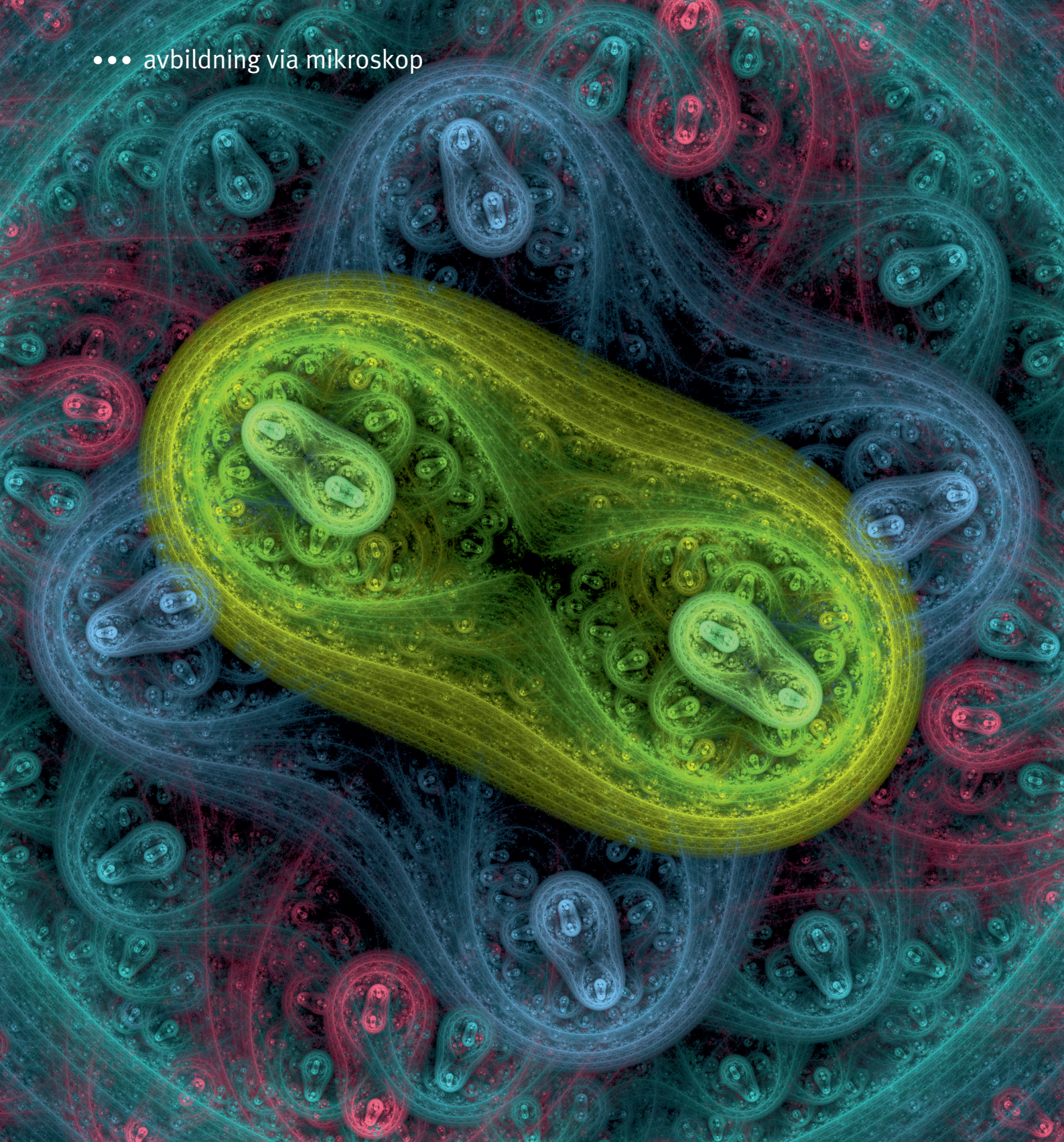
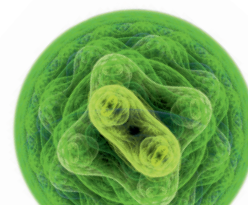
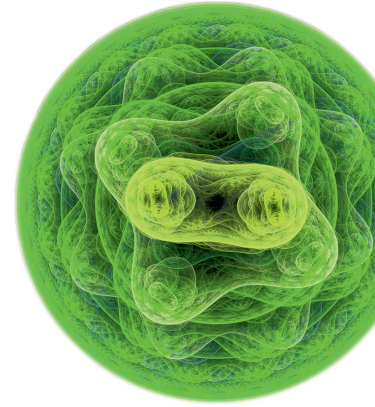


••• avbildning via mikroskop



Datadriven smart mikroskopi **visar var bilden ska tas**





För att ta extremt högupplösta mikroskopbilder på exempelvis celler måste man veta exakt var man ska rikta mikroskopet så att man avbildar just det man är intresserad av. Inte så lätt när det man letar efter är levande biologiskt material såsom interagerande celler. Forskare vid Lunds universitet har utvecklat en mjukvarumetod för smart, datadriven mikroskopi, som gör detta möjligt. Forskningen har publicerats i Cell Reports Methods.

Här beskriver forskningsledaren **Pontus Nordenfelt** senaste nytt på området.

Anda sedan Robert Hooke och Antonie van Leeuwenhoek började beskriva celler och mikroorganismer på 1600-talet har mikroskopi varit en naturlig del av vetenskap och är fortsatt en av de mest kraftfulla vetenskapliga metoder vi har. Genom mikroskopi är det möjligt att fånga den heterogenitet hos celler som är så central för vår förståelse av och behandling av både cancer och många andra sjukdomar. Det har alltid varit en så kallad singelcell-teknologi.

Att ta fina mikroskopibilder med hög upplösning är med dagens moderna mikroskopi väldigt enkelt. Det som brukade vara svårt och kräva stor teknisk kunskap är inga problem tack vare motoriserade komponenter och datorstyrda processer. Det var inte länge sedan man behövde justera fokus manuellt efter varje bildruta när man filmade med mikroskop, vilket nu sköts automatiskt av mikroskopet. Däremot kvarstår det mest grundläggande problemet i mikroskopi, var ska man ta bilden?

UTMANING ATT FÅNGA ÖGONBLICKET

I min forskargrupp studerar vi grundläggande mekanismer inom cellbiologi, mikrobiologi och immunologi, med applikationer inom både cancer och infek-



Ett mycket svårt tekniskt problem är att kunna fånga ögonblicket då en bakterie infekterar en människocell. Om man typiskt bara kan se en cell i taget, hur ska man då veta vilken cell som kommer att bli infekterad?

tion. Ett mycket svårt tekniskt problem är att kunna fånga ögonblicket då en bakterie infekterar en människocell. Om man typiskt bara kan se en cell i taget, hur ska man då veta vilken cell som kommer att bli infekterad? Det problemet bestämde sig jag och min doktorand Oscar André att vi skulle försöka lösa. Efter flera års utveckling och till en början tätt samarbete med Nikon, lyckades vi tillsammans med andra kollegor att färdigställa en mjukvaru-baserad metod som vi kallar för data-driven mikroskopi (DDM).

I DDM kopplas mikroskopet till en server som kontinuerligt analyserar de bilder som mikroskopet tar och därefter tar beslut om var nästa bild ska tas genom att skicka tillbaka koordinater till mikroskopet. Metoden är baserad på två kopplade processer, en som tar översikts-

bilder av provet, ofta med lägre förstoring, och en process som samlar högkvalitativ data för de mest relevanta delarna av provet (**se Bild 1**). Denna till synes enkla princip öppnar upp oanade möjligheter och kan användas för alla tänkbara frågeställningar inom mikroskopi. Vi visade direkt att vi nu utan problem kan fånga interaktioner mellan två objekt, till exempel när immunceller jagar och hittar bakterier, eller det omvända när bakterier attackerar och invaderar celler. Att enkelt kunna samla högupplöst data på sådana interaktioner är ett stort steg framåt för infektionsforskning och sparar enormt med tid och resurser.

Vi har under många år studerat cellmigration, en process som är central att förstå för både immunologi och onkologi, bland annat för metastasering av cancerceller. En konkret frågeställning

••• avbildning via mikroskop

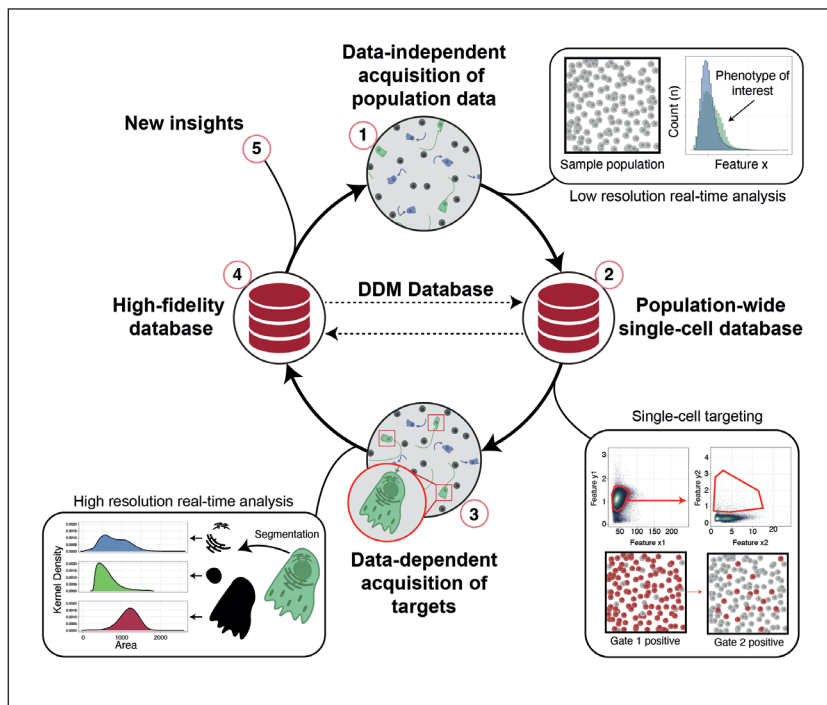


Bild 1 – Principen för datadriven mikroskopi

Datadriven mikroskopi (DDM) börjar med ett dataoberoende steg (DIA) som analyserar hela provet i låg upplösning (1). Datan från enskilda celler sparas i en populationsdatabas (2) som sen används för att generera kriterier för att välja vilka celler som ska tas bild på i hög upplösning (DDA) (3). Den högupplösta datan sparas i en databas som kopplas till populationsdatabasen (4), vilket möjliggör en övergripande analys av hela provet med hög kvalitet på de mest intressanta objekten (5). Sammantaget ger DDM högupplöst data som är satt i kontext av hela provets sammansättning.

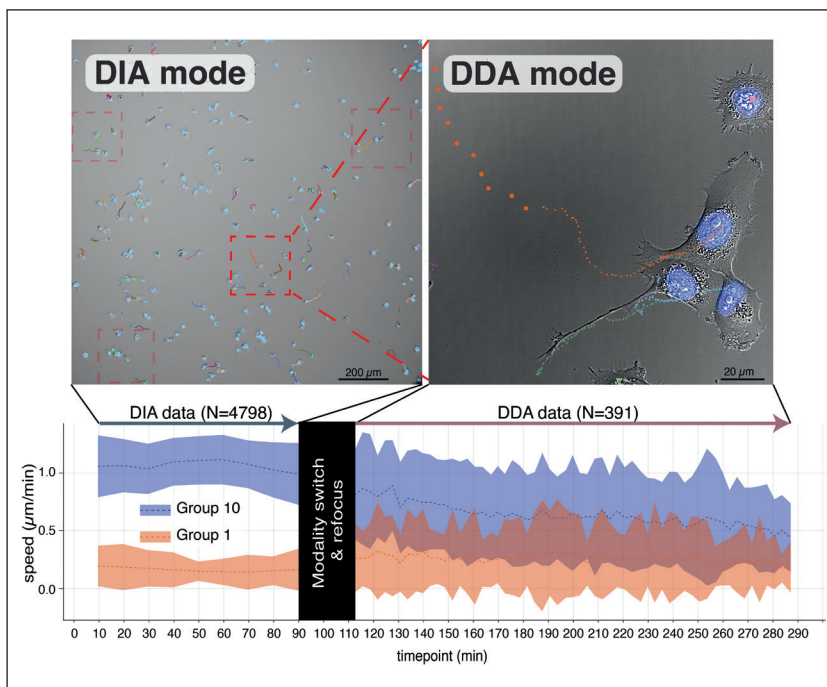


Bild 2 – Exempel på att följa migrerande celler baserat på deras migrationshastighet
Exempelbild på celler som migrerar med olika hastigheter (DIA mode, alla celler) och en målcell (DDA mode, riktad högupplöst mikroskopi) som migrerar i den översta percentilen med överlagrade koordinater från DIA och DDA (stora respektive små markörer). Notera högre upplösning

i både tid och rum för DDA-data. Grafen visar cellmigrering som spårades kontinuerligt mellan DIA och DDA, där snabba (blå) resp. långsamma (orange) celler grupperas.

handlar om vad som skiljer en cell som rör sig snabbt jämfört med en som rör sig långsamt. Genom DDM kunde vi samla in både information om hur alla celler rör sig, delvis för att kunna gruppera dem efter hastighet, men sen också samla in högupplösta filmer på hur celler rör sig (**Bild 2**). All datasamling sker helt automatisk och utan mänsklig påverkan tack vare uppkopplingen av mikroskopet till DDM-mjukvaran. Denna typ av mikroskopi är så kallad live imaging och är avancerat rent experimentellt, men ger väldigt värdefull information om enskilda cellers beteende och egenskaper. Utan DDM så har denna typ av data varit väldigt tidskrävande och svår att samla in.

AUTOMATISKA STICKKONTROLLER

En mer lättillgänglig användning av DDM är så kallad multiparameter imaging, där man sekventiellt kan ta bilder från olika inmärkning, till exempel med fluorescerande antikroppar. Det kan handla om att vissa celler har en eller flera olika cancermarkörer, där man vill analysera hur stor andel som har de olika markörerna. Traditionellt kan detta göras genom så kallad high-content screening, ofta med särskilt anpassade maskiner för detta. Nackdelen kan vara att all data samlas på likartat vis, med antingen för stor mängd data vid hög upplösning, eller för låg upplösning för att säkerställa kvaliteten på analysen. Med DDM kunde vi sätta upp en adaptiv screening som först samlar all data vid låg förstoring och snabbt karakteriserar den (**Bild 3**). Därefter görs automatiska stickkontroller med hög upplösning för att verifiera den ursprungliga analysen och eventuellt korrigera slutsatsen för varje cell. Med denna automatiska DDM-metod kunde vi visa att det gick att uppnå tio gånger bättre false discovery rate jämfört med traditionell screening (**Bild 3**).

En av de mer oväntade fördelarna med DDM är att det ger en effektiv metod för att åstadkomma så kallad korrelativ mikroskopi. I korrelativ mikroskopi vill man ta bilder av samma cell med olika sorters mikroskop. Det kan röra sig om att kombinera fluorescensmikroskopi med elektronmikroskopi (EM) för att få både en specifik inmärkning från fluorescens och den mycket höga strukturella upplösning som EM ger, men det kan också röra sig om olika fluorescens-

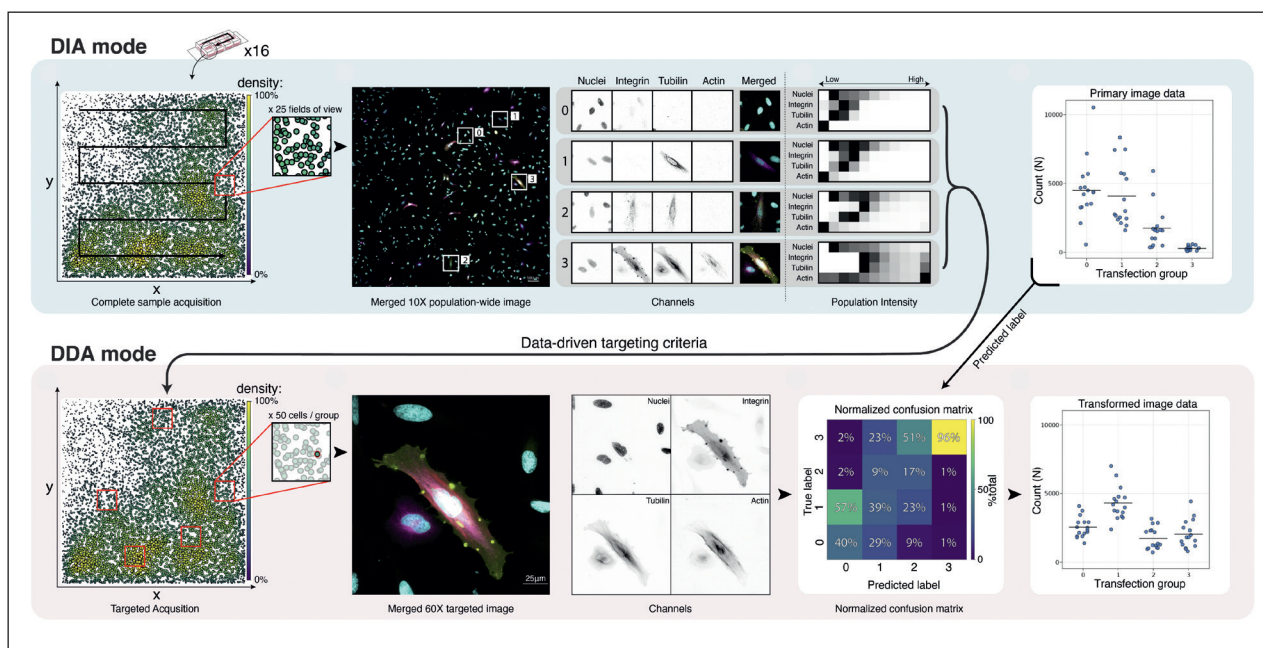


Bild 3 – Exempel på förbättrad adaptiv screening-process

HeLa-celler studerades med avseende på tre olika markörer. 16 prover analyserades automatiskt med mikroskopi (screening). Genom DIA så samlades komplett data (ca 110 000 celler) in i 10X förstoring och cellerna grupperades som negativa, enkel-, dubbel- och trippelpositiva celler. Grupperna fördelades initialt enligt 0=1>2>3. Genom automatisk DDA (riktad mikroskopi) så togs högupplösta stickprov på de olika kategorierna (50 per prov och kategori = 3200 celler). Den högupplösta datan användes för att korrigera den ursprungliga analysen och ge en mer sann bild av provet. Då visade sig fördelningen i grupperna bli 1>0=2=3, där den mest intressanta trippelpositiva gruppen var 10 ggr större än vad den vanliga screeningen gav.

NT-rådet rekommenderar¹

JEMPERLI

dostarlimab

En immunterapi för patienter med recidiverande eller avancerad endometrie cancer med dMMR/MSI-H²

Testa dMMR/MSI-H för att identifiera patienter som är lämpliga för behandling med JEMPERLI

▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning.

JEMPERLI (dostarlimab), 10 ml koncentrat till infusionsvätska, lösning, innehåller 500mg. Rx, EF ATC-kod: L01FF07, Monoklonala antikroppar och antikropps-läkemedelskonjugat. **Indikationer:** JEMPERLI är indicerat som monoterapi för behandling av vuxna patienter med recidiverande eller avancerad endometrie cancer med dMMR (deficient mismatch repair) eller hög mikrosatellitinstabilitet (MSI-H) som har progredierat under eller efter tidigare platinainnehållande behandling. **Dosering:** Rekommenderad dos som monoterapi är 500 mg dostarlimab var 3:e vecka i 4 cykler följt av 1000 mg var 6:e vecka i alla efterföljande cykler. Behandlingen bör fortsätta tills sjukdomsprogression eller oacceptabel toxicitet uppstår. **Behandling med JEMPERLI ska initieras och övervakas av läkare med erfarenhet av cancerbehandling. Varningar och försiktighet: Immunrelaterade biverkningar** Immunrelaterade biverkningar, som kan vara allvarliga eller dödliga, kan förekomma hos patienter som behandlas med antikroppar som blockerar programmerat celldödsprotein-1/

programmerad dödligand 1 (PD-1/PD-L1), inklusive dostarlimab. Immunrelaterade biverkningar kan förekomma i alla organ eller vävnader och uppträder vanligen under behandling med PD1/PDL1-blockerande antikroppar, men symtomen kan också visa sig efter avslutad behandling **Infusionsrelaterade reaktioner** Dostarlimab kan orsaka infusionsrelaterade reaktioner som kan vara allvarliga (se avsnitt Biverkningar). Vid allvarliga (grad 3) eller livshotande (grad 4) infusionsrelaterade reaktioner ska infusionen avbrytas och behandlingen sättas ut permanent. För fullständig forskrivarinformation och pris, se www.fass.se. Datum för översyn av produktresumén 2022-12-15. GSK AB, Box 516, 169 29 Solna, telefon: 08-638 93 00, se.gsk.com. Om du vill rapportera en biverkning på något av våra läkemedel eller vacciner så kan du kontakta oss på följande sätt: Webformulär: se.gsk.com/biverkning. Telefon: 08-638 93 00 (be om att bli kopplad till Biverkningsenheten).

dMMR=deficient mismatch repair; MSI-H=hög mikrosatellitinstabilitet.

Referenser: 1. NT-rådets rekommendation för PD-(L)1-hämmare. Janusinfo. 2. JEMPERLI (dostarlimab). Produktresumé.



Varumärken ägs av eller licensieras till GSK-koncernen.
©2023 GSK eller dess licensgivare.
PM-SE-DST-ADVT220006, 202302

GSK, Box 516, 169 29 Solna. 08-638 93 00, se.gsk.com

Jemperli
(dostarlimab)

••• avbildning via mikroskop

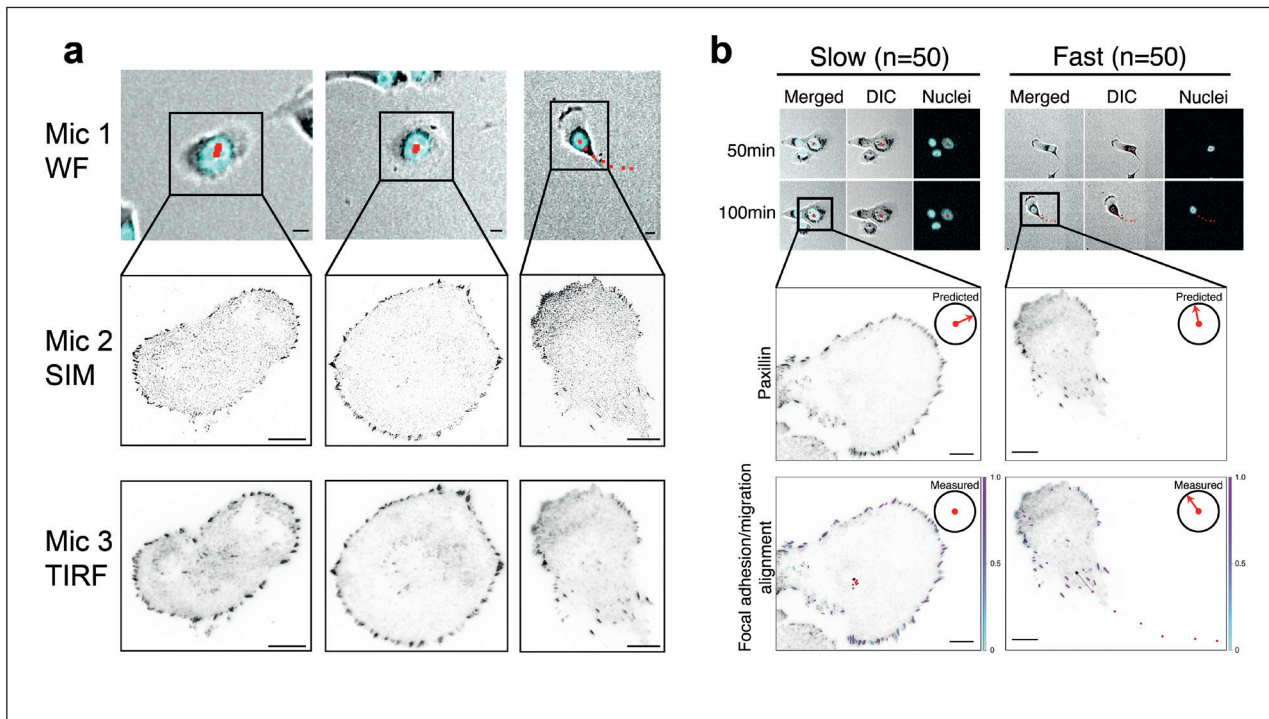


Bild 4 – Exempel på korrelativ mikroskopi

I bilden (a) visas exempel på tre celler som avbildats med tre olika mikroskop. Det första gav lågupplöst videodata (Wide-field, WF) där man kan följa hur cellerna rör sig. Efter fixering och användning av DDMs korrelativa algoritmer kunde samma celler enkelt lokaliseras i ett superresolutionsmikroskop (SIM) och ett TIRF-mikroskop som ger högre upplösning vid cellytan som cellerna migrerar på. I bilden (b) så visas exempel från långsamma och snabba celler. Om man inte haft tillgång till den korrelativa tidsdatan så hade en förutsägelse om rörelseriktning och hastighet baserad på cellform lätt blivit missvisande, men som nu enkelt kan läggas på som lager i den högupplösta datan på

applikationer som kräver olika mikroskop. Problemet är att när man flyttar ett prov mellan mikroskop så är det extremt svårt att hitta tillbaka till exakt samma område. Flyttar sig provet 1 mm, så kan man vara 100 celler bort. Ofta använder man sig av rutnät eller kulor som kalibreringsmarkörer kopplat med bildanalys för att kunna hitta tillbaka, något som är för krångligt eller avancerat för de flesta användare. I det första steget i DMM registreras alla celler i provet och ett koordinatsystem byggs upp med detta. Det innebär att om man tar ett prov till ett nytt mikroskop byggs ett koordinatsystem upp där också. Det som båda har gemensamt är att det relativa förhållandet mellan cellerna borde vara konstant, fast förskjutet i olika dimensioner. Genom att använda sig av hörnen på provet kan DDM snabbt beräkna hur det nya systemet är förskjutet och koppla de två koor-

dinatsystemen. Med andra ord ge möjlighet att hitta vilken cell som helst i båda mikroskopen på ett enkelt sätt.

KOMMERSIELL UTVECKLING

Vi testade att utföra korrelativ mikroskopi mellan tre mikroskop placerade på tre olika våningar i huset där vi har vårt laboratorium. Först började vi med samma sorts live imaging beskrivet ovan av hur snabbt eller långsamt celler rör sig. Därefter fixerades cellerna och provet togs till ett super-resolutions-mikroskop (upp till 100 nm upplösning). Där angav vi att vi ville ha högupplösta bilder på 50 celler som rört sig snabbt och 50 bilder på de som rört sig långsamt.

Tack vare de kopplade koordinatsystemen kunde denna process skötas helt automatiskt. Därefter tog vi provet till ett tredje mikroskop, TIRF, som ger extra hög upplösning i ytan på celler och

tog bilder på samma celler igen (**Bild 4**). Detta gav kopplad singelcell-data med både information om hur cellerna har rört sig och hur strukturerna i cellerna ser ut, vilket ger mycket goda möjligheter för mekanistisk förståelse. Rent principiellt hade mikroskopen kunnat stå var som helst och man kan tänka sig att man kan skicka prover mellan specialiserade instrument i olika länder för att få exakt den modalitet som frågeställningen kräver. Vi ser väldigt mycket fram emot hur detta kommer att användas framöver.

I samarbete med ett nystartat företag, Cytely, utvecklas just nu kommersiell mjukvara som på ett enkelt sätt ger även oerfarna mikroskopianvändare tillgång till kraften hos DDM. Om man är nyfiken på mjukvaran kommer det snart att finnas tillgängligt att testa vid Lund University Bioimaging Center (LBIC).

PONTUS NORDENFELT, DOCENT OCH FORSKNINGSLEDARE, LUNDS UNIVERSITET, PONTUS.NORDENFELT@MED.LU.SE

