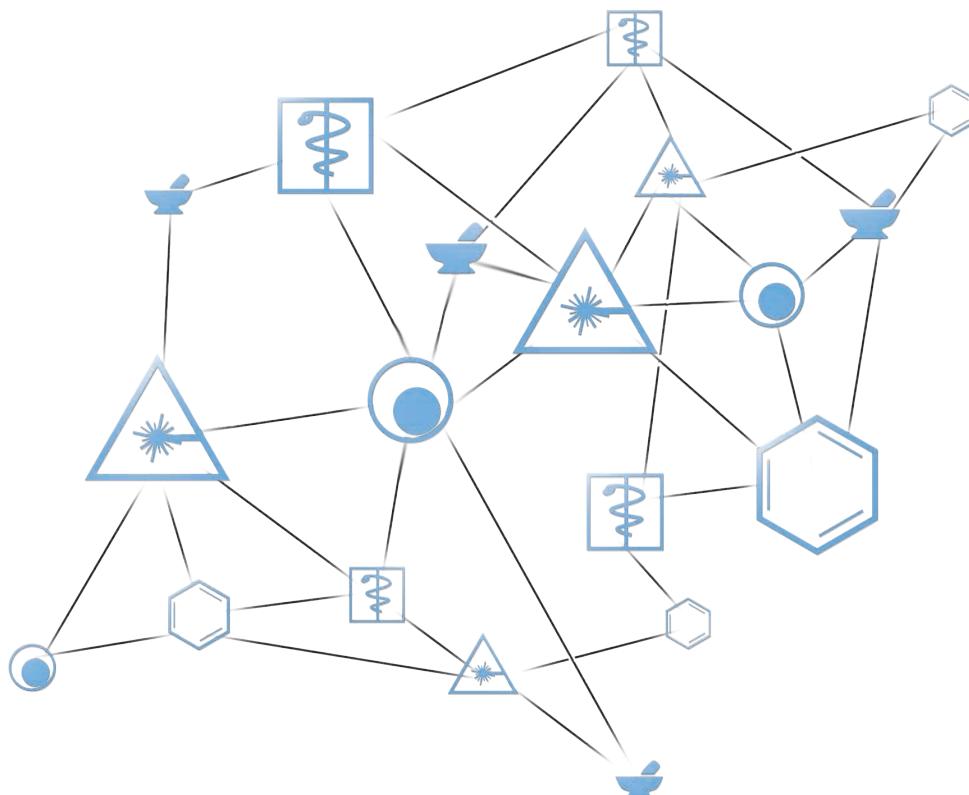
Typische Raman-Spektren von humanen Zellen und Clusterdarstellung

Experten-Netz: Wissen teilen und weiterentwickeln

CellTool's BioRam ist ein zielorientiert arbeitendes, **intuitiv** zu benutzendes System für den biologischen, medizinischen und pharmazeutischen Forscher und Anwender. Um das Potenzial der Raman-Spektroskopie für **biomedizinische Anwendungen** zu erschließen, arbeiten bei uns Physiker und Softwareingenieure eng mit Biologen und Medizinern zusammen, intern wie extern. Wir kooperieren mit **führenden Forscherteams** weltweit und setzen auf einen offenen Dialog mit unseren Kunden. Wir bieten nicht nur **fundierte Einführungen** in das System und fortlaufenden Support, sondern organisieren regelmäßig Seminare, um Erfahrungen zu diskutieren, Wissen zu teilen und **Neuentwicklungen** anzustoßen.

Modularer Aufbau, noch mehr Möglichkeiten:

Aufbauend auf der BioRam-Plattform entwickeln wir weitere Gerätesysteme, die speziell auf **unterschiedliche Anwendungsbereiche** zugeschnitten sind. Darunter ist ein System für die Raman-basierte pathologische Befundung, ein Gerät für die Sterilitätsprüfung flüssiger Proben sowie eine „Workstation“, bei der die Raman-Spektroskopie mit Laser-Mikromanipulation kombiniert wird, um Zellen zu differenzieren, die mit der Raman-Spektroskopie allein nicht unterscheidbar sind. Außerdem liefern wir unseren Kunden die benötigten, **Raman-kompatiblen Verbrauchsmaterialien** wie Objektträger, Petrischalen und **Fluidik-Chips**.



CellTool: Das Management



Dr. Karin Schütze, Gründerin und Geschäftsführung (CSO), ist Biologin und Expertin auf dem Gebiet der berührungslosen Manipulation und spezifischen Anreicherung von Zellen basierend auf innovativen, photonischen Technologien. Als Mitgründerin und Leiterin der Abteilung Forschung und Entwicklung der ehemaligen PALM GmbH war sie verantwortlich für die Entwicklung komplexer, photonischer Technologien zu bedienerfreundlichen Systemen und hat sich insbesondere für deren Anwendung in der Zellforschung und Zelltherapie spezialisiert.



Raimund Schütze ist Goldschmiedemeister und studierte mehrere Semester Mathematik und Physik sowie Elektrotechnik. Er war Mitgründer und Geschäftsführer bzw. Vorstand der ehemaligen PALM GmbH. Die operative Erfahrung und technischen Fähigkeiten von Herrn Schütze sind von grundlegender Bedeutung für die Präzision und die Funktionsweise der CellTool Systeme.

CellTool: Die Firma

Die CellTool GmbH entwickelt, produziert und vertreibt innovative Systeme für die berührungslose und marker-freie Erkennung, quantitative Charakterisierung und schonende Sortierung von lebenden Zellen mit Hilfe der Raman-Spektroskopie.

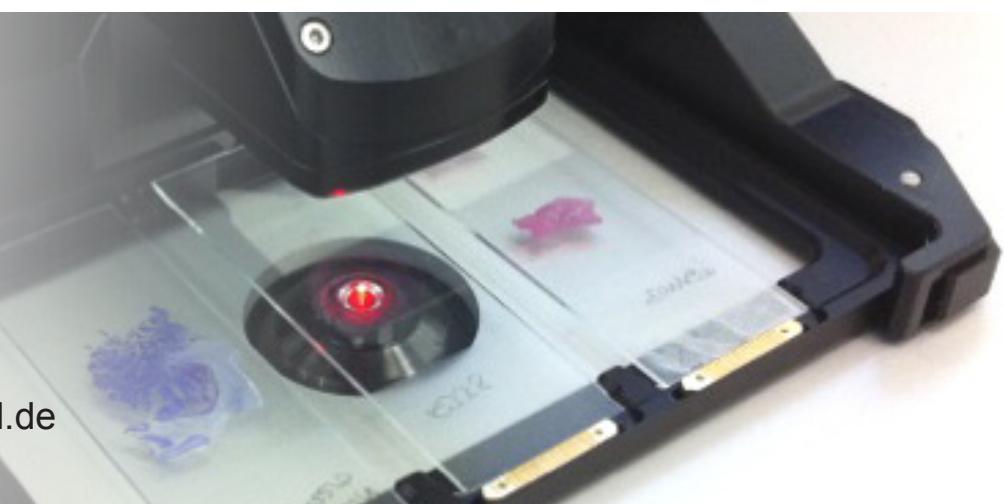
CellTool Systeme sind speziell an die Anforderungen von Biologen und Medizinern angepasst. Sie sind extrem benutzerfreundlich. Die Handhabung von Zellen und Zell-Messungen sind hoch automatisiert. In Kombination mit der innovativen Mikrofluidik können Zellen in physiologischer Umgebung charakterisiert und für Downstream-Anwendungen lebensfähig gehalten werden. Anwendungen können dabei die schnelle Diagnose, das patientenspezifische Wirkstoffscreening oder die individualisierte Zelltherapie sein.

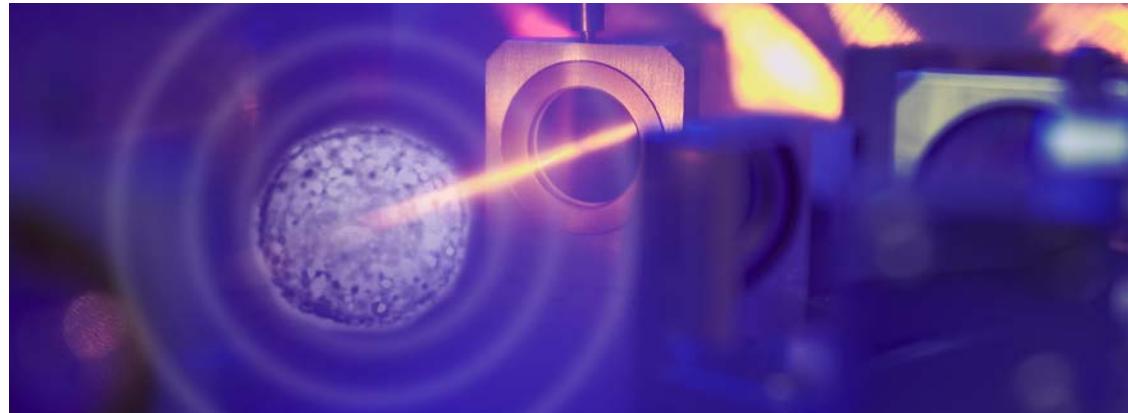
Kontakt

CellTool GmbH
Am Neuland 1
82347 Bernried

Tel.: +49 8158 90640 10
Fax: +49 8158 90640 29

E-Mail: info-celltool@celltool.de
Webseite: www.celltool.de





Ausgewählte Publikationen

- (1) Evaluierung der Raman Spektroskopie für die marker- und zerstörungsfreie Qualitätskontrolle im Tissue Engineering.
Steffen Koch (2010) Fraunhoferverlag ISBN: 978-3-8396-0112 – 9
- (2) Nondestructive Identification of Individual Leukemia Cells by Laser Trapping Raman Spectroscopy.
James W. Chan et al. Anal. Chem. (2008) 80: 2180 – 2187
- (3) Tumour cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments.
Sebastian Dochow et al. Lab Chip (2011) 11: 1484
- (4) Raman spectroscopy as a tool for quality and sterility analysis for tissue engineering applications like cartilage transplants.
Marieke Pudlas et al. Int J Artif Organs (2010) 33,3: 228 – 237
- (5) Raman Spectroscopy: A Noninvasive Analysis Tool For The Discrimination of Human Skin Cells. Marieke Pudlas et al.
Tissue Engineering (2011) C 17,10: 1027 – 1040
- (6) Non-contact discrimination of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibroblasts using Raman spectroscopy.
Marieke Pudlas et al. Medical Laser Application (2011) 26: 119 – 125

Bildverzeichnis

- S2: Osteosarcoma Zellen - Steffen Koch, Fraunhofer IGB Stuttgart
S3: Raman-Spektren – Steffen Koch (2010) Fraunhoferverlag ISBN: 978-3-8396-0112-9
S4: Strahlengang Raman-Laser – Carsten Bolwien, Fraunhofer IPM Freiburg
S6: Spektren von verschiedenen Blutzellen – Steffen Koch, Fraunhofer IGB Stuttgart
S7: Transplantat aus autologem Knorpelbiopsat, vor und nach der Implantation
Heike Walles, Fraunhofer IGB Stuttgart
S7: Typische Raman-Spektren von mesenchymalen Stammzellen und Osteosarkoma-Zellen
mit Clusterdarstellung nach statistischer Analyse – Marieke Pudlas, Fraunhofer IGB Stuttgart
S9: Mesenchymale Stammzellen und Laserstrahl – Steffen Koch und Carsten Bolwien

BioRam – Photonic fingerprinting[®]

Raman-Spektroskopie für einzelne Zellen

- | BioRam[®] ist eine innovative Kombination von Mikroskopie, Raman-Spektroskopie und Daten Analyse für biologische und medizinische Anwendungen.
- | Mit dem BioRam[®] können alle Arten von Mikroorganismen, fixierte oder lebende Zellen, histologische Gewebe-Schnitte, Zelllinien, primäre Zellen und Gewebe ohne Markierung und unter physiologischen Bedingungen untersucht werden.
- | BioRam ermöglicht die Erkennung seltener Zellen in humanen Proben mit hoher Spezifität.
- | Keine Scherkräfte, kein physikalischer Stress, kleine Probenvolumina – Zellen bleiben unverändert für nachfolgende Anwendungen.
- | Einfacher Zugang zur hohen Informationsdichte von Raman-Spektren biologischer Proben – optimiert und angepasst auf die Erfordernisse von Biologen und Medizinern.

