

Quantitative 4D-Mikroskopie

Bioinformatische zelluläre Verhaltensbiologie

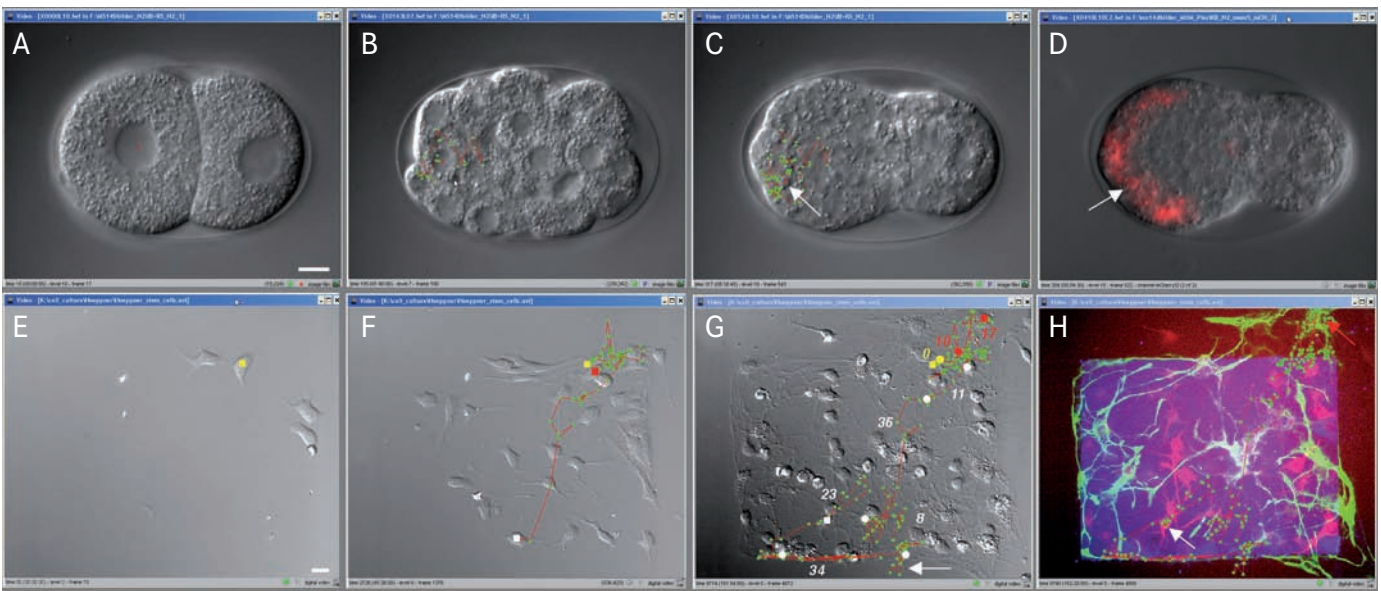
RALF SCHNABEL
INSTITUT FÜR GENETIK, TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG

Die 4D-Mikroskopie dokumentiert mit höchster Auflösung und Sensitivität das Verhalten von Zellen und Molekülen in Embryonen und Kulturen. Die Software-basierte Dokumentation der Beobachtungen erlaubt bioinformatische Analysen und Mustererkennung.

Multi-channel 4D microscopy documents the behavior of cells and molecules in embryos and cultures with high resolution and sensitivity. The software-based documentation of observations enables quantitative bioinformatical analyses and pattern recognition.

Die größeren Geister unter uns leiten Revolutionen ein, indem sie die richtige Frage stellen, eine adäquate Beschreibungsebene finden, und wenn nötig, auch noch eine neue Methode dazu entwickeln. Bruce Alberts ist so ein Pionier. 1989 stellte er die Frage: Werden

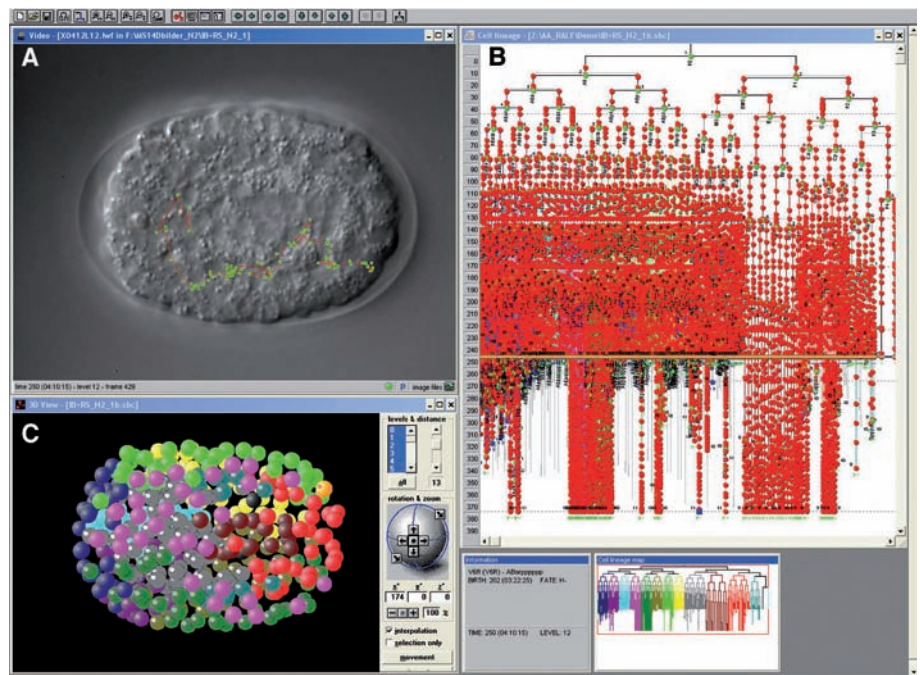
die Organe des *Drosophila*-Embryos klonal – mit einer Zelllinie – gebildet, oder werden Zellen lokal – unabhängig von ihrer Herkunft – rekrutiert? Die Methode der Wahl war eine Beobachtung der Zellen in Raum und Zeit. Dies wurde verwirklicht durch Aufnahmen von Z-Serien mit acht Bildebenen, alle 23 Sekunden für gut zwei Stunden. Die 4D-Mikroskopie war geboren. Die Zellen wurden durch eine Injektion von *in vitro* mit Rhodamin garnierten Histonen markiert. Hier kam die erste große Erfindung von Bruce Alberts, die DNA-Cellulose, zum Einsatz. Die Fluoreszenz der Kerne von 50 Zellen und deren Nachkommen wurden für drei Generationen mithilfe einer *high end*-CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Zellen wurden manuell verfolgt und in 3D-Ansichten analysiert. Die Antwort auf



▲ **Abb. 1:** 4D-mikroskopische Zelllinienanalysen. **A–D**, Analyse der Identität eines Zelltds in einem *Caenorhabditis elegans*-Embryo, der mCherry-markiertes MOM-5 (*frizzled*) exprimiert. **A**, Die Analyse beginnt im Zwei-Zellstadium, die markierte Zelle ist die AB-Blastomere. Die Zellpositionen werden durch Mausclicks markiert und die Teilungen eingetragen (vgl. Abb. 2). **B**, Position der Zelle ABalaaa im 51-Zellstadium. **C, D**, Der Zelltod ABalapaal enthält, wie die Überlagerung eines Fluoreszenz- mit einem unmittelbar zuvor aufgenommenen DIC-Bild in **D** zeigt, das Markerprotein (weiße Pfeile). Die Markierung der Wanderwege in **C** zeigt, dass Zellen nicht direkt zu ihrem Bestimmungsort wandern [6, 8]. **E–H**, Entwicklung neuronaler Stammzellen aus der Ratte [10]. Vier Zellen aus dem Cortex eines 10,5 Tage alten Embryos wurden auf einem mit Fibronectin überzogenen Rechteck ausgesät. **E, F**, Zwei Nachkommen (weißes und rotes Quadrat) der gelb markierten Zelle wurden verfolgt. **G, H**, Nach 162 Stunden sind die Zellen differenziert und wurden einer in **H** gezeigten immunochemischen Analyse unterzogen. Weißer Pfeil: neuronale Zelle, die β -III-Tubulin (rot) exprimiert; roter Pfeil: Zelle, die einen Astrozyten-Marker (grün, *glial fibrillary acidic protein*) exprimiert. **G**, Die neuronale Zelle differenziert nach sechs, der Astrozyt nach zwei Zellteilungen (Punkte), wobei die Wanderungsgeschwindigkeiten sehr unterschiedlich sind. Die Zahlen neben dem roten Pfad geben die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen an (Pixel/Stunde berechnet mit der Software Phainothea).

die Frage war eindeutig: Die Zellen werden lokal rekrutiert [1].

Der nächste Schritt war das Design eines schnellen hochauflösenden 4D-Mikroskops durch John White (damals MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge). Der Clou war ein analoger Laserdisc-Videorecorder, mit dem man Zigtausende Einzelbilder speichern und mit hoher Geschwindigkeit wieder abrufen konnte. Damit konnten Zellen in Raum und Zeit mit großer Geschwindigkeit verfolgt werden. Dies ist wichtig, um das „Verhalten“ der Zellen zu sehen. John Whites Mikroskop war 1989 für DIC(Differenzieller Interferenzkontrast nach Nomarski)-Durchlichtmikroskopie ausgelegt, wie sie John Sulston nutzte, um die stereotype Zelllinie von *Caenorhabditis elegans* zu analysieren [2] (Nobelpreis 2002). Die Möglichkeiten der DIC-Mikroskopie sind fast in Vergessenheit geraten. Der moderne zellbiologische Doktorand sieht Zellen als leuchtende molekulare Fragmente, der zelluläre Kontext geht verloren. Ich bin immer irritiert, wenn ich einem Besucher eine komplette Analyse eines *C. elegans*-Embryos zeige und die unvermeidliche Frage kommt: Warum benutzt du nicht einen fluoreszierenden Marker? Warum sollte ich? Ich kann doch so alles sehen, einschließlich der Gewebedifferenzierung am Ende der Embryogenese. Mittels DIC-Mikroskopie konnten neue Muster der Zelldifferenzierung in Mutanten erkannt werden. Dies führte zu der Erkenntnis, dass der Körperplan des Fadenwurms durch Induktionen festgelegt wird, die nicht einzelne Gewebe spezifizieren, sondern regionale Identitäten mit komplexen Gewebemustern. Dabei folgt der Embryo einer binären Logik, die die regionalen Pläne immer weiter differenziert [3, 4]. John White hat dieses Mikroskop nie publiziert, erst die digitale Version wurde *en passant* beschrieben [5]. Seit ich 1989 bei John das analoge Mikroskop das erste Mal benutzen durfte, baue ich 4D-Mikro-

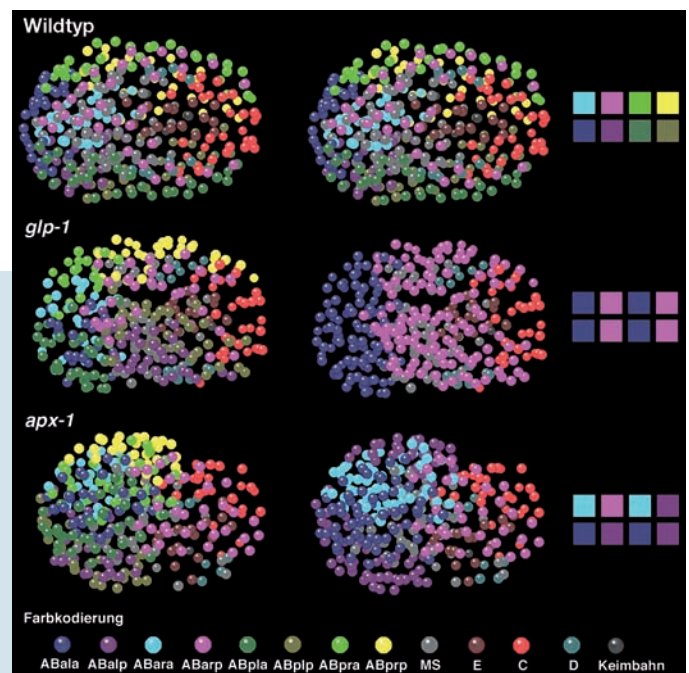


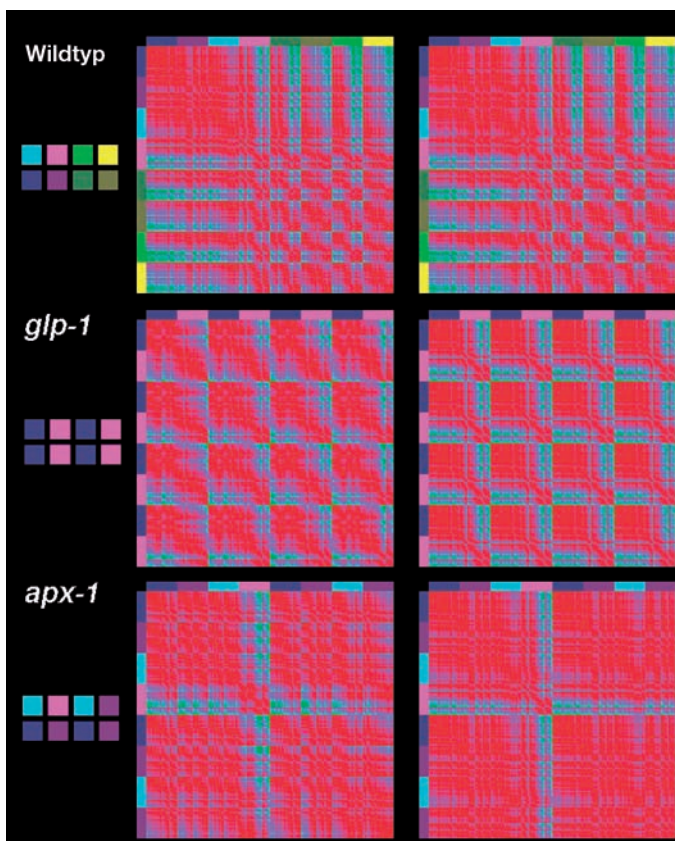
▲ **Abb. 2:** Erfassung von Zellverhalten im Embryo von *Caenorhabditis elegans*. **A**, mittlere Ebene eines prä-morphogenetischen *C. elegans*-Embryos. Videofenster in dem die Zellen verfolgt werden, indem man mit den Cursors durch die Ebenen und die Zeit navigiert. Rotes Quadrat: Hypodermiszelle V6R; rote Linie: Wanderweg der Zelle und ihrer Vorläufer. **B**, Als Zelllinie dargestellte Datenbank. Rote Punkte: Zellmarkierungen; grüne Punkte: Mitosen. Alle Zellen wurden bis ins prä-morphogenetische Stadium analysiert und viele weitere, bis der Embryo anfängt sich zu bewegen. **C**, Eine 3D-Repräsentation zeigt die Positionen der Kerne des Stadiums aus dorsaler Ansicht, die Zelle in Orange ist V6R (durchgeführt mit der Software SIMI°Biocell).

skope [6]. Inzwischen sogar fast automatische, digitale Multikanal-Mikroskope. Sie sind um ein Vielfaches sensitiver als konfokale Mikroskope. Damit lassen sich DIC-Aufnahmen ideal mit Expressionsanalysen kombinieren [7]. Dabei hält sich der apparative Aufwand inzwischen in Grenzen. Jedes mit dem Computer steuerbare Mikroskop mit einem motorisierten Z-Trieb lässt sich in ein DIC-4D-Mikroskop verwan-

deln. Mit einem motorisierten Fluoreszenzfilterrad können zusätzlich Analysen in mehreren Kanälen durchgeführt werden. Speziell entwickelte 4D-Steuerprogramme enthalten einen Autofokus und automatische Belichtungsmesser. So ist immer eine optimale Aus-

► **Abb. 3:** Darstellung von Zellpositionen und Zelltransformationen mit 3D-Repräsentationen im Embryo von *Caenorhabditis elegans*. Die anteriore Zelle AB des Zwei-Zellstadiums ist die erste somatische Gründerzelle, aus der acht Regionen abgeleitet werden, die im 12-Zellstadium spezifiziert sind. Aus der posterioren Zelle P1 leiten sich MS, E, C, D und die Keimbahn ab. Die unterschiedlichen Schicksale der AB-Nachkommen werden durch acht farbocodierte Farbfelder repräsentiert (rechte Seite). Da *glp-1* und *apx-1*, Rezeptor und Ligand des *Notch/Delta*-Signalwegs, an der Induktion dieser acht Schicksale beteiligt sind, zeigen Mutanten ein verändertes Schicksalsmuster. Die erste Spalte zeigt die Zellpositionen im Wildtyp und den Mutanten mit der Codierung der normalen Zellidentitäten. Man sieht, dass die Zellen in den Mutanten in neue Positionen wandern. Jeweils rechts daneben sind die Zellen gemäß ihrem Schicksal codiert (durchgeführt mit der Software SIMI°Biocell).





◀ **Abb. 4:** Distanzarten zur Darstellung der Distanzen aller Zellen im Embryo von *Caenorhabditis elegans*. Da alle Zellkoordinaten nach einer Analyse mit der Software SIMI°Biocell bekannt sind, kann man die Distanzen aller Zellen zueinander berechnen. Die Bilder zeigen Matrizen, in denen die Distanzen der 256 AB-Zellen farblich codiert dargestellt werden – von rot nach blau bis grün, was den Distanzen null bis halbe bis ganze Embryolänge entspricht. Die beiden Bilder oben zeigen zwei Wildtyp-Embryonen, die fast nicht zu unterscheiden sind, die Embryonen sind sich sehr ähnlich. In *glp-1*- und *apx-1*-Embryonen hat sich die Anordnung der Zellen dramatisch verändert, das *glp-1*-Muster ist repetitiv und symmetrisch. Aus einer Wildtyp-Karte lassen sich Vorhersagen konstruieren, wie Karten bei neuen Schicksalsverteilungen aussehen müssten, wenn alle Zellen mit neuen Schicksalen die Positionen ihrer normalen Pendanten einnehmen würden – also das Schicksal einer Zelle strikt ihren Ort bestimmt. Diese sind jeweils rechts neben den Mutanten zu sehen.

leuchtung, sogar fluoreszierender Strukturen, gesichert. Mit preiswerteren Kameras, wie z. B. Pixelfly, lassen sich mit dem Auge gerade noch erkennbare Fluoreszenzen perfekt abbilden. Die aufwendigere Sensicam (beide PCO, Kehlheim) zaubert noch Bilder auf den Bildschirm, auch wenn mit dem Auge nur noch ein schwarzes Loch im Mikroskop zu sehen ist. Zumindest im GFP-Kanal ist damit die theoretisch maximal mögliche Sensitivität erreicht, da sich Zellen auch ohne jede GFP-Expression abbilden lassen. Mit einer LED-Illumination kann der Lichtschaden und das Bleichen durch einen „Blitz-Modus“ so stark reduziert werden, dass statt hundert mehrere Tausende Aufnahmen möglich werden. Die extrem hohe Steuerungsgeschwindigkeit, die z. B. mit dem Zeiss-Imager realisierbar geworden ist, minimiert jetzt den zeitlichen Versatz zwischen verschiedenen Kanälen. Damit können Expressionsmuster in DIC-Aufnahmen projiziert werden (**Abb. 1**).

Zur Analyse der 4D-Aufnahmen von *C. elegans*-Embryonen wurde in Zusammenarbeit mit SIMI (Unterschleißheim) die Software SIMI°BioCell entwickelt (**Abb. 2**).

Mit SIMI°BioCell lassen sich 2D- und 3D-Zeitraffervideos abspielen und Beobachtungen dokumentieren; außerdem lassen sich Bilder verschiedener Kanäle ineinander projizieren (**Abb. 1**). Ursprünglich haben wir das

seiner direkten Beobachtung immer nur einzelner Zellen sehen konnte (siehe Video 1, [8]). Noch überraschender war die Erkenntnis, dass der Körperplan des Embryos letztendlich nicht durch determinierte anterior-posteriore Zellteilungen, sondern durch globale Zellmigrationen angelegt wird. Zellen sortieren sich gemäß ihrem Schicksal in Regionen. Ändert man die Identitäten der Zellen, so wandern sie gemäß ihrem neuen Schicksal an den Ort, an dem dieses Schicksal normalerweise residiert. Dabei können Zellen praktisch den ganzen Embryo durchwandern (**Abb. 3**, [6, 8]). Diese Einsichten waren durch bioinformatische, quantitativ-morphologische Analysen möglich [8]. Nach einer Analyse mit SIMI°Biocell liegen in der Datenbank die Zeitpunkte aller Zellteilungen, deren Richtungen und die Koordinaten aller Zellen, verknüpft mit ihren Identitäten, für die ganze Entwicklung vor. Aus diesem Datensatz können wir mit dem Programm Phainothea z. B. alle Zellbewegungen, Bewegungsgeschwindigkeiten und Zellteilungsrichtungen quantifizieren. Die Analyse ergab, dass alle Zellen im Embryo gleich weit migrieren, 70 Prozent Embryolänge, und zwar unabhängig davon, wie weit eine Zelle im prä-morphogenetischen Körperplan von ihrer somatischen Gründerzelle im 12-Zellstadium entfernt ist. Dies ist wahrscheinlich mit der Kompensation des Trans-

ports der Zellen durch die Zellteilungen und dem Mechanismus der Sortierung der Zellen durch Zellfokussierung zu erklären. In *C. elegans* entwickelt [3]. Bei der Analyse der normalen Entwicklung von *C. elegans* zeigte sich, dass dessen Embryogenese zeitlich und räumlich viel variabler ist, als

John Sulston es mit dem Mechanismus der Sortierung der Zellen durch Zellfokussierung zu erklären. In *C. elegans* wird der Körperplan durch das Sortieren von Zellen erstellt, wahrscheinlich ist dies sogar ein genereller Mechanismus der Embryogenese (**Abb. 3**, [10]). Die Messung der Geschwindigkeit der Zellen hat sich als nützlich erwiesen, die aktivierende oder inhibierende Modulation der Zellbewegungen durch Zelladhäsionsmoleküle zu charakterisieren. Die Messung der Mobilität von Tumorzellen in Kultur konnte die Hypothese entkräften, dass eine therapeutische Bestrahlung die Mobilität der Zellen und damit die Metastasierung befördert (Scholtz, Darmstadt, persönliche Mitteilung). Quantitative Analysen der Zellteilungsrichtungen deckten auf, dass die Polarität des *C. elegans*-Embryos durch einen *relay* (Staffellauf) von Wnt-Signalen, die von Keimbahnvorläuferzellen ausgehen, vermittelt wird. Die Polarisierung der Zellteilungen ist in der Löwe-Projektion, die wie eine Schießscheibe aussieht, mit einem Blick zu erkennen [10]. Solche 4D-mikroskopische quantitative Analysen erlaubten auch, das Differenzierungsmuster embryonaler Stammzellen des Gehirns in Zellkultur zu analysieren. Bei der Beobachtung des Verhaltens von Zellen (Video 2, [8]) könnte man den Eindruck gewinnen, dass manche Zellen fast verzweifelt nach einem Ziel suchen (**Abb. 1G**, weißer Pfeil). Auch kann man die Zelltypen in kurzer Zeit anhand ihrer Morphologie und Verhalten unterscheiden, so dass keine molekularen Marker nötig sind. Durch extensive Analysen kamen Ravin *et al.* zu dem Schluss, dass kultivierte neuronale Stammzellen schnell ihre Potenz verlieren, diese aber durch Zellpassagen wieder aktiviert wird [11].

Die 4D-Mikroskopie ist ebenso ein Eldorado für Zoologen. Bisher wurden außer verschiedensten Nematoden die folgenden Tie-

re analysiert: ein Tardigrade (Bärtierchen) – was zu einer vollständigen Revision des Ablaufs der Embryogenese führte [12] –, eine Tunicate (Manteltier) [13] und (noch von meinem Labor unveröffentlicht) ein Gastrotriche (Bauchhärting), zwei Rotiferen (Rädertiere) und ein Seeigel (Video 3–6, [8]). Die Segmentbildung wurde in der Kellerasse *Porcellio scaber* untersucht [14].

Bei einer Untersuchung von Zellpositionen und -transformationen im Wildtyp und in *glp-1*- und *apx-1*-Mutanten des Embryos von *C. elegans* wandern Zellen der Mutanten jeweils in die Position ihres Wildtyp-Pendants (**Abb. 3**, [9]). Dies konnte jedoch schlecht nachvollzogen werden, weshalb wir Distanzkarten, wie sie in der Proteinstrukturanalyse genutzt werden, zur Analyse eingeführt haben (**Abb. 4**).

Da nach einer 4D-Analyse die Koordinaten aller Zellen bekannt sind, lassen sich mithilfe eines Farbcodes die 32.768 Abstände der Zellen im prä-morphogenetischen Stadium des *C. elegans*-Embryos mit einem Blick in einer Distanzkarte erfassen. In Mutanten, die neue schöne Muster erzeugen, wurde sehr wahrscheinlich ein Musterbildungs-gen getroffen (**Abb. 4**). ■

Literatur

- [1] Minden JS, Agard DA, Sedat JW et al. (1989) Direct cell lineage analysis in *Drosophila melanogaster* by time-lapse, three-dimensional optical microscopy of living embryos. *J Cell Biol* 109:505–516
 [2] Sulston JE, Schierenberg E, White JG et al. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64–119

- [3] Hutter H, Schnabel R (1994) *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* 120:2051–2064
 [4] Kaletta T, Schnabel H, Schnabel R (1997) Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 390:294–298
 [5] Hird S, White JG (1993) Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 121:1343–1355
 [6] Schnabel R, Hutter H, Moerman D et al. (1997) Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* 184:234–265
 [7] Hunt-Newbury R, Viveiros R, Johnsen R et al. (2007) High-throughput *in vivo* analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 5:e237
 [8] <http://biocell.simi.com>
 [9] Schnabel R, Bischoff M, Hintze A et al. (2006) Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation. *Dev Biol* 294:418–431
 [10] Bischoff M, Schnabel R (2006) A posterior centre establishes and maintains polarity of the *Caenorhabditis elegans* embryo by a Wnt-dependent relay mechanism. *PLoS Biol* 4:e396
 [11] Ravin R, Hoepfner DJ, Munno DM et al. (2008) Potency and fate specification in CNS stem cell populations *in vitro*. *Cell Stem Cell* 3:670–680
 [12] Hejnal A, Schnabel R (2005) The eutardigrade *Thulinia stephaniae* has an indeterminate development and the potential to regulate early blastomere ablations. *Development* 132:1349–1361
 [13] Stach T, Winter J, Bouquet JM et al. (2008) Embryology of a planktonic tunicate reveals traces of sessility. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7229–7234
 [14] Hejnal A, Schnabel R, Scholtz G (2006) A 4D-microscopic analysis of the germ band in the isopod crustacean *Porcellio scaber* (Malacostraea, Peracarida) – developmental and phylogenetic implications. *Dev Genes Evol* 216:755–767

Korrespondenzadresse:

Prof. Ralf Schnabel
 Institut für Genetik
 Technische Universität Braunschweig
 Spielmannstraße 7
 D-38106 Braunschweig
 Tel.: 0531-391-5770
 Fax: 0531-391-5765
 r.schnabel@tu-bs.de

AUTOR



Ralf Schnabel

Jahrgang 1954. 1975–1979 Biochemiestudium an der Universität Tübingen und der Louisiana State University, USA. 1979–1983 Promotion am MPI in Martinsried. 1984–1987 Postdoctoral fellow am Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, UK. 1987–1997 Gruppenleiter am MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen und dann MPI für Biochemie in Martinsried. 1996 Habilitation für Genetik. Seit 1997 Professor für Genetik an der TU Braunschweig.