Methodenetablierung der bildbasierten Zellsortierung mittels BD Cellview™ technology auf dem BD FACSDiscover™ S8 am Department for Biomedical Research(DBMR) der Uni Bern

Jonas Zürcher, BMA 22-25

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Department for BioMedical Research, Flow Cytometry and Cell Sorting Core Facility

1. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Etablierung einer Methode zur bildbasierten Zellsortierung am BD FACSDiscover™ S8. Ziel war es, dessen Potenzial für die Forschungsgruppen am DBMR aufzuzeigen, indem ein "Proof-of-Principle" für die Sortierung von Zellen anhand morphologischer Veränderungen erbracht wird. Hierzu wurde der Golgi-Apparat von HeLa-Zellen mit CellLight™ Golgi-GFP fluoreszenz-markiert und dessen Fragmentierung mittels Brefeldin A induziert. Die anschliessende Sortierung basierte auf den bildbasierten Parametern *Diffusivity GFP* und *Size GFP* [1]. Die Ergebnisse bestätigten den Erfolg des Ansatzes. Die Sortierung der Zellen mit fragmentiertem Golgi erreichte eine Reinheit von über 95 %, wobei die Methode so präzise war, dass ausschliesslich Zellen mit vollständig fragmentiertem Golgi isoliert wurden.

2. Einleitung

Der BD FACSDiscover™ S8 ist der neuste und leistungsfähigste Zellsorter am DBMR. Seine innovative BD CellView™ -Technologie, welche die spektrale Durchflusszytometrie mit kameraloser Bildgebung kombiniert, eröffnet neue Möglichkeiten für die Zellanalyse und sortierung [2]. Bislang wird dieses Potenzial jedoch nur selten genutzt, da die bildbasierte Sortierung für viele Forschende noch unbekannt ist. Diese Arbeit soll die Leistungsfähigkeit der Methode demonstrieren und aufzeigen, welche neuen Forschungsansätze sich durch die Sortierung basierend auf subzellulären morphologischen Merkmalen ergeben. Als Modell diente die gezielte Isolation von Zellen basierend auf der Fragmentierung ihres Golgi-Apparats. Das hierfür verwendete Protokoll basiert auf einer Publikation von Malte S. Paulsen [1] .

3. Ziele & Fragestellungen

Ziel 1: HeLa-Zellen, die mit Brefeldin A behandelt wurden, aufgrund der unterschiedlichen Stärke der Golgi-Fragmentierung mithilfe des BD FACSDiscover™ S8 und der CellView™-Technologie sortieren.

Können die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlich starken Golgi-Fragmentierung sortiert werden?

Welche Imaging-Parameter müssen verwendet werden, damit die Sortierung erfolgreich ist?

Wie präzise konnten die Zellen mit dem BD FACSDiscover™ S8 sortiert werden, wenn die sortierten Zellen anschliessend auf dem Cytek Amnis ImageStream Mk II-Durchflusszytometer mit hochauflösender Bildgebung (60-fache Vergrösserung) überprüft wurden?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Material: Für das Experiment wurden HeLa-Zellen verwendet. Zur fluoreszierenden Markierung des Golgi-Apparats kam das Transduktions-Reagenz CellLight™ Golgi-GFP BacMam 2.0 zum Einsatz, während die Fragmentierung des Organells mit BD GolgiPlug™, das den Wirkstoff Brefeldin A enthält, induziert wurde.

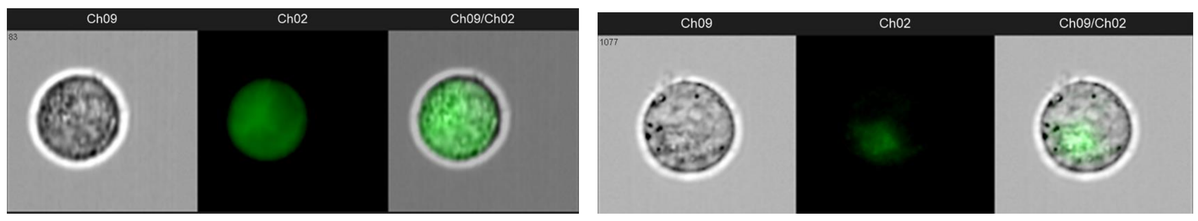
Vorgehen: Der experimentelle Ablauf begann mit der Kultivierung von HeLa-Zellen, die bei etwa 70 % Konfluenz mittels CellLight™ Golgi-GFP transduziert wurden, um ihren Golgi-Apparat fluoreszierend zu markieren. Anschliessend wurde die Golgi-Fragmentierung durch die Behandlung mit Brefeldin A induziert. Um den Erfolg dieser Induktion zu validieren, erfolgte vor der eigentlichen Sortierung eine Erfolgskontrolle am Cytek® Amnis® ImageStream®, bei der der Anteil an Zellen mit fragmentiertem Golgi bestimmt wurde. Die validierten Proben wurden dann am BD FACSDiscover™ S8 bildbasiert sortiert: Nach dem Gating auf Einzelzellen wurde die GFP-positive Population gezielt anhand der Parameter Diffusivity GFP (Verteilung des Signals) und Size GFP (Grösse des Signals) aufgetrennt [1]. Abschliessend wurde die Reinheit der isolierten Zellpopulation durch eine erneute Analyse (Sort-Check) am Cytek® Amnis® ImageStream® ^{x} MK IIquantifiziert.

5. Ergebnisse/ Resultate

Tabelle 1 Zusammenfassung der Ergebnisse des Sortchecks (Zürcher, 2025)

Experi-ment	Zellen Total	Golgi Intakt	Golgi Fragmen-tiert	Intakter Golgi%	Fragmen-tierter Golgi%
1	Nicht durchführbar				
2	336	4	331	1.19%	98.8%
3	522	6	516	1.15%	98.9%

Wie in Tabelle 1 dargestellt, konnte für die Experimente 2 und 3 eine Reinheit der sortierten Population von über 95% nachgewiesen werden. Die Überprüfung der Sortierung für das erste Experiment konnte nicht durchgeführt werden, da die Zellen in einem zu grossen Volumen (1 ml PBS) aufgefangen wurden, was eine zuverlässige Detektion auf dem Cytek®Amnis® Imagestream®^{x} Mk II verhinderte.



Golgi-Fragmentiert Golgi-Intakt

Abb. 1 Repräsentative Bilder von fragmentiertem und intaktem Golgi unter Wirkung von Brefeldin A (Zürcher, 2025)

6. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eindrücklich, dass die bildbasierte Zellsortierung mit der BD CellView™-Technologie eine hochpräzise Methode ist, um Zellen anhand subzellulärer morphologischer Merkmale zu isolieren. Der "Proof-of-Principle" konnte erfolgreich erbracht werden. Die erreichte Reinheit von über 95% belegt die Leistungsfähigkeit des Systems. Gleichzeitig verdeutlicht die geringe Zellausbeute den klassischen Zielkonflikt zwischen Reinheit und Ausbeute ("Purity vs. Yield"). Für diese Arbeit wurde die Reinheit priorisiert. Für zukünftige Experimente, die auf eine hohe Zellzahl für nachfolgende Analysen angewiesen sind (z.B. Proteomics, RNA-Seq), müsste die Gating-Strategie angepasst werden, um einen besseren Kompromiss zu finden. Zudem müsste die Effizienz der Transduktion optimiert werden. Zusammenfassend stellt die bildbasierte Sortierung eine leistungsstarke Erweiterung der Durchflusszytometrie dar, die neue Wege für die Zellanalyse eröffnet.

Referenzen

[1] Paulsen, M. S. (2024). Image-Enabled Cell Sorting Using the BD CellView Technology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2779*, 145–158. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3738-8_8

[2] Schraivogel, D., & Steinmetz, L. M. (2023). Cell sorters see things more clearly now. *Molecular Systems Biology*, *19*(3), e11254. https://doi.org/10.15252/msb.202211254

Abbildungen

Abb. 1 Repräsentative Bilder von fragmentiertem und intaktem Golgi unter Wirkung von Brefeldin A (Zürcher, 2025)

Tabellen

Tabelle 1 Zusammenfassung der Ergebnisse des Sortchecks (Zürcher, 2025)