

Einzelzellmikroskopie

Einzelzellmikroskopie im Hochdurchsatz auf Mikrostrukturen

JUDITH A. MÜLLER, GERLINDE SCHWAKE, JOACHIM O. RÄDLER
PHYSIK WEICHER MATERIE, FAKULTÄT FÜR PHYSIK UND CENTER FOR NANOSCIENCE,
LMU MÜNCHEN

Cellular response to perturbations, if examined at the single cell level, exhibits cell-to-cell differences, distinct dynamic behavior and correlations meaningful for the study of regulatory networks and information processing. Live-cell imaging on single cell arrays (LISCA) facilitates automated acquisition of individual time courses with sharp temporal resolution. Here we discuss expression dynamics after transient GFP transfection and event-time correlations in nanoparticle induced apoptosis.

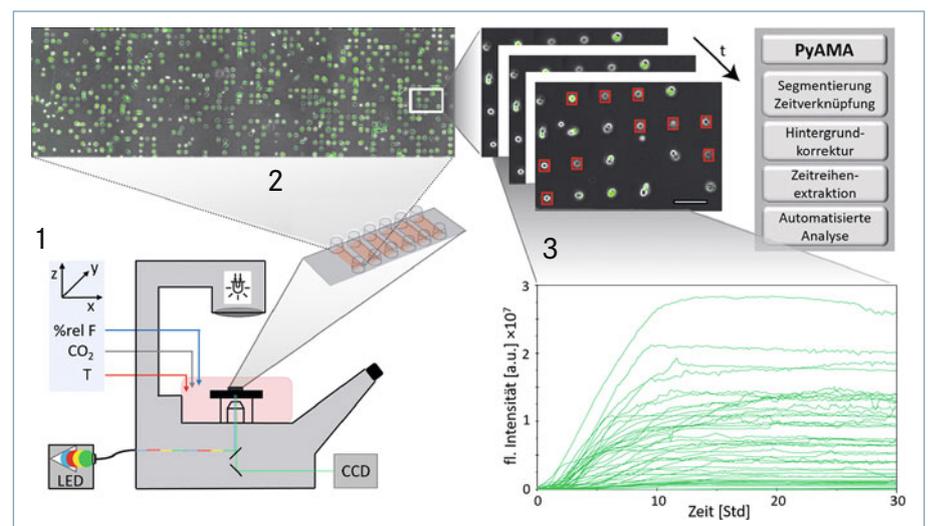
DOI: 10.1007/s12268-022-1857-8
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Quantitative Analysen von Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen geben Einblick in die Dynamik von Genexpression, genregulatorischen Schaltkreisen, Abstammungsreihen und Zell-zu-Zell-Variabilität in diesen Prozessen [1, 2]. Mittels Fluoreszenzreporter lassen sich zelluläre Zustände und Proteinkonzentrationen zeitaufgelöst verfolgen. Dabei unterscheiden sich Zellen einer Population in ihrer zeitlichen Dynamik, Morphologie, Genexpression und ihrem Differenzierungsstatus. Um diese Variabilität in der Analyse dynamischer Prozesse zu berücksichtigen, ist es nötig, einzelne Zellen statt eines Populationsdurchschnitts zu untersuchen. Einzelzellkinetiken erlauben die Identifizierung von Subpopulationen, seltenen Ereignissen oder Korrelationen in Fluoreszenzsignalen und bildbasierten Maßen und ermöglichen den quantitativen Vergleich der Zeitverläufe mit dynamischen Modellen [3]. Dabei gilt es, eine statistisch ausreichend große Anzahl einzelner Zellen über einen biologisch relevanten Zeitraum zu verfolgen. Während in der Durchflusszytometrie die Verteilung von 10^6 – 10^8 einzelner Zellen zu definierten Zeitpunkten erfasst wird, erlaubt die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme kontinuierlicher Zeitreihen, allerdings bei vergleichbar niedrigem Durchsatz. Automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie

liefert die für bildbasierte Zytometrie notwendigen Datenmengen und ermöglicht eine Profilerstellung von individuellen Antwortreaktionen [4]. Dabei hängt die Qualität zeit aufgelöster Zytometrie nicht nur von der automatisierten Bildaufnahme und -auswertung ab, sondern auch von einer standardisierten Präparation der Zellen, die eine Nachverfolgung über lange Zeiträume hinweg vereinfacht.

Lebendzellmikroskopie auf Einzelzellstrukturen

Die Zeitraffermikroskopie auf Zellkulturträgern mit standardisierten Einzelzellfeldern (*live-cell imaging on single cell arrays*, LISCA) ist geeignet, Einzelzellkinetiken in hohem Durchsatz in geometrisch definierten Mikroumgebungen aufzunehmen. Mittels Mikrostrukturierung werden regelmäßige Gitteranordnungen von zelladhäsiven Inseln geschaffen, die – eingebettet in einer passivierten Oberfläche – dazu führen, dass sich Zellen vereinzeln und die Zellbewegung limitiert wird (**Abb. 1**). Entsprechende Zellkulturträger können mittels Kontaktdruckverfahren, plasmainduzierter Mikrostrukturierung oder Photolithographie hergestellt werden [5]. Um den nötigen Hochdurchsatz zu erreichen, wird der Zellkulturträger

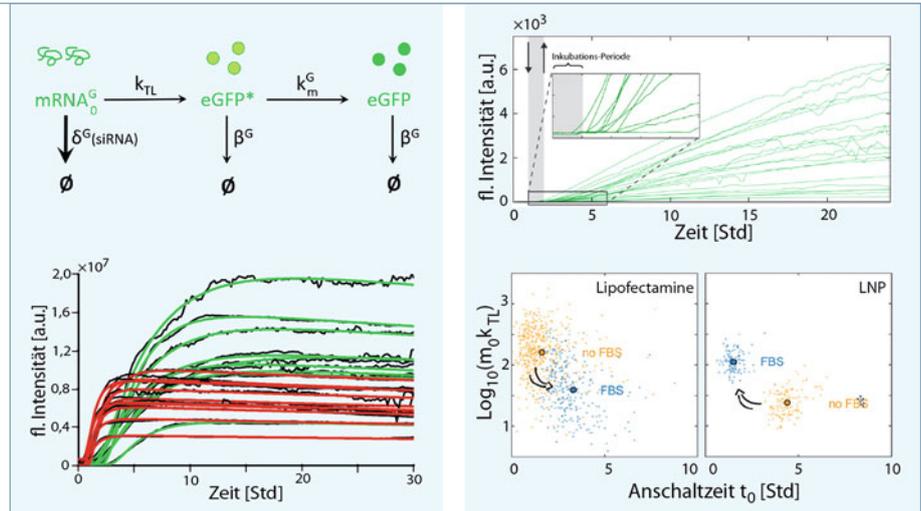


▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der LISCA-Plattform: (1) Einzelzellen werden auf mikrostrukturierten Mikroskopieträgern inkubiert und auf einem automatisierten Mikroskop im Rasterverfahren abgebildet. Dabei werden Temperatur T, Begasung mit CO₂, und Feuchtigkeit %rel F kontrolliert. (2) Zeitrafferaufnahmen der Einzelzellen werden aufgenommen und mit der Inhouse-Software PyAMA (*python based automated microscopy analysis*) weiterverarbeitet. (3) Daraus entstehen Fluoreszenzintensitäts-Trajektorien – wie hier gezeigt für Einzelzellgenexpression nach Transfektion mit eGFP-mRNA.

mithilfe eines motorisierten Probenstisches abgerastert. Bei ca. 120 Messfeldern und einer Zeitaufösung von zehn Minuten können ca. 10.000 Einzelfelder pro cm² abgerastert werden [6]. Die abgebildete Plattform gewährleistet eine Regulierung der Temperatur, des CO₂-Gehalts und der Luftfeuchte. Unsere Inhouse-Software PyAMA (*python based automated microscopy analysis*) ist auf die Zeitspurenanalyse von Einzelzell-Bildausschnitten und insbesondere der integrierten Gesamtfluoreszenz einer Zelle ausgelegt [7]. Zellen werden mittels eines Segmentierungsalgorithmus identifiziert und die Bildausschnitte über eine beliebige Anzahl zeitlich aufeinanderfolgender Bilder verfolgt. Die über die Zellkontur integrierten Fluoreszenzintensitäten werden als Zeitspuren ausgegeben (**Abb. 1**).

GFP-Expressionskinetik nach Transfektion mit lipidbasierten Nanopartikeln

Eine Anwendung der LISCA-Mikroskopie ist die Untersuchung des durch nicht virale Gefährten, z. B. Lipidnanopartikeln, vermittelten Transfers von therapeutischen Nukleinsäuremolekülen, z. B. mRNA, in der Gentherapie. **Abbildung 2** zeigt die Trajektorien der Expression des fluoreszierenden Reporterproteins, eGFP, nach Transfektion mit entsprechender lipidverpackter eGFP-mRNA. Der Zeitverlauf der Proteinexpression lässt sich mathematisch durch biochemische Ratengleichungen der Translation, Maturation und Degradation beschreiben (**Abb. 2, links**). Die Expression steigt zunächst an und fällt dann aufgrund der endlichen Lebenszeit von mRNA und eGFP wieder ab. Die dabei über die Zeit produzierte Gesamtproteinmenge (*area under the curve*, AUC) lässt sich analytisch vorhersagen: [8]. Durch Anpassung des Modells an die Daten (durchgezogene Linien in **Abb. 2, links**) lassen sich die Expressionsrate, $m_0 k_{TL}$, sowie die mRNA-Lebenszeit, τ_{mRNA} , bestimmen. Dabei stellt m_0 die Anzahl der übertragenen mRNA-Moleküle und k_{TL} die Translationsrate dar. Die mRNA-Lebenszeit τ_{mRNA} ist ein Maß für die Stabilität der mRNA und beeinflusst wesentlich deren therapeutische Effizienz. Mittels Lebenszeitmessungen, wie hier dargestellt, gelang es UTRs im 5' und 3' Bereiche zu optimieren [8] oder die Aktivität von siRNA-induzierter RNA-Interferenz zu messen [9]. Exemplarische Spuren für Transfektion in Abwesenheit (grün) und in Anwesenheit (rot) von siRNA sind in **Abbildung 2** (links unten)



▲ **Abb. 2:** Einzelzell-Genexpressionskinetik nach Transfektion. Links: Biochemisches Reaktionsschema der Translation: mRNA-Translation mit Translationsrate k_{TL} und mRNA-Degradation mit Degradationsrate δ^G . Das Protein (hier eGFP) maturiert in seine fluoreszierende Form mit der Maturationsrate k_m^G und wird abgebaut mit der Degradationsrate β^G . Exemplarisch werden Fluoreszenzverläufe einzelner Zellen mit korrespondierenden Fits für mRNA-Transfektion mit (rot) und ohne (grün) siRNA gezeigt. Rechts: Individuelle Anschaltzeiten. Korrelation der Expressionsraten und Anschaltzeiten für Lipoplexe und LNPs in An- und Abwesenheit von FBS (*fetal bovine serum*) [10].

gezeigt. Im Zusammenhang mit der Entwicklung therapeutischer mRNA spielt außerdem Codonoptimierung eine wichtige Rolle. Ein Auswahl optimierter Codons ermöglicht eine Maximierung der Translationsrate bei gleichzeitiger Erhaltung der Stabilität der mRNA. LISCA ermöglicht hier eine detaillierte experimentelle Untersuchung der Expressions- und Degradationsraten im Vergleich mit theoretischen Modellen zur Translationskinetik. Bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenztrajektorien stellt man zudem fest, dass der Zeitpunkt des Expressionsbeginns von Zelle zu Zelle variiert. **Abbildung 2** (rechts) verdeutlicht, dass sich die Transferzeit der mRNA-Aufnahme von Lipofektamine-Lipoplexen und Lipidnanopartikeln mit ionisierbaren Lipiden unterscheidet. Dabei zeigt sich, dass die Anwesenheit von Serumproteinen (hier FBS) im Transfektionspuffer die Zeiten verlängert bzw. verkürzt und die Veränderung der Expressionsraten mit den Transferzeiten korrelieren [10].

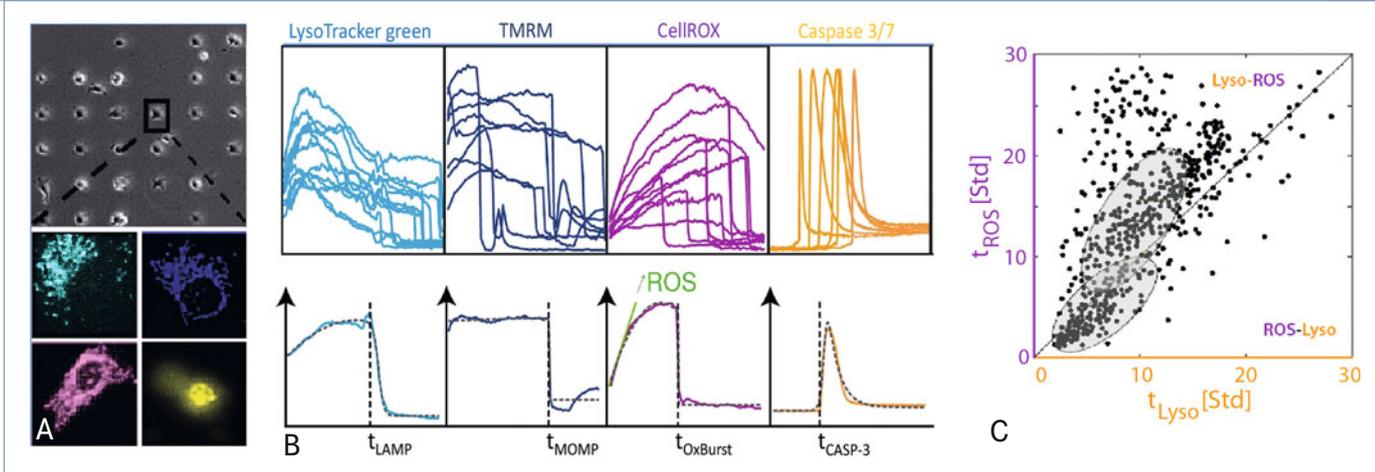
Signalkaskaden am Beispiel von Apoptose

Zeitspuren von mehreren Fluoreszenzkanälen können auch Informationen über die zeitliche Reihung und kausalen Abhängigkeiten in Signalkaskaden liefern. Als Beispiel wird der durch Nanopartikel ausgelöste Zelltod diskutiert. Zu den Ereignissen im Ablauf des induzierten Zelltods gehören u. a. die Permeabilisierung der Lysosomen- und Mitochondrienmembran, der respiratorischer Burst sowie die Aktivierung der Caspase 3/7. Für

all diese Prozesse existieren Fluoreszenzmarker. Wie in **Abbildung 3A,B** angedeutet, kann der Ereigniszeitpunkt jeweils aus den Fluoreszenztrajektorien extrahiert werden. In **Abbildung 3C** ist exemplarisch gezeigt, dass sich nach Exposition der Zellen mit toxisch wirkenden, aminomodifizierten Polystyrolpartikeln ein klare zeitliche Reihenfolge von lysosomaler Membranpermeabilisierung ergibt, gefolgt von der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Zusätzlich existiert für hohe Dosen ein zweiter, mitochondrieller Zelltodmechanismus mit umgekehrter zeitlicher Reihenfolge. Dieser zusätzliche Pfad wäre mit Ensemblemessungen nicht zu beobachten gewesen, da diese spezifische zeitliche Abfolge der beobachteten Ergebnisse nur in einer Subpopulation beobachtet wurde [11].

Die Zukunft automatisierter Lebendzellmikroskopie

Automatisierte Lebendzellmikroskopie in Kombination mit standardisierten, mikrostrukturierten Zellkulturträgern ermöglicht zeitaufgelöste Zytometrie in hohem Durchsatz. Dazu sind technisch eine hohe Rasterrate, hochauflösende CMOS- oder CCD-Chips und schnelle, durch künstliche Intelligenz unterstützte, Bildverarbeitung entscheidend. Mit bildbasierten Plattformen – wie hier beschrieben – lassen sich in Zukunft auch komplexere biologische Prozesse zeitaufgelöst analysieren, wie z. B. die zelluläre Immunantwort auf Nanopartikel. Dabei kann neben den integrierten Fluoreszenzsignalen



▲ Abb. 3: Zeitliche Korrelation zellulärer Ereignisse beim Nanopartikel-induzierten Zelltod. **A**, mitochondriale äußere Membranpermeabilisierung (blau, Tetramethylrodaminmethylester, TMRM), lysosomale Freisetzung (cyan, LysoTracker), Caspaseaktivierung (gelb, Caspase 3/7-Marker), respiratorischer Burst (lila, OxBurst; CellRox). **B**, typische Zeitverläufe und Ereigniszeiten. **C**, Clusteranalyse lysosomaler Membranpermeabilisierung und Auftreten von cytosolischen reaktiven Sauerstoffspezies [11].

auch die räumliche Verteilung des Signals sowie die Morphologie der Zellen im Phasenkontrast ausgewertet werden. Strukturierte Substrate erleichtern das Trainieren künstlicher Intelligenz und vereinheitlichen die Bedingungen der Exposition. Die Messung von Fluoreszenzkinetiken auf Einzelzellebene ermöglicht auch die Auflösung der Zellzyklusvariabilität. In Trägern mit größeren Feldern können Zellen zudem über mehrere Generationen verfolgt und entsprechende genetische und epigenetische Abstammungsanalysen durchgeführt werden. Das Potenzial zeitaufgelöster Zytometrie geht einher mit der Verfügbarkeit von theoretischen Modellen, die Prognosen über Verteilungsfunktionen und zeitliche Signaturen aufstellen. Die hier beschriebenen Beispiele zeigen, dass eine gute Statistik zeitlich hochaufgelöster Einzelzelldynamiken neue Einblicke in zelluläre Mechanismen geben und einen Beitrag zur Entwicklung von optimierten Nanopartikeln für medizinische Anwendungen leisten kann.

Danksagung

Dieses Projekt wurde durch die Bayerische Stiftungsförderung gefördert. ■

Literatur

- [1] Locke JC, Elowitz MB (2009) Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells. *Nat Rev Microbiol* 7: 383–392
- [2] Snijder B, Pelkmans L (2011) Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 119–125
- [3] Altschuler SJ, Wu LF (2010) Cellular heterogeneity: Do differences make a difference? *Cell* 141: 559–563
- [4] Caicedo JC, Cooper S, Heigwer F et al. (2017) Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat Methods* 14: 849–863
- [5] Fink J, Thery M, Azioune A et al. (2007) Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip* 7: 672–680
- [6] Reiser A, Woschée D, Kempe S et al. (2021) Live-cell imaging of single-cell arrays (LISCA) – a versatile technique

to quantify cellular kinetics. *J Vis Exp* 169, DOI: 10.3791/62025

- [7] Woschée D (2020) Github PyAMA. <https://github.com/SoftmatterLMU-RaedlerGroup/pyama>
- [8] Ferizi M, Leonhardt C, Meggle C (2015) Stability analysis of chemically modified mRNA using micropattern-based single-cell arrays. *Lab Chip* 15: 3561–3571
- [9] Krzysztan R, Woschée DW, Reiser A et al. (2019) Single-cell kinetics of siRNA-mediated mRNA degradation. *Nanomedicine* 21: 102077
- [10] Reiser A, Woschée D, Mehrotra N et al. (2019) Correlation of mRNA delivery timing and protein expression in lipid-based transfection. *Integr Biol (Camb)* 11: 362–371
- [11] Murschhauser A, Röttgermann PJF, Woschée D et al. (2019) A high-throughput microscopy method for single-cell analysis of event-time correlations in nanoparticle induced cell death. *Commun Biol* 2: 35

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. **Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Joachim Rädler
Lehrstuhl für Experimentalphysik
Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschwister-Scholl-Platz 1
D-80539 München
raedler@lmu.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Judith Müller

2012–2017 Nanowissenschaftsstudium an der Universität Basel, Schweiz. 2017–2021 Anstellung bei der Firma ethris. Seit 2021 Promotionskandidatin an der LMU München, AG Rädler.



Gerlinde Schwake

1993–1998 Biotechnologiestudium an der FH Weihenstephan. 1999–2002 Research Scientist bei EPIDAUROS Biotechnologie AG in der Pharmakogenetik. Seit 2003 Wissenschaftlerin an der LMU München, AG Rädler.



Joachim Rädler

1984–1989 Physikstudium. 1993 Promotion in Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Erich Sackmann. 1993–1996 Postdoktorand bei Prof. Dr. Cyrus Safinya, University of California, Santa Barbara, USA. 1996–2000 Habilitation TU München. 2000 Gruppenleiterstellung am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz. Seit 2001 Ordinarius an der LMU München und Mitglied des Center for NanoScience. Cofounder und Advisory Board Member ibidi GmbH.