

Mikroskopiebasierte Zytometrie

High-content imaging für multidimensionale Zellanalysen

ALEKSANDRA LEZAJA^{1, 2}, MATTHIAS ALTMAYER¹

¹ DEPARTMENT OF MOLECULAR MECHANISMS OF DISEASE, UNIVERSITÄT ZÜRICH, SCHWEIZ

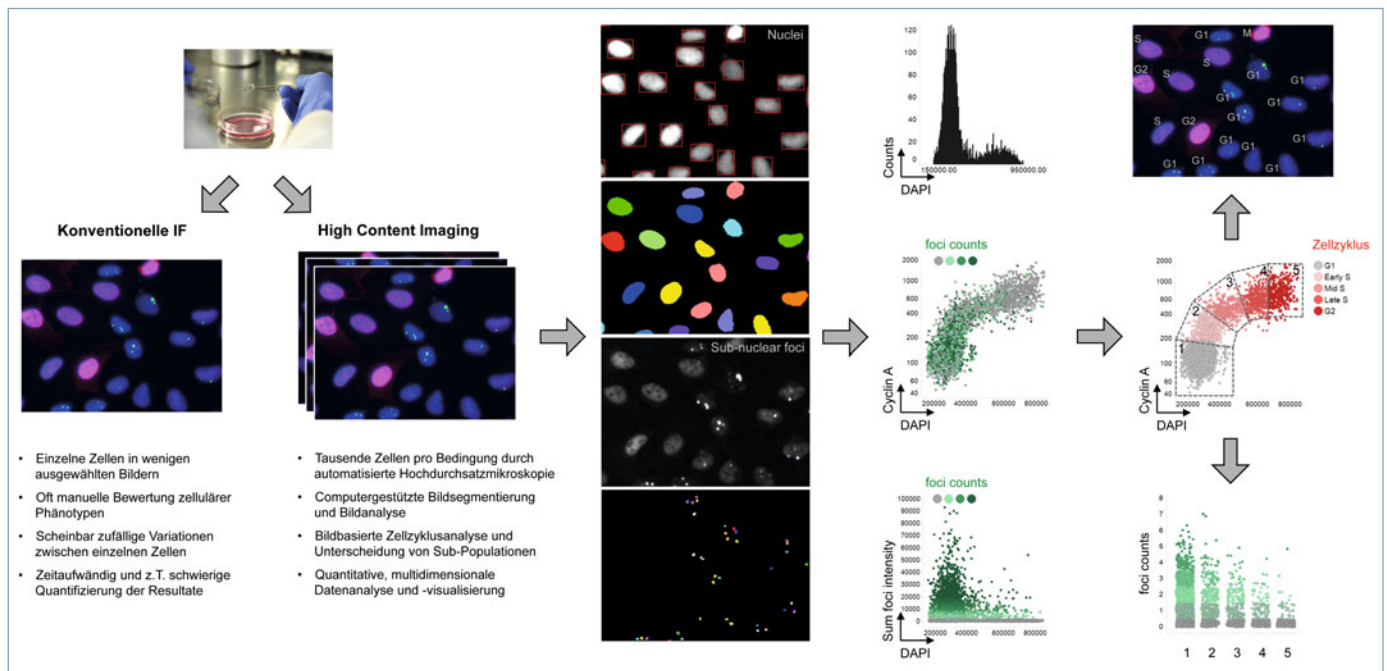
² CANCER BIOLOGY PROGRAM, LIFE SCIENCE ZÜRICH GRADUATE SCHOOL, UNIVERSITÄT ZÜRICH, SCHWEIZ

Automated high-throughput microscopy has been instrumental for drug discovery and large-scale gene perturbation screens. Advancements in image resolution, microscope speed, and detection sensitivity have greatly aided high-content imaging approaches. Here, we describe how high-content microscopy can be repurposed for quantitative image-based cytometry, an approach that exploits both the throughput and the resolution of current screening microscopes for multidimensional cell population analyses.

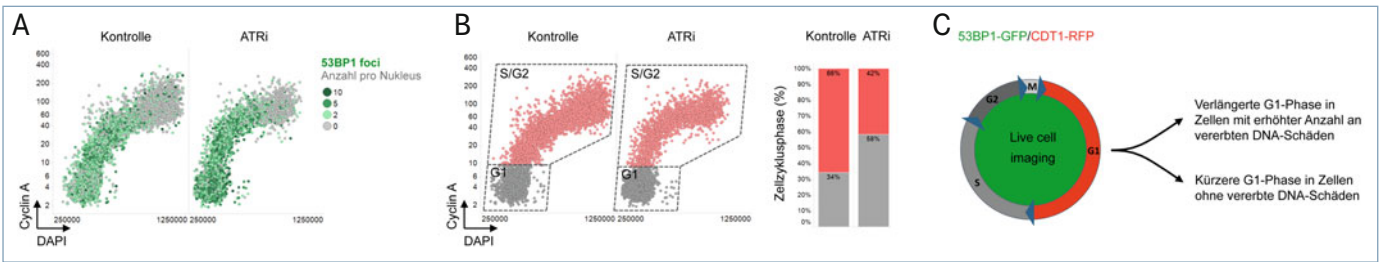
DOI: 10.1007/s12268-018-0918-5

© Springer-Verlag 2018

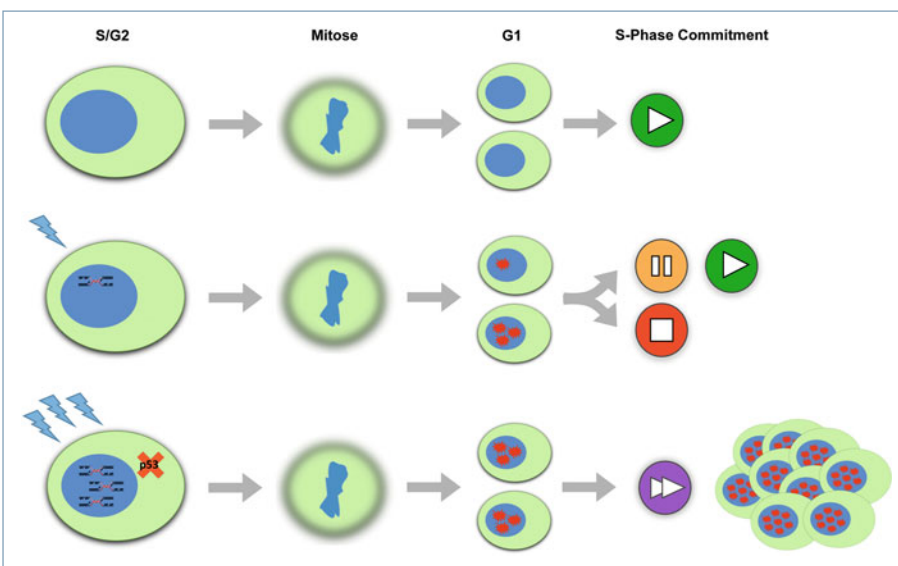
Seit Anbeginn der Zellbiologie als Wissenschaftsdisziplin hat sich die Leistungsstärke von Mikroskopen stetig verbessert. Dabei wurden insbesondere bessere Linsensysteme entwickelt, die ein immer detaillierteres Bild der Zelle ermöglichen. Heutzutage können mittels supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie (*super-resolution microscopy*) selbst kleinste zelluläre Strukturen unterhalb des Abbe-Limits, der Auflösungsgrenze in der klassischen Lichtmikroskopie, sichtbar gemacht werden. Parallel zur Verbesserung der Optik und dem Auflösungsvermögen wurden Mikroskope zunehmend mit automatisierten Komponenten ausgestattet. Diese Entwicklung ebnete den Weg zur Hochdurchsatzmikroskopie, die heute hauptsächlich für *high-content screens* angewendet wird. Die Leistungsstärke moderner Scree-



▲ **Abb. 1:** High-content imaging für multidimensionale Zellanalysen. Ausgehend von einer konventionellen Immunfluoreszenzfärbung (IF) können durch Hochdurchsatzmikroskopie in Kombination mit computergestützter Bildsegmentierung (um z. B. Zellkerne automatisch zu erkennen) und automatisierter Bildanalyse zelluläre Stressantworten in großen Zellpopulationen quantifiziert und in Relation zum Zellzyklus gesetzt werden. Basierend auf einer Färbung der DNA (hier DAPI) können eindimensionale oder in Kombination mit einem weiteren Zellzyklusmarker (hier Cyclin A) zweidimensionale Zellzyklusprofile erstellt werden. Zelluläre Phänotypen können so gezielt in Subpopulationen quantifiziert und die Resultate mit den Ursprungsbildern rückvergleichen werden.



▲ **Abb. 2:** Replikationsstress wirkt sich auf die Dauer der G1-Phase in Tochterzellen aus. **A**, Replikationsstress, hier hervorgerufen durch Inhibition der Checkpoint-Kinase ATR (ATRi), erhöht die Anzahl an Erbschäden (markiert durch Akkumulation des Proteins 53BP1 in subnukleären Fokussen). **B**, Durch die vererbten DNA-Läsionen verlängert sich die G1-Phase, und geschädigte Zellen akkumulieren dort. **C**, Mittels Lebendzell-Imaging von Zellen, die sowohl einen DNA-Schadensmarker (53BP1-GFP) als auch einen Marker für die G1-Phase (BacMam CDT1-RFP) exprimieren, können Erbschäden und die G1-Dauer auf Einzelzellebene direkt korreliert werden.



▲ **Abb. 3:** Übertragung von Replikationsstress und DNA-Schäden von einer Zellgeneration auf die nächste. Abhängig vom Schweregrad der vererbten DNA-Schäden nach Replikationsstress hat die Zelle die Möglichkeit, schnell in die nächste S-Phase einzutreten (*play*), die G1-Phase zu verlängern (*pause and resume*) oder den Wiedereintritt in den Zellzyklus zu verhindern (*stop*). Diese Möglichkeiten werden maßgeblich vom Tumorsuppressorprotein p53 reguliert. Wenn p53 fehlt oder mutiert ist, treten die Zellen verfrüht in die nächste S-Phase ein, wodurch der Replikationsstress weiter verschärft wird und es zu einer Anhäufung von Mutationen kommen kann (Krebsrisiko, *fast forward*).

ningmikroskope kann man sich aber auch zunutze machen, um zelluläre Prozesse in großen Zellpopulationen präzise abzubilden und zu charakterisieren – getreu dem Motto: „Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“

Vom Screeningmikroskop zu mikroskopiebasierter Zytometrie

Die häufigste Anwendung von Hochdurchsatzmikroskopen liegt im Bereich von mikroskopiebasierten Screens. Dabei soll eine möglichst große Anzahl an verschiedenen biologischen Bedingungen miteinander verglichen werden. Verwendung findet dies z. B. bei der Entwicklung von Medikamenten, wenn die Effekte von Tausenden von chemischen Ver-

bindungen miteinander verglichen werden sollen. Auch bei der Charakterisierung von Genfunktionen spielen phänotypische Screens eine wichtige Rolle. In beiden Fällen macht man sich die Automatisierung und Leistungsfähigkeit der Mikroskope zunutze, um in überschaubarer Zeit möglichst viele verschiedene Bedingungen zu messen. Was aber, wenn man Hochdurchsatzmikroskope nicht dazu verwendet, um möglichst viele verschiedene Bedingungen zu vergleichen, sondern um möglichst viele Zellen pro Bedingung zu untersuchen? Durch diesen Ansatz kann ein klassisches Immunfluoreszenzexperiment in mikroskopiebasierte Zytometrie transformiert werden, was die Vorteile hochauflösender Mikroskopie mit dem hohen

Durchsatzvermögen, das man aus der Durchflusszytometrie kennt, verbindet. Durch das Hochskalieren von einigen wenigen Zellen pro Bedingung auf Hunderte oder gar Tausende Zellen verbessert man nicht nur die Aussagekraft, sondern gewinnt zusätzliche Dimensionen hinzu, beispielsweise die Positionen der analysierten Zellen im Zellzyklus. Basierend auf geeigneten Markern kann man so Zellpopulationen weiter unterteilen und zelluläre Antworten sehr viel spezifischer untersuchen (**Abb. 1**). Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielseitig und erlauben es beispielsweise, zelluläre Prozesse zur genomischen Stabilität besser zu verstehen [1–4].

Wie Replikationsstress an die nächste Zellgeneration vererbt wird

Wie wir Menschen selbst sind auch unsere Zellen nicht vor Stress gefeit. Stress tritt z. B. häufig während der DNA-Replikation auf, wenn innerhalb weniger Stunden die Erbsubstanz korrekt kopiert werden soll. Dies geschieht in der Regel mit erstaunlicher Präzision, doch manchmal kommt es eben doch zu Fehlern, und bestimmte Abschnitte der DNA werden nicht vollständig oder nicht korrekt repliziert, bevor die Zelle in die nächste Zellzyklusphase eintritt. Je mehr Stress die Zelle während der Replikation ausgesetzt ist, desto häufiger treten solche Probleme auf. Interessanterweise bedeuten diese Fehler nicht automatisch, dass die Zelle in ihrem Zellzyklus anhält oder gar stirbt. Einige der DNA-Läsionen, die ihren Ursprung in der S-Phase des Zellzyklus haben, bleiben bis zur Mitose bestehen und werden gar an die nächste Zellgeneration vererbt [5, 6]. Was aber hat dies für Auswirkungen auf die Tochterzellen? Durch *high-content imaging* war es uns möglich, sowohl die vererbten, durch Replikationsstress hervorgerufenen Läsionen in der Tochterzellgeneration zu quantifizie-

Hier steht eine Anzeige.



ren, als auch den Einfluss auf die Verweildauer der Zellen in der G1-Phase zu messen [7]. Aus einer Kombination mit *time-lapse*-Mikroskopieversuchen, in denen über geeignete Marker die G1-Länge bestimmt wurde, ergab sich, dass Replikationsstress und die damit einhergehende Erblast die G1-Phase verlängern und entsprechend den Eintritt in die nächste S-Phase verzögern (**Abb. 2**). Interessanterweise war der verzögerte Eintritt in die S-Phase abhängig vom Tumorsuppressorprotein p53, das in Krebszellen häufig mutiert ist. Es ist daher vorstellbar, dass während der Krebsentstehung die Vererbung von DNA-Läsionen mit einem Funktionsverlust von p53 zusammenspielt, wodurch bei verfrühtem Wiedereintritt in die S-Phase eine Anhäufung von Mutationen begünstigt wird (**Abb. 3**). Zusammen mit jüngsten Daten anderer Gruppen [8–11] können diese Erkenntnisse erklären, warum proliferierende Zellen nicht synchron von der G1- in die S-Phase übertreten, sondern abhängig vom Stresslevel der Vorgängergeneration kürzer oder länger in G1 verweilen [12].

Danksagung

Die Arbeit in der Gruppe von M. Altmeyer wird unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds (SNF Grant 150690), den Europäischen Forschungsrat (ERC-2016-STG 714326 DiVineGenoMe), die Novartis Stiftung für medizinisch-biologische Forschung (Grant 16B078), die Schweizer Stiftung zur Krebsbekämpfung und die Universität Zürich (UZH). Die Autoren danken dem Zentrum für Mikroskopie und Bildanalyse (ZMB) der UZH für Imaging Support und Tobias Suter für Kor-

rekturen und hilfreiche Vorschläge zum Manuskript. ■

Literatur

- [1] Altmeyer M, Toledo L, Gudjonsson T et al. (2013) The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Mol Cell* 52:206–220
- [2] Ochs F, Somyajit K, Altmeyer M et al. (2016) 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* 23:714–721
- [3] Pellegrino S, Michelena J, Teloni F et al. (2017) Replication-coupled dilution of H4K20me2 guides 53BP1 to pre-replicative chromatin. *Cell Rep* 19:1819–1831
- [4] Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB et al. (2013) ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 155:1088–1103
- [5] Lukas J, Lukas C, Bartek J (2011) More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13:1161–1169
- [6] Mankouri HW, Huttner D, Hickson ID (2013) How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J* 32:2661–2671
- [7] Lezaja A, Altmeyer M (2017) Inherited DNA lesions determine G1 duration in the next cell cycle. *Cell Cycle* 17:24–32
- [8] Arora M, Moser J, Phadke H et al. (2017) Endogenous replication stress in mother cells leads to quiescence of daughter cells. *Cell Rep* 19:1351–1364
- [9] Barr AR, Cooper S, Heldt FS et al. (2017) DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat Commun* 8:14728
- [10] Yang HW, Chung M, Kudo T et al. (2017) Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature* 549:404–408
- [11] Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC et al. (2013) The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* 155:369–383
- [12] Strauss R, Bartek J (2018) Daughters sense their mother's stress. *Cell Cycle* 17:145–146

Korrespondenzadresse:

Dr. Matthias Altmeyer
 Department of Molecular Mechanisms of Disease
 Universität Zürich
 Winterthurerstraße 190
 CH-8057 Zürich
 Tel.: +41 446355 491
 Fax: +41 446355 488
 matthias.altmeyer@uzh.ch
 www.altmeyerlab.org

AUTOREN



Aleksandra Lezaja

Molekularbiologiestudium an der Universität Belgrad, Serbien. Masterarbeit an der Universität Genf, Schweiz. Seit 2016 Doktorandin im Cancer Biology PhD Programm der Universität Zürich.



Matthias Altmeyer

Biologiestudium an der Universität Konstanz. Doktorarbeit an der Universität Zürich, Schweiz. Mehrjähriger Forschungsaufenthalt als Postdoc an der Universität Kopenhagen, Dänemark. Seit 2014 SNF-Förderungsprofessor und Leiter einer Forschungsgruppe zum Thema „Quantitative Zellbiologie der Genomstabilität“ an der Universität Zürich.