

## Methoden der Bildgebung

# Maßgeschneiderte Methoden und Technologien für *high content imaging*

DANIEL GILBERT

LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE BIOTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

High content imaging has become an indispensable and probably the most frequently applied research tool in modern cell biology. To make use of its versatile applicability, the available instrumental infrastructure has to meet specific requirements which are defined by the employed experimental approach and increase along with the complexity of the assay technique used for assessing a specific biological question. Exemplary assay techniques and technology of various complexity are portrayed in this article.

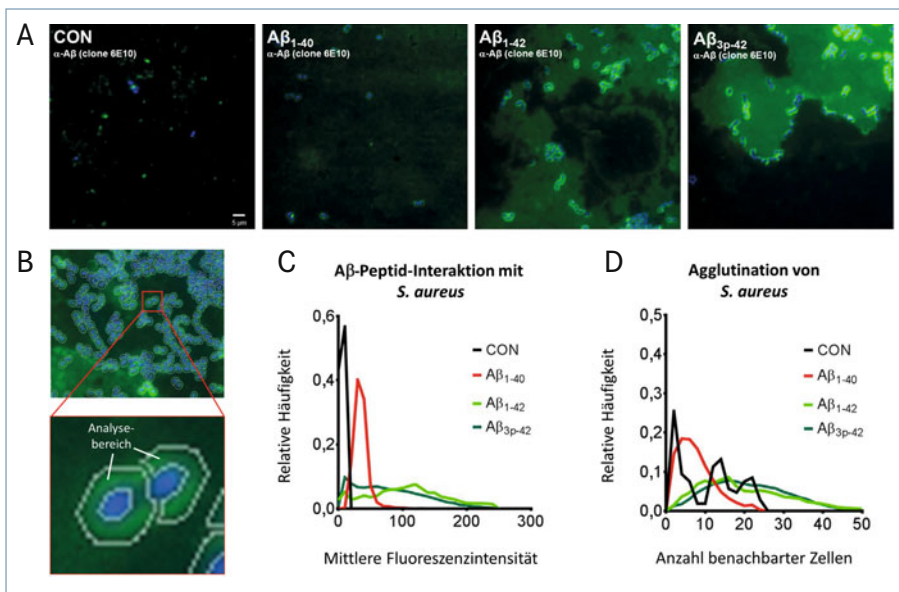
DOI: 10.1007/s12268-017-0798-0  
© Springer-Verlag 2017

■ Abhängig von der biologischen Fragestellung, vom Zustand der zu untersuchenden Proben (fixiert oder vital) und der daraus abzuleitenden Rückschlüsse sowie von der

Anzahl der aufzuzeichnenden Bilder, lassen sich für zellbasiertes *high content imaging* grob drei verschiedene experimentelle Abläufe, die Assay-Typen, unterscheiden, die jeweils eine geeignete Imaging-Infrastruktur voraussetzen: (1) die Momentaufnahme oder *endpoint*-Analyse, (2) Langzeitanalysen langsamer dynamischer Prozesse und (3) funktionelle Analysen schneller physiologischer Abläufe.

### Endpoint-Analyse

Ein generischer zellbasierter Assay, der häufig zur Anwendung kommt, basiert auf der Analyse von Momentaufnahmen oder *endpoints*. Hierbei werden Zellen nach einer Vorbehandlung – z. B. einer genetischen Modifikation oder einer Wirkstoffexposition – mit Farbstoffen, die intra- oder extrazelluläre Strukturen bzw. Moleküle sichtbar machen, behandelt und anschließend in fixiertem oder lebendigem Zustand abgelichtet. Mit dieser Methodik haben wir kürzlich den Einfluss von Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )-Peptidvarianten auf die antimikrobielle Aktivität und Agglutination von Bakterien und des Hefepilzes *Candida albicans* untersucht [1]. A $\beta$ -Peptide haben große Bekanntheit im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit erlangt, da sie einen Hauptbestandteil von Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten ausmachen. Sie wurden aber auch in anderen Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen, weshalb für sie eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr vermutet wird. Um diesen Aspekt zu studieren, haben wir unterschiedliche Erregerarten mit A $\beta$ -Peptidvarianten behandelt und anschließend fixiert. Die Proben wurden im nächsten Schritt mit einem A $\beta$ -Peptid-spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörper sowie mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt und die Präparate mit einem *high content imaging*-System automatisiert abgelichtet. Die generierten Bilddaten (**Abb. 1A**) wurden abschließend mit einem vom Autor entwickelten und speziell angepassten Zellerkennungsalgorithmus quantitativ analysiert [2]. Für diese Studie



▲ **Abb. 1:** Endpoint-basierte Analyse der Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )-induzierten mikrobiellen Agglutination. **A**, Fluoreszenzaufnahmen von mittels Hoechst 33342 (blau, DNA) und Antikörpern markierten (grün, Peptid) Bakterien sowie einer Erreger-freien Kontrolle (CON), welche zuvor mit verschiedenen A $\beta$ -Peptiden (A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub> und A $\beta$ <sub>3p-42</sub>) behandelt wurden. **B**, Zur bildbasierten Analyse der Peptid-Erreger-Interaktion und der Agglutination ist ein vom Autor maßgeschneiderter Algorithmus zum Einsatz gekommen, der Fluoreszenzsignale in einem definierten Bildbereich im Umkreis automatisch erkannter Bakterien selektiv vermisst. **C**, **D**, exemplarische Häufigkeitsverteilungen der mittleren Fluoreszenzintensität (C, gemessen in Analysebereichen wie dargestellt in B) und der Anzahl benachbarter Zellen (D) für die eingesetzten A $\beta$ -Peptide als Maß für die Peptid-Erreger-Interaktion und Agglutination von *Staphylococcus aureus*. Modifiziert aus [1].

wurde der Algorithmus spezifisch parametrisiert, um automatisiert Bakterienzellen zu erkennen und Fluoreszenzsignale in einem definierten Bildbereich im Umkreis der Bakterien selektiv zu vermessen (**Abb. 1B**). Hierbei wurde einerseits die Intensität des Antikörper-Fluoreszenzsignals in einem ringförmigen Bereich um die Bakterien als Indikator der Bakterien-Peptid-Interaktion analysiert (Analysebereich in **Abb. 1B**) und andererseits die Anzahl benachbarter Zellen eines Bakteriums in einem definierten Bildbereich als Maß der Zelldichte und Agglutination erhoben. Häufigkeitsverteilungen der ermittelten Fluoreszenzintensitäten und Zelldichtewerte, welche die Interaktion und den Einfluss der Peptide auf die Agglutination der Erreger erkennen lassen, sind in **Abbildung 1C** gezeigt. *Endpoint*-Analysen dieser Art erlauben die Bearbeitung einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Fragestellungen, mit einfacher, für die Fluoreszenzmikroskopie ausgelegter Infrastruktur. Dennoch liefert der Ansatz nur eine Momentaufnahme und damit ein stark eingeschränktes Bild der vielfältigen Prozesse, die in einer Zelle ablaufen.

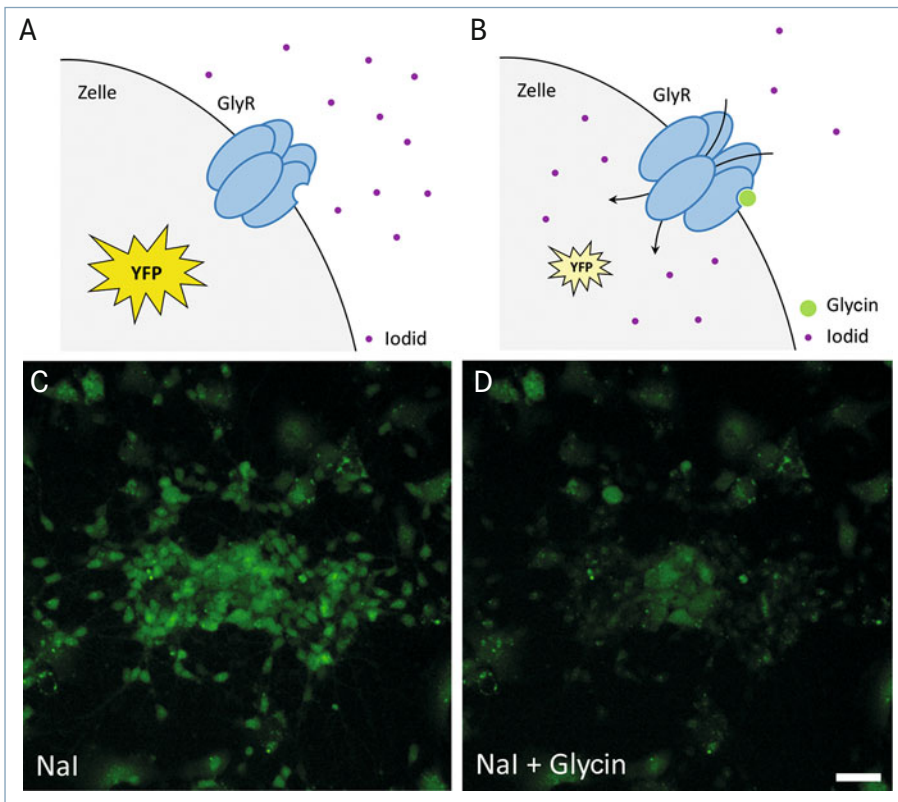
### Langzeituntersuchungen lebender Zellen

Einen Einblick in langsame dynamische Prozesse in Zellen, wie beispielsweise die Zellteilung, Morphogenese oder Migration, liefert das zeitaufgelöste *high content imaging*. Hierbei werden Zellen über mehrere Stunden, Tage oder Wochen wiederholt abgelichtet. Die generierten Bilddaten werden anschließend in einem Zeitraffervideo kombiniert, das Prozesse visualisiert, die dem menschlichen Auge ansonsten verborgen bleiben. Für Langzeituntersuchungen sind speziell ausgestattete, automatisierte Mikroskope mit Klimakammer erforderlich, die eine Kontrolle der Umweltbedingungen, wie die Temperatur und Gaszusammensetzung in der Atmosphäre, ermöglicht. Als Beispiel dafür, dass diese spezielle Technologie bei Bedarf auch kostengünstig maßgeschneidert werden kann, haben wir in unserem Labor unter Verwendung von *rapid prototyping*-Technologien einen tragbaren und extrem kostengünstigen Prototyp eines Langzeitmikroskops entwickelt und damit in einer *Proof-of-Concept*-Studie den Einfluss fötalen Kälberserums auf die

Proliferationsrate von Kulturzellen untersucht [3].

### Funktionelles Imaging

Schnelle dynamische Prozesse, die beispielsweise für die Sinneswahrnehmung und Interaktion mit der Umwelt eine wichtige Rolle spielen, lassen sich mithilfe der funktionellen Analyse lebender Zellen untersuchen. Auch hierfür kommen häufig Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die aber gegenüber den für Momentaufnahmen verwendeten Farbstoffen einen entscheidenden Unterschied aufweisen: Sie reagieren auf eine Änderung der Umwelt- bzw. experimentellen Bedingungen mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Für die funktionelle Analyse werden die Zellen vor der Mikroskopie mit einem Farbstoff ausgestattet. Dies geschieht entweder durch Inkubation der Zellen in einer Farbstofflösung oder durch genetische Modifikation. Anschließend werden die Zellen unter veränderlichen Bedingungen wiederholt abgelichtet und anhand der gemessenen Fluoreszenzänderung auf die Aktivität des untersuchten Proteins oder Mechanismus rückgeschlossen. Mit diesem Ansatz haben wir in der Vergangenheit die Eigenschaften von Glycinrezeptor (GlyR)- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptor(GABA<sub>A</sub>R)-Chloridkanälen untersucht und in Hochdurchsatz-Wirkstoffscreening-Experimenten spezifische GlyR-Modulatoren identifiziert [4–6]. Diese Ionenkanäle wirken inhibierend auf die Übertragung von Nervensignalen zwischen Nervenzellen und spielen daher eine wichtige Rolle für die neuronale Aktivität im Zentralnervensystem sowie im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, wie Epilepsie, Lern- und Gedächtnisstörungen oder Neurodegeneration, aber auch neuropathischem Schmerz und chronischer Schmerzsensibilisierung. Für die funktionelle Analyse dieser Ionenkanäle kommt in unserem Labor ein Halogenid-sensitives, gelb fluoreszierendes Protein (YFP) zum Einsatz, welches durch genetische Modifikation in ein geeignetes Zellmodell eingebracht wird und dessen Fluoreszenzsignal bei einer Erhöhung der intrazellulären Halogenidionenkonzentration mit einer Abnahme des Fluoreszenzsignals reagiert. Im Verlauf der funktionellen Analyse werden die Zellen wiederholt abgelichtet: einmal im Ausgangszustand und einmal nach Zugabe einer Testlösung, die



▲ **Abb. 2:** Funktionelle Analyse von Ionenkanälen. **A, B,** Prinzip der fluoreszenzbasierten funktionellen Analyse von Glycinrezeptor-Chloridkanälen (GlyR). Im nicht-aktivierten Zustand ist der Glycinrezeptor-Chloridkanal geschlossen und die Intensität des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) in den Zellen groß (A). Wird der Rezeptor durch Bindung seines Agonisten Glycin aktiviert, öffnet der Ionenkanal und Anionen (hier: Iodidionen) strömen in das Zellinnere. Diese bewirken durch *collisional quenching* mit dem YFP-Molekül eine Abnahme des zellulären Fluoreszenzsignals (B). **C, D,** Bilder von YFP-I152L-exprimierenden neuronalen NT2N-Zellen vor (C) und nach der Zugabe des Agonisten Glycin (D). Ein Vergleich der einzelzellbasierten Fluoreszenzsignale vor und nach der Zugabe der Testlösung ermöglicht eine Aussage zur Funktion des untersuchten Rezeptors. Größenmarker: 50 µm. Modifiziert aus [8].

einerseits Iodidionen und andererseits einen Agonist, das heißt einen Aktivator des zu untersuchenden Rezeptors bzw. Ionenkanals, wie Glycin oder GABA, enthält. Infolge der Rezeptoraktivierung strömen Anionen in das Innere der Zelle und verursachen durch *collisional quenching* mit dem YFP-Molekül eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Eine nachfolgende Bildanalyse der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen ermöglicht Rückschlüsse auf die Aktivität bzw. Eigenschaften des untersuchten Rezeptors. Werden der Testlösung weitere Substanzen beigefügt, die z. B. die Rezeptoraktivierung unterbinden oder verstärken, lassen sich mit dieser Methode spezifische Rezeptormodulatoren identifizieren. **Abbildung 2** zeigt das Prinzip für funktionelle Untersuchungen von GlyR sowie Fluoreszenzaufnahmen von YFP-Zellen, die mit dem Farbstoff ausgestattet wurden. Aufgrund des großen logistischen und zeitlichen Aufwands für die Vorbereitung und Durchfüh-

rung funktioneller Experimente, kann diese Methodik als der komplexeste Assay-Typ bezeichnet werden. Entsprechend erfordert er eine komplexe Infrastruktur, die veränderliche Bedingungen, z. B. durch Lösungswechsel mithilfe von *liquid-handling*-Systemen, schaffen kann. Als Beispiel dafür, dass erforderliche Komponenten für diese spezielle Technologie bei Bedarf kostengünstig maßgeschneidert werden können, haben wir unter Verwendung von *rapid prototyping*-Technologien ein System entwickelt, welches für auto-

matisierte funktionelle Analysen im Hochdurchsatz in unserem Labor zum Einsatz kommt [7].

In allgemeiner Betrachtung nimmt mit zunehmender Komplexität des experimentellen Ablaufs auch die Anforderung an die eingesetzte Hardware zu. Bioassay und eingesetzte Technologie werden maßgeblich von der zu bearbeitenden biologischen Fragestellung bestimmt. Letztlich erfordert daher jede neue und einzigartige biologische Fragestellung auch jederzeit aufs Neue vom zellbiologisch orientierten Experimentator einen neuartigen und individuellen experimentellen Ansatz und maßgeschneiderte *high content imaging*-Technologie. ■

## Literatur

- [1] Spitzer P, Condic M, Herrmann M et al. (2016) Amyloidogenic amyloid- $\beta$ -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. *Sci Rep* 6:32228
- [2] Gilbert DF, Meinhof T, Pepperkok R et al. (2009) DetecTiff: a novel image analysis routine for high-content screening microscopy. *J Biomol Screen* 14:944–955
- [3] Walzik MP, Vollmar V, Lachnit T et al. (2015) A portable low-cost long-term live-cell imaging platform for biomedical research and education. *Biosens Bioelectron* 64:639–649
- [4] Balansa W, Islam R, Gilbert DF et al. (2013) Australian marine sponge alkaloids as a new class of glycine-gated chloride channel receptor modulator. *Bioorg Med Chem* 21:4420–4425
- [5] Gilbert DF, Islam R, Lynch T et al. (2009) High throughput techniques for discovering new glycine receptor modulators and their binding sites. *Front Mol Neurosci* 2:17
- [6] Talwar S, Lynch JW, Gilbert DF (2013) Fluorescence-based high-throughput functional profiling of ligand-gated ion channels at the level of single cells. *PLoS One* 8:e58479
- [7] Schneidereit D, Kraus L, Meier JC et al. (2016) Step-by-step guide to building an inexpensive 3D printed motorized positioning stage for automated high-content screening microscopy. *Biosens Bioelectron* 92:472–481
- [8] Kuenzel K, Friedrich O, Gilbert DF (2016) A recombinant human pluripotent stem cell line stably expressing halide-sensitive YFP-I152L for GABAAR and GlyR-targeted high-throughput drug screening and toxicity testing. *Front Mol Neurosci* 9:51

## Korrespondenzadresse:

Dr. Daniel F. Gilbert  
Lehrstuhl für Medizinische Biotechnologie  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Paul-Gordan-Straße 3  
D-91052 Erlangen  
Tel.: 09131-8523286  
Fax: 09131-8523002  
daniel.gilbert@fau.de  
www.mbt.techfak.uni-erlangen.de

## AUTOR



### Daniel F. Gilbert

Jahrgang 1974. 1995–2002 Biologiestudium an der Universität Köln. 2003–2006 Promotion an der Universität Heidelberg. 2006–2008 Postdoc an der University of Queensland in Brisbane, Australien. 2008–2011 Postdoc und Manager der High-throughput Screening Facility in der Abteilung Signalwege und funktionelle Genomik am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Seit 2011 Arbeitsgruppenleiter und seit 2013 Habilitand am Lehrstuhl für Medizinische Biotechnologie an der Universität Erlangen-Nürnberg.