Funktionelle Genomik

Analyse von Zellfunktionen mit Hochdurchsatz-Mikroskopie und KI

CHRISTIAN SCHEEDER, FLORIAN HEIGWER, MICHAEL BOUTROS
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DKFZ) HEIDELBERG UND UNIVERSITÄT
HEIDELBERG

Genes that share a distinct phenotype often share biological functions. A principle that is used in genetic screens and that provides the basis for our understanding of key biological processes. Traditionally, individual phenotypes were used to group mutant alleles into cellular pathways. Today, high-throughput technologies allow the screening of thousands of perturbations. Using computational methods and machine learning, millions of images are profiled to assign biological effects to genes and drugs.

DOI: 10.1007/s12268-021-1648-7
© Die Autoren 2021

Genom z. T. krankheitsrelevante Entsprechungen entdeckt werden.

Im Gegensatz zur zufälligen Mutagenese, die auf physikalisch (Röntgenstrahlung) oder chemisch (Ethylmethansulfonat) induzierten Erbgutveränderungen basiert, ermöglichen genetische Technologien wie Gene-Traps, Gen-Ersatz durch homologe Rekombination, CRISPR-Cas und RNAi eine zielgerichtete Veränderung von Genen oder deren Expression. Mittels dieser Technologien können tausende Gene parallel in Zellmodellen getestet und Phänotypen mit computergestützten Methoden ausgewertet werden [4]. Unser Artikel beleuchtet aktuelle Entwicklungen von systematischen, phänotypischen Untersuchungen chemischer und genetischer Perturbationen mittels Hochdurchsatzmikroskopie.

■ Die visuelle Untersuchung von organismischen Merkmalen (Phänotypen) ist eine der ältesten Methoden in der Biologie, um z. B. funktionelle Unterschiede in genetischen Experimenten zu erfassen [1]. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Verfahren ermöglichen es, Phänotypen bis auf subzellulärer Ebene messbar zu machen. So haben phänotypische Screeningverfahren wichtige Beiträge zum Verständnis biologischer Prozesse, der funktionellen Charakterisierung von Genomen und der Entwicklung von Wirkstoffen geleistet. Mithilfe von Screeningverfahren werden Zellen oder Organismen nach genetischen Manipulationen oder Behandlung mit pharmakologischen Wirkstoffen (Perturbationen) auf Veränderungen des Phänotyps untersucht, um diese in kausalen Zusammenhang mit den zugrunde liegenden Perturbationen zu bringen. Durch die visuelle Klassifizierung von Phänotypen in Modellorganismen, wie beispielsweise der Taufliege *Drosophila melanogaster* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, konnten maßgebliche Erkenntnisse über zelluläre Prozesse und deren Komponenten erlangt werden (Abb. 1, [2, 3]). Für viele der dabei identifizierten Gene konnten im humanen

▲ **Abb. 1:** Visuelle Phänotypen bilden die Vielfältigkeit biologischer Funktionen ab. **A,** Aufnahmen von Augen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Im Gegensatz zur Wildtype (links) zeigen Fliegen mit einem RasV12-Genotyp (rechts) einen *rough eye*-Phänotyp, was auf einen hyperaktiven Ras-Signalweg hinweist. Adaptiert aus [13]. **B,** gewebespezifisches Ausschalten des *Armado*-Gens in der *wing imaginal disc*, einer Gewebestruktur in der Embryonalentwicklung von Fruchtfliegen. Das Protein wurde mittels Immunfluoreszenz angefärbt um das gewebespezifische Ausschalten im Zentrum der *disc* zu verfolgen. Adaptiert aus [14]. **C,** Zellen der humanen Krebszelllinie PANC-1 wurden angefärbt, um selektiv subzelluläre Strukturen zu visualisieren. **D,** Organoid, die verschiedene fluorophorgekoppelte Marker exprimieren, generiert aus humanem Gewebe. Adaptiert aus [15]. **E,** Durchlichtbild eines Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*), einem wichtigen Modellorganismus. Maßstabsbalken: 50 μ M. Adaptiert aus [16]. **F,** Fluoreszenzmikroskopisches Bild von HAP1-Zellen (blau: DNA, rot: F-Aktin, grün: α -Tubulin). Die Zellen wurden mit einem Aurora-Kinase B-Inhibitor behandelt, was die korrekte Anordnung der Chromosomen während der Zellteilung stört und zu Multinukleären Zellen führt.

◀ **Abb. 2:** Experimenteller und analytischer Ablauf eines mikroskopiebasierten Profiling-Experiments. **A**, Zellen werden automatisiert in Mikrotiterplatten ausgesät und nach einer Inkubationszeit mit Wirkstoffen behandelt. Nach einer weiteren Inkubationszeit wird das Experiment durch Zugabe eines Fixatives gestoppt. In einem letzten Schritt werden die Zellen angefärbt und Bilder aufgenommen. **B**, Digitale Bilder werden eingelesen, um Einzelzellen zu segmentieren, bevor *features* berechnet werden. Oftmals werden die Profile einzelner Zellen gemittelt, um ein Profil pro Bedingung (z. B. pro Wirkstoff) zu erhalten. Adaptiert aus [11].

▲ **Abb. 3:** Schritte einer intensitätsbasierten Segmentierung und Quantifizierung von Interaktionen. **A**, Basierend auf dem DNA-Signal werden einzelne Zellkerne detektiert, die Färbung cytoplasmatischer Proteine dient der Detektion von Zellumrissen. Die Kombination beider Masken erlaubt es, quantitative *features* einzelner Zellen zu berechnen. **B**, *Drosophila melanogaster*-Zellen wurden mit Doppelstrang-RNA behandelt, um gezielt die Expression einzelner Gene zu drosseln (*pnt*, *Rel*). Bei einer parallelen Perturbation beider Gene (*Rel* + *pnt*) wird deutlich, dass der Phänotyp von *pnt* den von *Rel* maskiert. Maßstabsbalken: 30 μ M. Adaptiert aus [7]. **C**, Die Ähnlichkeiten aller möglichen Kombinationen phänotypischer Profile von wirkstoffbehandelten HAP1-Zellen wurden berechnet und hierarchisch geclustert. Die Analyse clustert verschiedene Kinaseinhibitoren nach ihrem Zielprotein (ROCK: Rho-Kinase; Aurora: Aurorakinase; TK: Tyrosinkinase). Ein verblindeter Kandidat kann erfolgreich der Klasse der Aurorakinase-Inhibitoren zugeordnet werden. Maßstabsbalken: 50 μ M. **D**, In einem mikroskopiebasierten Screen in humanen Zellen zeigt sich, dass eine abschaltende Mutation von MEK1 einen cytotoxischen Effekt des Wirkstoffs Disulfiram induziert. Rot eingefärbt sind die Phänotypen in denen die chemisch-genetische Interaktion mit statistischer Signifikanz gemessen wurde (Zellzahl, DNA-Textur, Aktin-Textur). Adaptiert aus [8]

Ein Bild sagt mehr als tausend Worte

Im Gegensatz zu klassischen genetischen Screenings, in denen Phänotypen manuell analysiert wurden, ermöglichen neue Technologien eine weitgehend automatisierte Analyse von Tausenden oder Millionen von Bildern. Mithilfe von Mikroskopen werden Zellmorphologien und subzelluläre Strukturen einzelner Zellen sichtbar gemacht. Farbstoffe oder Markierungen durch fluoreszierende Proteine heben einzelne zelluläre Strukturen und Makromoleküle hervor, um deren Lokalisationen und Veränderungen zu verfolgen (**Abb. 1**).

Mikroskopiebasierte Untersuchungen erlauben es, in einem einzelnen Experiment tausende einzelner Zellen bezüglich eines breiten phänotypischen Spektrums „in Tiefe“ zu charakterisieren. In Kombination mit Hochdurchsatzmethoden lassen sich so bis zu mehreren tausend Bedingungen (z. B. Mutationen oder Expositionen mit chemischen Substanzen) parallel untersuchen [5]. Hochdurchsatzmikroskope nehmen dafür große Mengen digitaler Bilder auf und speichern sowie verarbeiten diese zunehmend effizient. Zur Auswertung werden Algorithmen genutzt, mit deren Hilfe einzelne Zellen zunächst durch eine Segmentierung als Objekte identifiziert werden. In einem zweiten Schritt werden hunderte numerische Messungen (*features*) auf Pixelebene berechnet. Diese repräsentieren die Morphologie, Textur und Intensität der Zellen. Als besonders effizient und robust hat sich hierbei die Fluoreszenzmikroskopie erwiesen. Durch den Einsatz von Fluorophoren, deren Lichtspektren sich nicht überschneiden, kann pro Fluorophor – und somit pro angefärbter Struktur – ein separates digitales Bild aufgenommen werden. Dies ermöglicht eine

effektivere Segmentierung. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) färbt z. B. hochspezifisch die DNA und ermöglicht es so, den Zellkern einer Zelle präzise zu erfassen (**Abb. 2** und **Abb. 3**).

Durch eine allgemeingültige Auswahl der *features* kann ein breites phänotypisches Spektrum abgesucht werden, ohne bestimmte Phänotypen von Interesse im Voraus definieren zu müssen. Somit lässt sich für jede einzelne Zelle ein individueller *feature*-Barcode (Profil) in einem einzigen Experiment messen. Mithilfe von maschinellem Lernen werden schließlich interessante Phänotypen und deren Beziehung untersucht: Für Zellen, die eine identische Mutation tragen oder der gleichen Substanz ausgesetzt waren, messen wir zumeist sehr ähnliche Profile. Daher kann über die Ähnlichkeit der Profile vorhergesagt werden, in welcher funktionalen Beziehung die Perturbationen stehen (**Abb. 3**, [6, 7]).

Mit maschinellem Lernen zur Generierung von Hypothesen

In den letzten Jahren wurde erfolgreich die Entwicklung und Anwendung von maschinellem Lernen als Werkzeug für die phänotypische Analyse biologischer Proben unternommen. Insbesondere für Datensätze mit mehreren tausend Versuchsbedingungen ist die Anwendung von Algorithmen aus dem maschinellen Lernen unerlässlich. Unüberwachtes Lernen, z. B. die hierarchische Clusteranalyse, ermöglicht es, nach Mustern in Datensätzen zu suchen ohne diese zuvor zu definieren. Versuchsbedingungen mit ähnlichen gemessenen Profilen werden dadurch in einem Cluster gruppiert. Finden sich in einem Cluster neben einer nicht charakterisierten Perturbation auch solche, denen bereits eine Funktion zugeordnet ist, lassen sich daraus biologische Hypothesen ableiten. So konnte gezeigt werden, dass für Wirkstoffe, welche die gleichen zelluläre Prozesse stören, ähnliche phänotypische Profile gemessen werden und das Wirkstoffbibliotheken mit mehreren zehntausend Substanzen nach diesem Prinzip charakterisiert werden können [8, 9]. Dies ermöglicht es, unerwünschte Effekte (z. B. *off-targets*) bzw. bis dato unbekannte Einsatzgebiete (*drug repurposing*) für Wirkstoffkandidaten zu identifizieren (**Abb. 3**, [8]). Überwachtes Lernen kann erfolgreich eingesetzt wer-

den, um nach Wirkstoffen zu screenen die den pathogenen Phänotyp mutierter Zellen rückgängig machen und somit den „gesunden“ Zustand wiederherstellen [10, 11]. Dies ist ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Krebserkrankungen, wobei beispielsweise versucht wird, den Phänotyp von Mutationen in Tumorsuppressorgenen durch Medikamente umzukehren.

Die Zelle – ein Gemeinschaftsprojekt

Es überrascht nicht, dass einzelne Gene nicht in Isolation funktionieren, sondern in wechselseitiger Beziehung stehen. Zudem ist eine Zelle ständig externen Stimuli ausgesetzt, welche das sensible Gleichgewicht der Signale in einer Zelle (Homöostase) beeinflussen und stören können. Solche externen Stimuli entstehen beispielsweise durch körpereigene Zellen in der direkten oder entfernten Nachbarschaft, Krankheitserreger oder schädliche Einflüsse aus der Umwelt. In Experimenten können solche Interaktionen durch spezielle Versuchsaufbauten simuliert werden. So lassen sich chemisch-genetische Interaktionen untersuchen, indem einzelne Gene durch gezielte Mutationen ausgeschaltet und die Zellen zusätzlich mit einem Wirkstoff behandelt werden [8]. Eine Interaktion liegt dann vor, wenn eine Mutante resistenter oder sensibler auf einen Wirkstoff reagiert als unveränderte Zellen. In letzterem Fall spricht man von einer synthetischen Letalität. Dieses Konzept konnte erfolgreich auf bestimmte Krebserkrankungen übertragen werden, bei denen z. B. Brustkrebspatientinnen und -patienten mit einer abschaltenden (Null-)Mutation in bestimmten Genen (z. B. *BRCA1* oder *BRCA2*) gezielt mit einem Inhibitor des Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) behandelt werden. Dieser tötet dann mutierte Tumorzellen, während Zellen ohne die entsprechenden Mutationen verschont bleiben. Chemisch-genetische Interaktionen manifestieren sich zudem über das gesamte phänotypische Spektrum einer Zelle. Hier bietet die Hochdurchsatzmikroskopie großes Potenzial, da sie ein sehr breites Spektrum von Reaktionen effektiv abbildet [12]. In einem mikroskopiebasierten Screen identifizierten M. Breinig *et al.* [8] beispielsweise eine Interaktion zwischen dem

Hier steht eine Anzeige.

Springer

Medikament Disulfiram und dem MAPK-Signalweg, was Ergebnisse aus weiteren unabhängigen Studien bestätigt (**Abb. 3**). Das Potenzial von Disulfiram in der Krebstherapie (ursprünglich zur Behandlung von Alkoholsucht zugelassen) wird aktuell in mehreren klinischen Studien untersucht.

Perspektiven

Neue Technologie ermöglichen es, immer komplexere phänotypische Screens auf immer größeren Skalen durchzuführen. Insbesondere für innovative präklinische Ansätze eröffnen sich dadurch neue Möglichkeiten. So finden beispielsweise tiefe neuronale Netzwerke vermehrt Anwendung, um phänotypische Screens mit Zellproben von Krebspatientinnen und -patienten durchzuführen. Ein Beispiel sind primäre Tumorzellen oder Organoide, die mit etablierten Bildanalyseverfahren nur begrenzt ausgewertet werden können. Desweiteren verspricht die Kombination von bildbasierten Analysen mit biochemischen Einzelzellanalysen, wie z. B. der RNA-Sequenzierung einzelner Zellen, neue Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp und deren Heterogenität im Kontext von Geweben oder ganzen Organismen.

Danksagung

Wir danken dem Team des Boutros-Labors für hilfreiche Kommentare zum Manuskript. Die Forschung im Labor von M. B. wurden durch einen Grant von GSK, einen ERC Advanced Grant ("Syngene") und ERC Synergy Grant ("Decode") der Europäischen Kommission und dem SFB 1324 der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. ■

Literatur

- [1] Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn 4: 3–47
- [2] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795–801
- [3] Jorgensen EM, Mango SE (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* 3: 356–369
- [4] Boutros M, Heigwer F, Laufer C (2015) Microscopy-based high-content screening. *Cell* 163: 1314–1325
- [5] Caicedo JC, Singh S, Carpenter AE (2016) Applications in image-based profiling of perturbations. *Curr Opin Biotechnol* 39: 134–142
- [6] Kiger AA, Baum B, Jones S et al. (2003) A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* 2: 27
- [7] Heigwer F, Scheeder C, Miersch T et al. (2018) Time-resolved mapping of genetic interactions to model rewiring of signaling pathways. *Elife* 7: e40174
- [8] Breinig M, Klein FA, Huber W, Boutros M (2015) A chemical-genetic interaction map of small molecules using high-throughput imaging in cancer cells. *Mol Syst Biol* 11: 846
- [9] Ziegler S, Sievers S, Waldmann H (2021) Morphological profiling of small molecules. *Cell Chem Biol* 28: 300–319
- [10] Gibson CC, Zhu W, Davis CT et al. (2015) Strategy for identifying repurposed drugs for the treatment of cerebral cavernous malformation. *Circulation* 131: 289–299
- [11] Scheeder C, Heigwer F, Boutros M (2018) Machine learning and image-based profiling in drug discovery. *Curr Opin Syst Biol* 10: 43–52
- [12] Laufer C, Fischer B, Billmann M et al. (2013) Mapping genetic interactions in human cancer cells with RNAi and multiparametric phenotyping. *Nat Methods* 10: 427–431
- [13] Fischer B, Sandmann T, Horn T et al. (2015) A map of directional genetic interactions in a metazoan cell. *Elife* 4: e05464
- [14] Port F, Strein C, Stricker M et al. (2020) A large-scale resource for tissue-specific CRISPR mutagenesis in *Drosophila*. *Elife* 9: e53865
- [15] Renner H, Grabos M, Becker KJ et al. (2020) A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *Elife* 9: e52904
- [16] Ruiz M, Bodhicharla R, Svensk E et al. (2018) Membrane fluidity is regulated by the *C. elegans* transmembrane protein FLD-1 and its human homologs TLC1D/2. *Elife* 7: e40686

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. Michael Boutros
 Abteilung Signalwege und Funktionelle Genomik
 Deutsches Krebsforschungszentrum und
 Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 580
 D-69120 Heidelberg
m.boutros@dkfz-heidelberg.de

AUTOREN

Christian Scheeder

Studium der Molekularen Biotechnologie an den Universitäten Heidelberg, Karlsruhe und Kopenhagen, Dänemark. Seit 2016 Promotionsstudent an der Universität Heidelberg in der Gruppe von Prof. Dr. M. Boutros.

Florian Heigwer

Studium der Molekularen Biotechnologie an den Universitäten Heidelberg und Stockholm, Schweden. 2013–2018 Promotion an der Universität Heidelberg. Seit 2018 Postdoktorand in der Gruppe von Prof. Dr. M. Boutros.

Michael Boutros

Studium der Biochemie und Biologie. 1999 Promotion am EMBL, Heidelberg. 1999–2003 Postdoktorand an der Harvard Medical School, Boston, USA. 2003–2008 Emmy-Noether-Gruppenleiter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ). Seit 2008 Abteilungsleiter im Bereich Genomforschung am DKFZ und Professor für Zell- und Molekularbiologie an der Universität Heidelberg. Seit 2020 Direktor des Marsilius Kollegs an der Universität Heidelberg und 2021 Sprecher des Sonderforschungsbereichs SFB1324.