

En helt ny typ av mikroskopiplattform ska öka tydligheten vid diagnostisering av cancertumörer. Metoden genererar stora mängder information att tolka, vilket sker med hjälp av artificiell intelligens. Tekniken innebär också nya möjligheter för hjärnforskningen. Här beskriver **Nils Norlin**, forskare vid Lunds universitet, den senaste utvecklingen inom området.

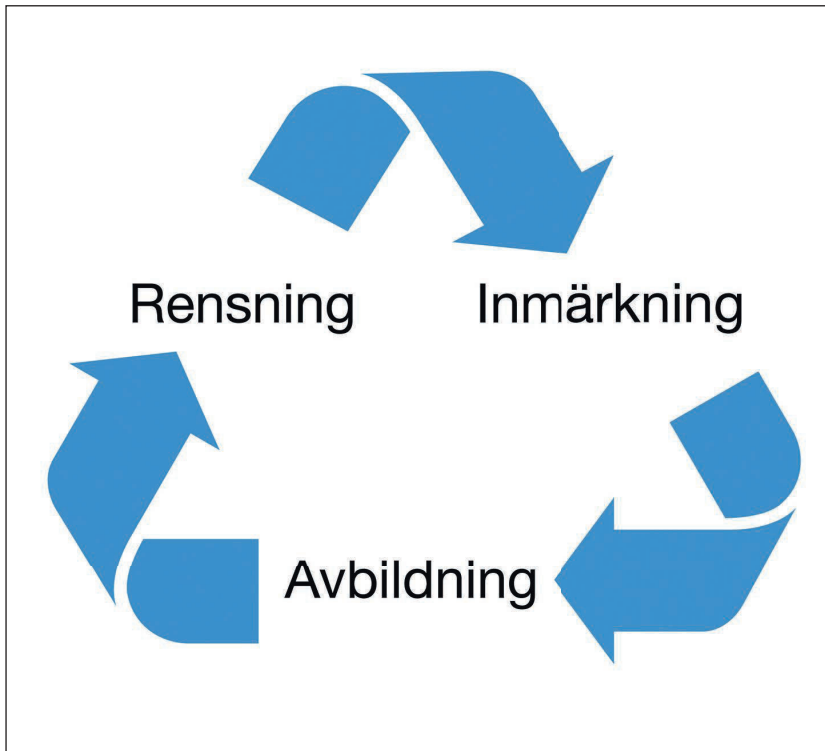
Ny **mikroskopteknik** kan ge **bättre** diagnostisering av **cancertumörer**

Dagens cancerdiagnostik och patologi är resultatet av otaliga framgångar genom åren och som i de allra flesta fall nått till en nivå där undersökningar av vävnadssnitt oftast kan ge svar på ja/nej-frågan om det är cancer eller inte. Stratifiering och subklassificering av vissa cancerformer kan visserligen fortfarande vara utmanande men i stort har vi redan nu nått väldigt långt. Vad finns det kvar att göra? Och vilka tekniska hjälpmedel kan i framtiden an-



60

NA 1.25



Figur 1. Illustration av ett så kallat iterativt avbildningsflöde som exempelvis startar med att ett vävnadsnitt inmärks med markörer, såsom antikroppar, följt av avbildning i mikroskop och därefter rensning av inmärkta markörer. Därefter kan nästa iteration startas med en ny inmärkning. En undersökning av ett vävnadsnitt kan inkludera 10-tals iterationer tills alla markörer har detekterats.

vändas för att ytterligare förbättra diagnostik och kanske i synnerhet hjälpa prognostisera utfallet av enskilda patienters behandlingar med ännu större framgång?

Nedan diskuteras nya landvinningar inom mikroskopi under samlingsnamnet spatiell (rumslig) molekylär profilering som börjar fira framgångar vad gäller identifieringen av nya biomarkörer för förbättrad precisionsmedicin.

I vanliga fall när ett vävnadsnitt eller tumörmicroarray (TMA) undersöks görs en H&E-infärgning för att förtydliga morfologi och därtill detekteras troligen några väl valda biomarkörer, ett protein av intresse eller mRNA beroende på typ av cancer. Dessa biomarkörer kan detekteras genom antikropps-inmärkning om biomarkören är ett protein, eller fluorescerande in situ-hybridisering (FISH) för mRNA-biomarkörer. Oftast sker undersökning av varje ny (bio)markör på ett separat vävnadsnitt, något som är tidskrävande om de inte utförs parallellt. Jämförelser av (sam)lokalisering gentemot andra biomarkörer kan inte heller göras exakt om inte flera

biomarkörer detekteras på samma vävnadsnitt.

Sekvensering används med ökande frekvens inom cancerdiagnostik. Det är ett kraftfullt komplement till mikroskopi och ger information om eventuella genfusioner, mutationer eller förändrade transkriptomuttryck. I och med att vävnaden dissocieras, löses upp, för att extrahera DNA eller mRNA (gäller även för encellssekvensering) förlorar vi dock information om cellernas rumsliga kontext och därmed även information om relationerna celler emellan.

De senaste åren har flera olika tekniker utvecklats för att övervinna ovan nämnda begränsningar med bibehållen information om cellernas relativa positioner för att kunna undersöka många olika biomarkörer (protein, mRNA, etc.) i ett och samma vävnadsnitt genom en iterativ inmärkningsstrategi.

AUTOMATISERAD INMÄRKNING

Generellt sett utförs detta mikroskopibaserade förfarande i tre steg (Figur 1). Först sker en inmärkning som ofta utgörs av fluorescensinmärkta antikroppar

och prob-DNA som binder till motsvarande mRNA eller DNA-sekvenser (sker ofta i ett steg men kan också vara uppdelat i en första inmärkning och en sekundär reporterinmärkning). Inmärkningen sker idealt sett automatiserat med ett fluidiksystem kopplat till mikroskopet. I och med att inmärkningarna även innehåller färgämnen, så kallade fluoroforer, kan man med laserljus excitera dessa så att fluorescensljus skickas ut (med en längre våglängd än excitationsljuset) vilket lätt kan detekteras av en mikroskopkamera. Avbildning med mikroskopi görs även det automatiserat då många små synfältsområden måste fotograferas och sammanfogas till en stor bild för att täcka hela vävnadsnittet. Därefter sker en rensning av inmärkningen vilket gör att all fluorescens försvinner. Detta kan ske på olika sätt men ofta tillsätts kemikalier genom fluidiksystemet¹. För att detta iterativa arbets-sätt skall kunna fungera krävs alltså en kombination av mikroskopi och ett fluidiksystem som hanterar vätsketransporten (av analysprober, till exempel antikroppar och rensningsvätskor) vilket också innebär nya tekniska utmaningar.

Förutom detektion av protein med antikroppar är mRNA en viktig biomarkör. För diagnostik av vävnadsnitt detekteras mRNA nästan uteslutande genom FISH där fluorescensinmärkta prob-DNA tillsätts med komplementär sekvens till det mRNA man vill detektera och avläsningen av fluorescenssignalen sker i mikroskop. Denna metod likasom inmärkning med antikroppar ger subcellulär lokalisering och dessa metoder har funnits i decennier och är väl etablerade². Nyligen har metoder för så kallad iterativ FISH dykt upp som möjliggör detektion av många fler mRNA-molekyler samtidigt^{3,4}. Metoderna för iterativ FISH är i princip snarlika de FISH-protokoll som redan är etablerade i klinik och har lite olika upplägg, men grundprincipen är att först tillsätta en stor mängd olika DNA-prober som har en komplementär sekvens till det mRNA man vill detektera med flera olika sekvenser per mRNA. Därefter tillsätts fluorescensinmärkta avläsningsprober som efter avbildning kan rensas bort inför nästa omgång (iteration). För varje iteration görs avläsningen med kamera i ett högupplösande mikroskop där intensi-

tetsprickar anger lokalisering av en mRNA-molekyl (Figur 2b).

SKAPAR EN PSEUDOFÄRG

Genom antingen en specifik färgkombination eller binär kombination (signal eller ingen signal) skapas en kod som representerar en viss typ av mRNA-molekyl. Med hjälp av en ”kodbok” kan vilken mRNA som motsvaras av vilken färgkombination, eller så kallad pseudofärg, utläsas efter att alla iterationer utförts. I dagsläget är mycket av detta arbete fortfarande på forskningsstadiet och det återstår en del arbete med att etablera dessa metoder i klinisk kontext men med detta tillvägagångssätt kan principiellt tusentals koder avläsas vilket betyder att lika många olika mRNA-molekyler kan detekteras i ett vävnadssnitt^{4,5}. En tidigare begränsande faktor har varit att de DNA-prob-bibliotek som behövs varit dyra och komplicerade att tillverka då de innehåller tiotusentals eller hundratusentals olika sekvenser för att täcka hela transkriptomet. Men såsom kostnaden för sekvensering har sjunkit brant de senaste åren har även priserna sjunkit för att generera DNA-prober.

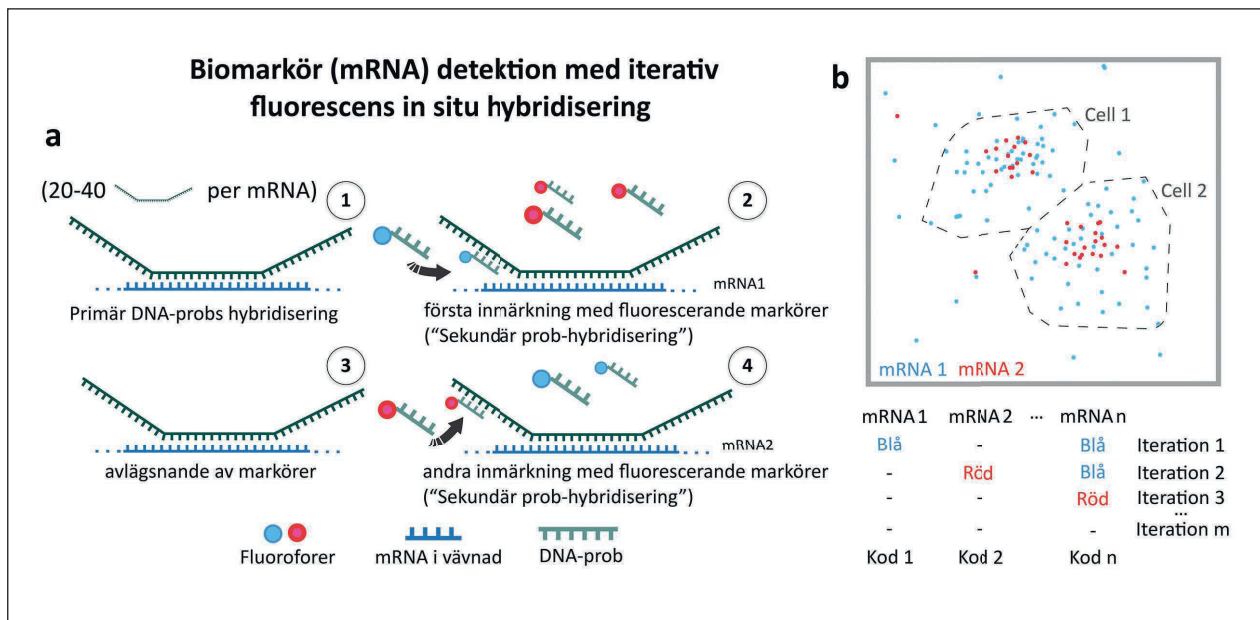
De senaste drygt tio åren har det skett en mindre revolution inom preparering av vävnadsprover där större vävnadsbiopsier kan göras nästintill transparenta främst genom kemikaliska behandlingar i olika steg⁶. Därefter avbildas provet med mikroskopi i en vätska som har ett passande brytningsindex vilket minimerar ljusspridningen. Det gör att cancerbiopsier kan undersökas i sin helhet utan att först behöva göra några vävnadssnitt. Mycket av det vi kan studera i 3D kan givetvis också ofta studeras i 2D med ett antal vävnadssnitt, men det finns ett antal lovande aspekter som lättare kan kvantifieras och undersökas i 3D. Ett sådant exempel är studier av intratumör heterogenitet i solida tumörer samt biomarkörer baserade på till exempel olika (ofta statistiska) analyser av blodkärl i och utanför tumörvävnad. Biopsianalyser i 3D kan ses som ett komplement och möjliggör jämförelser med mer standardiserade undersökningar i och med att formalinfixerad och paraffinbäddad vävnad kan även återparaffineras efter mikroskopianalys⁷. För 3D-mikroskopering av tumörbiopsier har det visat sig att en metod kallad ljus-

skiktmikroskopi är särskilt lämpad på grund dess kapacitet för hög spatiotemporal upplösning⁸. Försök görs även att kombinera ljusskiktmikroskopi med spatiell molekylär profilering för ännu snabbare analyser. Framtiden kommer att utvisa om denna fördel är tillräckligt stor för att automatiseras och implementeras i framtida kliniska undersökningar.

AKTIVT FORSKNINGSMRÅDE

Exakt hur den rika information som kan fås från dessa tekniker bäst ska tolkas och kunna korreleras till diagnos och prognos är fortfarande ett öppet forskningsfält, likaså saknas standarder för passande metadata och filformat.

Ovan har protein- och mRNA-detektion diskuterats, men liknande tillvägagångssätt kan också möjliggöra detektering av andra biomarkörer som sällan studerats i rumslig kontext såsom exempelvis DNA-metylering och kromatin-accessibilitet. Kombinerat kan alla dessa olika biomarkörer utgöra ett starkt komplement till morfologiska vävnadstudier (digital patologi) och kommer att medföra förbättrade AI-algoritmer för diag-



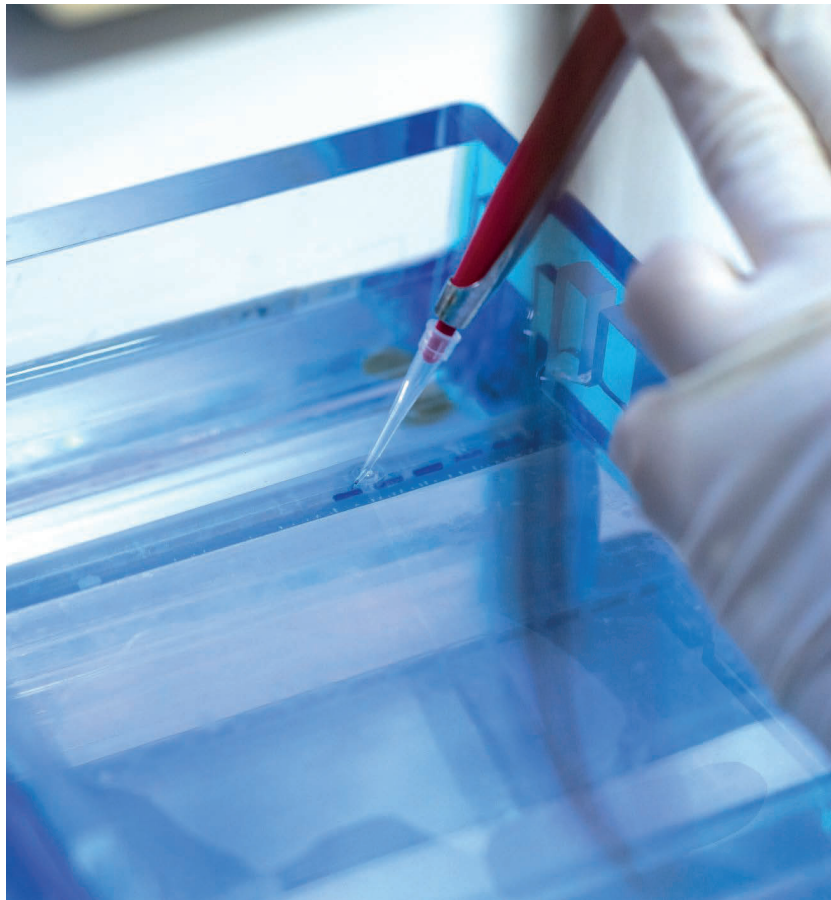
Figur 2. Illustration av ett iterativt detektionsförfarande av olika mRNA i vävnad, exempelvis från en tumörbiopsi, med fluorescerande in situ-hybridisering (FISH). (a) Först tillsätts primära DNA-prober till vävnaden för att identifiera olika mRNA-molekyler och sekundära prober används för att iterativt bestämma vilka mRNA-molekyler som detekteras med mikroskopi. (b) Illustration av mRNA-detektering genom iterativ FISH med subcellulär lokalisering (mRNA1-lokalisering till cytoplasman, mRNA2-lokalisering till cellkärnan). Viss variation finns mellan olika metoder, men grundprincipen är att efter att alla iterationer utförts kan man med hjälp av en ”kodbok” utläsa vilken typ av mRNA-molekyl som motsvaras av en specifik färgkombination (pseudofärg) eller binär kombination (signal eller ingen signal). I princip kan tusentals koder avläsas på detta sätt vilket betyder att lika många olika mRNA-molekyler kan detekteras i ett cell- eller vävnadsprov^{4,5}.

nostik/prognostik. AI/djupinlärning har även visat goda resultat vad gäller att särskilja (segmentera) ut enskilda celler i vävnad, något som är viktigt för att kunna korrelera vissa uttryck till en specifik cell, men dessa metoder måste också verifieras ytterligare för kliniskt bruk. Även utveckling av programvara för visualisering av stora och multidimensionella dataset och uppskalning av dataanalys till datakluster är ytterligare några av de utmaningar som väntar. I dagsläget har mikroskopidata av förklarliga skäl inte samma krav vad gäller patientsäkerhet som sekvensering av patientprover, såsom användning av säkra beräkningskluster för analys av sekvenseringsdata. Men i takt med att spatiell molekylär profilering utvecklas och kommer att generera ännu mer ”sekvenseringslik” data (till exempel med in situ-sekvensering⁹) kommer även nya etiska frågeställningar att dyka upp för några av dessa metoder, något som givetvis alltid är viktigt att ta hänsyn till för att garantera patientsäkerheten.

Arbetet med att överbrygga ovan nämnda utmaningar sker på många ställen i världen i detta aktiva forskningsområde. Forskning bedrivs inte bara utomlands utan numera också på Lunds universitet, Karolinska Institutet och Scilifelab. Med säkerhet kommer inte alla av de kombinationer av biomarkörer (till exempel tusentals olika mRNA) som vi kan mäta vara relevanta. Säkert är också att i takt med att nya och mycket dyra behandlingar läggs till arsenalen ökar behovet ytterligare av att veta att vi ger rätt behandling till rätt patient. Även om bara ett litet fåtal visar sig bära värdefull information i sin rumsliga lokalisering kommer vi att ha många nya möjligheter att ställa diagnos och prognos med högre precision och bättre kunna välja behandlingsstrategier, till glädje för otaliga cancerpatienter världen över.

REFERENSER:

1. Codeluppi S., Borm L.E., Zeisel A., La Manno G., van Lunten J., Svensson C. & Linnarsson S. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat Methods*. (2018).
2. Femino A.M., Fay F.S., Fogarty K. & Singer R.H. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science*. (1998).



3. Chen K.H., Boettiger A.N., Moffitt J.R., Wang S. & Zhuang X. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*. (2015)

4. Eng C.L., Lawson M., Zhu Q., Dries R., Koulina N., Takei Y., Yun J., Cronin C., Karp C., Yuan G.C. & Cai L. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seq-FISH. *Nature*. (2019).

5. Xia C., Fan J., Emanuel G., Hao J. & Zhuang X. Spatial transcriptome profiling by MER-FISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *PNAS*. (2019)

6. Ueda, H.R., Ertürk A., Chung K. Gradinaru V., Chédotal A., Tomancak P. & Keller P.J. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. (2020).

7. Tanaka N., Kanatani S., Tomer R., Sahlgren C., Kronqvist P., Kaczynska D., Louhivuori L., Kis L., Lindh C., Mitura P., Stepulak A., Corvigno S., Hartman J., Micke P., Mezheyeuski A., Strell C., Carlson J.W., Fernández Moro C., Dahlstrand H., Östman A., Matsumoto K., Wiklund P., Oya M., Miyakawa A., Deisseroth K. & Uhlén P. Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nat Biomed Eng*. (2017)

8. Glaser A.K., Bishop K.W., Barner L.A., Susaki E.A., Kubota S.I., Gao G., Serafin R.B., Balaram P., Turschak E., Nicovich P.R., Lai H., Lucas L.A.G., Yi Y., Nichols E.K., Huang H., Reider N.P., Wilson J.J., Sivakumar R., Shamskhou E., Stoltzfus C.R., Wei X., Hempton A.K., Pende M., Murawala P., Dodt H.U., Imaizumi T., Shendure J., Beliveau B.J., Gerner M.Y., Xin L., Zhao H., True L.D., Reid R.C., Chandrasekar J., Ueda H.R., Svoboda K. & Liu J.T.C. A hybrid open-top light-sheet microscope for versatile multi-scale imaging of cleared tissues. *Nat Methods*. (2022)

9. Ke R., Mignardi M., Pacureanu A., Svedlund J., Botling J., Wählby C. & Nilsson M. In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nat Methods*. (2013)

NILS NORLIN, BITRÄDANDE FORSKARE,
MOLEKYLÄR NEUROMODULERING,
LUNDS UNIVERSITET,
NILS.NORLIN@MED.LU.SE

